



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'activités oxydo-réductases, leurs systèmes de régulation et leur distribution au sein de la population microbienne

Claire Mercier

► **To cite this version:**

Claire Mercier. Caractérisation d'activités oxydo-réductases, leurs systèmes de régulation et leur distribution au sein de la population microbienne. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10025 . tel-02862797

**HAL Id: tel-02862797**

**<https://theses.hal.science/tel-02862797>**

Submitted on 9 Jun 2020

**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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale :

EVOLUTION, ECOSYSTEMES, MICROBIOLOGIE, MODELISATION

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue à huis clos le

22 février 2013

par

**Claire MERCIER**

Titre :

**Caractérisation d'activités oxydo-réductases, leurs systèmes de régulation et leur distribution au sein de la population microbienne**

Dirigé par Mr Christophe GILBERT (UMR 5240 UCBL-CNRS)

et Mr Sylvain ORENGA (bioMérieux)

Jury

Monsieur OUAZZANI Jamal, Institut de Chimie des Substances Naturelles	Rapporteur
Monsieur MATIC Ivan, Université Paris Descartes	Rapporteur
Monsieur SCHRENZEL Jacques, Hôpital Universitaire de Genève	Rapporteur
Madame DOUBLET Patricia, Université Lyon 1,	Examinatrice
Monsieur ORENGA Sylvain, bioMérieux,	Examineur
Monsieur GILBERT Christophe, Université Lyon 1	Examineur



## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration  
 Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire  
 Vice-président du Conseil Scientifique  
 Secrétaire Général

### M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID  
 M. le Professeur Philippe LALLE  
 M. le Professeur Germain GILLET  
 M. Alain HELLEU

### COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard  
 Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
 Mérieux  
 UFR d'Odontologie  
 Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
 Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation  
 Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
 Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE  
 Administrateur provisoire : M. le Professeur G.  
 KIRKORIAN  
 Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS  
 Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.  
 Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON  
 Directeur : M. le Professeur P. FARGE

### COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies  
 Département Biologie  
 Département Chimie Biochimie  
 Département GEP  
 Département Informatique  
 Département Mathématiques  
 Département Mécanique  
 Département Physique  
 Département Sciences de la Terre  
 UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives  
 Observatoire de Lyon  
 Polytech Lyon  
 Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique  
 Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1  
 Institut Universitaire de Formation des Maîtres  
 Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI  
 Directeur : M. le Professeur F. FLEURY  
 Directeur : Mme le Professeur H. PARROT  
 Directeur : M. N. SIAUVE  
 Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE  
 Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN  
 Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID  
 Directeur : Mme S. FLECK  
 Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL  
 Directeur : M. C. COLLIGNON  
 Directeur : M. B. GUIDERDONI  
 Directeur : M. P. FOURNIER  
 Directeur : M. G. PIGNAULT  
 Directeur : M. C. VITON  
 Directeur : M. R. BERNARD  
 Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-  
 DESCHAMPS



**REMERCIEMENT**

*Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Jamal Ouazzani, Yvan Matic et Jacques Schrenzel pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail.*

*Un grand MERCI à Sylvain Orenga sans qui ce projet n'aurait jamais eu lieu. Ta rigueur et tes jeux d'esprits m'ont permis d'avancer durant ces quatre dernières années. Merci Sylvain de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis de voyager un peu et de me dire d'aller me reposer quand je n'étais plus capable de faire la différence entre un Gram neg et un Gram +.*

*Un grand MERCI à Christophe Gilbert également, qui a accepté de nous suivre dans cette aventure. Tu as permis d'avoir une autre vision du projet et tes conseils ont toujours été productifs/constructifs. Tes bricolages pour remettre sur pied une vieille chaine HPLC que l'équipe t'avait obligé à descendre à la cave ou bien pour réparer une pompe péristaltique qui malgré tout a fini par chauffer un peu trop (c'est le moins que l'on puisse dire) resteront des bons souvenirs.*

*Merci à Michel Peyret, pour son soutien sur le projet au niveau de la direction de bioMérieux.*

*Merci à Alex Van Belkum et à Dave Pincus pour leurs précieux commentaires et leur regard avisé sur le manuscrit de l'article.*

*Merci à Christine Rozand et Pradip Patel pour m'avoir permis de présenter mon travail au sein des réunions Innovation Industrie.*

*Merci à Valérie, qui a été une super stagiaire, bon courage pour la suite.....*

*Merci à Mr Tecan & co pour ces belles machines Infinite®. Merci pour leur réactivité pour les réparations, les prêts. Le doux bruit de grillon va me rester en tête pendant encore quelques années je pense.*

*Parfois, en travaillant dans 2 laboratoires en même temps, au sein de 2 équipes, on peut se sentir « entre 2 ». Je dois dire que je suis drôlement bien tombé car je n'ai jamais eu cette sensation. Que ce soit d'un côté comme de l'autre j'ai pu rencontrer des gens formidables et je me suis toujours senti à l'aise, je vous propose de venir faire un petit tour pour les rencontrer:*

**(à La Balme):**

*Merci à Michèle, « ma ptite maman bioMérieux ». Tu as toujours été présente quand j'avais besoin d'un conseil aussi bien professionnel que personnel.*

*Merci à mes 2 autres collègues de bureau Laurence et Martine pour tous ces papotages, ces crises de fous rires, ces partages de chocolat. Même quand je n'étais pas à La Balme, j'avais droit à des petits messages pour savoir si tout allait bien, on peut difficilement espérer mieux comme collègues !*



*Merci aussi aux filles du bureau d'à côté : Catherine, Bérangère et sans oublier Gene (j'ai toujours le petit tube de sable que tu nous avais ramener de ton voyage). Le chocolat c'était aussi avec vous (au passage je remercie Lindt pour son chocolat-pistache mmmhhhh).*

*Pas de panique, j'en viens à vous les legio, le temps de faire la route.....:*

**(à lyon) :**

*Tout d'abord, MERCI à Patricia Doublet de me faire le plaisir de participer au Jury. Merci à toi ainsi qu'à Danièle Atlan pour votre accueil chaleureux dans l'équipe Légionnelles.*

*Merci à mes collègues de mon deuxième bureau: Nathalie, grâce à toi on n'est jamais à cours de BamHI ou de Phusion ni de marabout. Julie , Céline (notre organisatrice de soirée, sans toi on n'aurait jamais pu acheter le(s) bon(s) parfum(s) de glace qui va (vont) bien à tout le monde surtout à moi). Bon courage à vous pour la suite de vos thèses les filles. Céline, ne t'inquiète pas, un jour tes manip marcheront sans rien abîmer. Merci à tous les autres étudiants qui sont passés dans ce bureau ces 3 dernières années avec qui j'ai pu partager des tranches de vie (Mélanie, Elise, Daniel et Stéphanie l'autre « industrielle »).*

**(Un petit retour du côté de La Balme)**

*Merci à Sonia de m'avoir permis de participer au groupe Innovation, ça n'a été que de l'enrichissement professionnel et un moyen supplémentaire de me sentir intégrée au service RDM.*

*Merci à Isabelle C. pour son aide en HPLC et Tanguy (**hop petit aller-retour à Marcy**) pour son aide en spectro de masse.*

*Merci à Jean-Marc pour ses petits passages quotidiens dans le bureau, c'est toujours un plaisir de t'entendre essayer d'arriver par surprise...*

*Merci à Jean-Luc pour m'avoir donné les autorisations de diffuser mon travail quand c'était possible. Et surtout d'avoir toujours été réactif même quand j'étais un peu juste au niveau des délais.*

*Merci à Marie pour sa bonne humeur et ces petits délires passés en Angleterre.*

*Merci aux assistantes de la RDM (Catherine, Isabelle et Pascale) ainsi qu'à Marie-Laure de l'unité UMR 5240 (à Lyon) pour nous faciliter les démarches administratives, informatiques, déplacements, congés, impression et boudinage de rapport.... Sans vous on serait vite perdus !*

*Il serait bien trop long de citer tout le monde mais Merci à tous les membres du service RDM avec qui j'ai pu partager des discussions scientifiques des repas ou autre (Diane, Aurélien, Victoria, Kavi, Fred, Caroline, les ValérieS, les NadineS, Christine , Anne-Coline, Maryse.....) .*



**(Retour à Lyon au MAP)**

*Merci à Fabien pour ces petits défis de manip qui nous ont permis de manger des bons gâteaux ☺. Eva te disait qu'il te restait 2 ans au moment où elle passait sa thèse, bon maintenant il ne t'en reste plus qu'un, mais t'inquiète ça va bien se passer, surtout ton pot. J'espère d'ailleurs que je pourrais venir à ta soutenance, je ne voudrais surtout pas louper ça !*

*Merci à Anne pour toutes ses petites histoires durant les moments de pause. Même si je n'ai pas tenu jusqu'à la fin, c'était bien sympa d'aller à la gym avec toi.*

*Merci à Claire, Josy, Isabelle C.P. et Renée pour leur aide aux 2 laboratoires.*

*Merci à Jean-Claude. Je ne t'ai pas vu longtemps au labo mais ton empreinte y est bien présente.*

*Merci à Xavier et son équipe « les compétents précaires » ou « précaires compétents » (je ne sais plus) pour nous avoir donné l'autorisation d'utiliser votre Tecan même si finalement on n'a pas pu faire la manip.*

**(En Angleterre)**

*Thank you to Arthur James, John Perry, Steve Stanford, Roz Anderson for their precious comments during our annual meetings. I don't forget their students Beth, Linda, Alex, Graham for the precious substrates they synthesize for us. Without you we couldn't move.*

**(Dans le Nord de la France) :**

*Merci à mes parents qui m'ont toujours supporté durant ces longues années d'études.*

*Merci à mon frère et ma sœur, qui je sais, sont fières de leur petite sœur, mais c'est aussi grâce à eux qui ont toujours été de bons conseils pour grandir (sans oublier que les talents de Manu pour me sauver de mes déboires avec l'informatique ont été d'une grande aide depuis que je suis à Lyon). Je n'oublie pas Thomas avec qui j'ai pu partager les expériences de thèse.*

*Merci à mon neveu et ma nièce qui sont de vrais rayons de soleil dans nos vies.*

*Une pensée à tous les autres membres de ma famille qui ont toujours su me soutenir.*

**(Retour à Lyon )**

*Merci à toute la chorale Cassiopée qui m'a permis d'être un bon défouloir pour décompresser. Une pensée particulière pour tous les membres du bureau élargi : notre chère présidente Chloé, notre éternel vice président Xavier, notre indispensable secrétaire Lucie et puis Anne-Claire, Marie (t'as passé un bon week-end ?), Zoulie, Zoé, Caro....*

*Merci à mon entourage à Lyon, pour leur soutien (je pense que la box détente que vous m'avez offerte va pouvoir être bientôt utilisée à bon escient), je pense à Naoual avec qui la*



*colocation prend fin en même temps que cette thèse mais je n'oublierais jamais les bons moments qu'on a passé ensemble. Je pense à Estelle, JC et Yoann : bon courage pour la fin de vos thèses. Je pense à Didier, Fabrice, Julie, Fabien, Mélanie, Guillaume, Laurie, Julien pour toutes ces soirées passées ensembles.*

*Je termine ce voyage par un Merci à celui qui partage ma vie depuis le début de cette thèse. On a su se motiver, reconforter l'un l'autre pour aller au bout de nos thèses respectives, on arrive au bout, mais ce n'est que le commencement d'une nouvelle vie pour nous...*

*Au moment où j'écris ces quelques mots, j'entends la célèbre chanson de Gilbert Bécaud « Et maintenant que vais-je faire ? », je ne pouvais pas conclure sans avoir fait allusion à la musique et je ne pouvais pas entendre une chanson plus à-propos à ce moment même. Une nouvelle page se tourne et elle est possible grâce à vous tous. C'est pourquoi je vous redis une dernière fois un grand MERCI pour tout !*



**Liste des abréviations**

°C : Degré Celsius

$\lambda_{em}$  : longueur d'onde d'émission

$\lambda_{exc}$  : Longueur d'onde d'excitation

$\lambda_{max}$  : Longueur d'onde maximale

$\mu\text{g}$  : Microgramme =  $10^{-6}$  gramme

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ala : Alanine

APS : PerSulfate d'Ammonium

ARN : Acide RiboNucléique

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic Local Alignment Tool

cDNA : ADN complémentaire

CS : Codon Stop

Cys : Cystéine

Da : Dalton

DO : Densité Optique

DTT : Dithiothréitol

EC : Enzyme Commission

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

FLP : Flippase

FMN : Flavin MonoNucléotide

FRT : Flippase Recognition Target



g.L<sup>-1</sup>: gramme par litre

Gln : Glutamine

Glu : Glutamine

Gly : Glycine

H : Heure

HCl : Acide chlorhydrique

HTH : Hélice-Tour-Hélice

IAA : Iodoacétamide

Kb : Kilo base (10<sup>3</sup> bases)

kDa : Kilo Dalton (10<sup>3</sup> Dalton)

Km : Constante de Mickaëlis

m : Mètre

M : Molaire (Mole par litre (mol.L<sup>-1</sup>))

MF : MacFarland

mg : Milligramme = 10<sup>-3</sup> gramme

min : Minute

mM : Millimolaire (mmol. L<sup>-1</sup>)

MPLD : 1-methyl-2-pyrrolidinone

MS : Spectrométrie de masse

MS-MS : Spectrométrie de masse en tandem

NA : Non Applicable

NaCl : Chlorure de sodium

NADH /NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ng : Nanogramme = 10<sup>-9</sup> gramme

Ni : Nickel

nm : Nanomètre (10<sup>-9</sup> mètre)



NTA : Acide NitriloTriacétique

PAGE : Electrophorese en Gel de PolycrylAmide

Pb : Paire de base

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PEG : PolyEthylène Glycol

pH : Potentiel Hydrogène

Phe : Phenylalanine

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

Pro : Proline

RFU : Relative Fluorescence Unit

RT : Reverse Transcriptase

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TE : Tris-EDTA

TEMED : Tétra-méthyl-ethylènediamine

Tm : Température de dénaturation (melting  
Temperature).

TOF : Time of Flight

UPLC : Chromatographie Liquide Ultra Performante

$v_{\max}$  : Vitesse maximale

Z : Charge

***NOTE : la terminologie anglaise a été gardée pour certains substrats enzymatiques pour que les liens avec la littérature soit plus simples, exemple : Methyl red à la place de rouge de methyle.***



<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>41</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>49</b>
I. L'oxydo-réduction.....	51
II. Les activités oxydo-réductases dans le monde microbien.....	51
III. L'activité azoréductase .....	53
III.1. Les composés « azo » et leur réduction .....	53
III.2. Réduction des composés « azo » par les microorganismes .....	57
III.2.1. Les microorganismes eucaryotes (levures/champignons).....	57
III.2.2. Microorganismes procaryotes.....	59
III.3. Description des azoréductases.....	61
III.3.1. Les différentes familles d'azoréductases.....	61
III.3.2. Stratégies d'identification des azoréductases .....	63
III.3.3. Les azoréductases ne sont pas uniques au sein des génomes.....	65
III.3.4. Les autres activités des protéines azoréductases.....	65
III.4. Mécanismes de réduction proposés .....	69
III.4.1. Voie spécifique privilégiée en aérobie.....	69
III.4.2. Voie non spécifique privilégiée en anaérobie.....	69
III.4.3. Le rôle des azoréductases.....	71
III.5. Les facteurs influençant la réduction des composés « azo » .....	71
III.5.1. Influence de la structure chimique des composés « azo » .....	71
III.5.2. Les cofacteurs.....	77
Formule.....	76
III.5.3. Les sources de carbone .....	77
III.5.4. Les composés quinones .....	77
III.5.5. Les autres facteurs.....	81
III.6. Etude des activités azoréductases .....	83
III.6.1. Suivi de la réaction par décoloration.....	83
III.6.2. Suivi de la réaction par consommation du NAD(P)H .....	83
III.7. Azoréduction chez <i>Escherichia coli</i> .....	85
III.8. Azoréduction chez <i>Enterococcus faecalis</i> .....	85
IV. l'activité nitroréductase .....	87
IV.1. Les composés « nitro » et leur réduction.....	87
IV.2. Description des nitroréductases .....	89
IV.2.1. Généralités .....	89
IV.2.2. Les mécanismes de nitroréduction.....	91
IV.3. Le rôle des nitroréductases .....	93
IV.4. Les facteurs influençant l'activité nitroréductase .....	95
Formule.....	96
IV.5. Etude des activités nitroréductase.....	97
IV.5.1. Détection directe de l'activité nitroréductase.....	97
IV.5.2. Détection indirecte de l'activité nitroréductase.....	97
IV.6. Nitroréductases chez <i>Escherichia coli</i> .....	99
IV.7. Nitroréductases de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	101
IV.8. La régulation des azoréductases et nitroréductases.....	103
IV.8.1. Les régulateurs de la famille MarR .....	103
IV.8.2. Exemples de régulation par les protéines MarR.....	105
V. Conclusion .....	107
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>109</b>
I. Choix des souches .....	111



I.1.	Souches cliniques .....	111
I.2.	Souches utilisées pour les manipulations génétiques.....	113
I.3.	Souches construites en laboratoire durant la thèse : .....	113
I.3.1.	Souches surproduisant des protéines .....	113
I.3.2.	Souches mutantes .....	115
I.3.3.	Souches de complémentation .....	115
I.4.	Milieux de culture .....	119
II.	<b>Substrats enzymatiques .....</b>	<b>119</b>
III.	<b>Techniques de manipulation des acides nucléiques (ADN et ARN) .....</b>	<b>119</b>
III.1.	Banque de plasmides .....	119
III.2.	Banque d'oligonucléotides .....	121
III.2.1.	Oligonucléotides utilisés pour le clonages dans le vecteur d'expression pQE30 .....	121
III.2.2.	Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de mutants délétés chez <i>E. coli</i> .....	121
III.2.3.	Oligonucléotides utilisés pour la vérification des mutants chez <i>E. coli</i> .....	123
III.2.4.	Oligonucléotides utilisés pour le clonage dans le vecteur d'expression pACYC177 pour la complémentation des mutants.....	123
III.2.5.	Oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR sur le gène <i>azoR</i> .....	123
III.3.	Extraction d'ADN chromosomique.....	123
III.4.	Extraction d'ADN plasmidique .....	125
III.4.1.	Mini préparations d'ADN plasmidique sur silice.....	125
III.4.2.	Maxipréparations d'ADN plasmidique.....	125
III.5.	Extraction d'ARN .....	127
III.6.	Réaction de polymérisation en chaine (PCR) .....	127
III.6.1.	Cible ADN pur : chromosome ou plasmide.....	127
III.6.2.	Cible : colonie .....	129
III.6.3.	RT-PCR .....	131
III.7.	Analyse de l'ADN par électrophorèse en gel d'agarose .....	133
III.8.	Purification des produits PCR.....	133
III.9.	Digestion par enzymes de restriction.....	135
III.10.	Ligature .....	135
IV.	<b>Préparation des cellules d'<i>E. coli</i> électrocompétentes .....</b>	<b>135</b>
V.	<b>Techniques de purification de protéines.....</b>	<b>135</b>
V.1.	Principe.....	135
V.2.	Surproduction de protéines possédant une étiquette 6-histidine.....	137
V.3.	Purification en conditions natives .....	137
V.4.	Purification en conditions dénaturantes suivie d'une renaturation .....	137
V.5.	Analyse des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.....	139
VI.	<b>Stratégie de mutagénèse .....</b>	<b>141</b>
VII.	<b>Test de réduction des substrats enzymatiques.....</b>	<b>143</b>
VII.1.	Réduction enzymatique .....	143
VII.1.1.	Cellules entières .....	143
VII.1.2.	Enzymes pures.....	143
VII.1.3.	Incubation.....	145
VII.2.	Présentation du lecteur de plaque Infinite® .....	145
VII.2.1.	Système d'absorbance.....	145
VII.2.2.	Système de fluorescence .....	147
VII.2.3.	Spectre d'absorbance .....	147
VII.2.4.	Spectres de fluorescence.....	149
VII.2.5.	Cinétique de réduction .....	149
VIII.	<b>Notions d'enzymologie.....</b>	<b>151</b>



VIII.1.	Définitions .....	151
VIII.1.	Méthode de Lineweaver et Burke .....	151
IX.	Méthode d'analyse par UPLC .....	153
IX.1.	Réduction chimique du substrat 7NCCA .....	153
IX.2.	Réduction enzymatique .....	153
IX.3.	Méthode UPLC .....	155
X.	Méthode d'analyse par spectrométrie de masse.....	155
XI.	Identification et antibiogrammes des souches de microorganismes par le système Vitek®2	157
<b>RESULTATS</b> .....		<b>159</b>
I.	Etude de la répartition des activités réductase au sein des microorganismes .....	161
I.1.	Sélection des souches .....	161
I.2.	Sélection des substrats.....	163
I.3.	Répartition interspécifique .....	163
I.4.	Répartition intraspécifique .....	165
I.5.	Conclusion et choix des modèles d'études pour les activités azoréductases et nitroréductases.	169
II.	Recherche des azoréductases et nitroréductases.....	171
II.1.	Modèle gram-négatif : <i>Escherichia coli</i> .....	171
II.1.1.	Azoréductase AzoR.....	171
II.1.2.	Nitroréductases NfsA et NfsB.....	173
II.2.	Modèle gram positif : <i>Enterococcus faecalis</i> .....	173
II.2.1.	Azoréductase AzoA.....	173
II.2.2.	Nitroréductases.....	173
II.3.	Etude phylogénétique des protéines. ....	175
II.4.	Conclusion .....	175
III.	Caractérisation biochimique des azoréductases et nitroréductases chez <i>Escherichia coli</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> .....	179
III.1.	Clonage des gènes codants les protéines d'intérêt.....	179
III.1.1.	Clonage du gène <i>azoA</i> .....	179
III.1.2.	Clonage du gène <i>azoR</i> .....	179
III.1.3.	Clonages des gènes <i>nfsA</i> , <i>nfsB</i> , <i>EF0404</i> , <i>EF0648</i> , <i>EF0655</i> et <i>EF1181</i> . ....	181
III.2.	Surproduction et purification.....	181
III.3.	Activités Azoréductase .....	183
III.3.1.	Les protéines AzoA, AzoR et EF0404 ont une activité azoréductase .....	183
III.3.1.1.	AzoA et AzoR.....	183
III.3.1.2.	Les protéines AzoA des différentes souches d' <i>E. faecalis</i> .....	183
III.3.1.3.	EF0404 .....	185
III.3.2.	Autres substrats « azo » .....	185
III.3.3.	AzoA, AzoR et EF0404 sont dépendantes de la flavine pour leur activité azoréductase .....	187
III.3.4.	AzoR, AzoA et EF0404 ont une préférence pour le NADH pour leur activité azoréductase .....	189
III.3.5.	La quantité de NADH influence la vitesse de réaction.....	189
III.3.6.	Conclusion sur les activités azoréductases.....	191
III.4.	Activité Nitroréductase .....	193
III.4.1.	Toutes les protéines purifiées ont une activité nitroréductase.....	193
III.4.2.	Vérification de l'activité nitroréductase <i>in vitro</i> Azor. ....	193
III.4.3.	La dépendance à la flavine est spécifique de l'enzyme .....	193
III.4.3.1.	Enzymes d' <i>E. coli</i> .....	195
III.4.3.2.	Enzymes d' <i>E. faecalis</i> .....	195
III.4.3.3.	Dosage de la flavine dans les échantillons de protéines pures.....	195
III.4.4.	Dépendance au NAD(P)H.....	199
III.4.4.1.	Enzymes d' <i>E. coli</i> .....	199



III.4.4.2.	Enzymes d' <i>E. faecalis</i> .....	199
III.4.4.3.	Influence de la concentration en NADH sur l'activité nitroréductase.....	201
III.4.5.	Amélioration du milieu réactionnel des nitroréductases.....	201
III.4.5.1.	Les peptones.....	201
III.4.5.2.	La glutamine.....	203
III.4.6.	Conclusion sur les activités nitroréductases.....	205
III.5.	Conclusion de la caractérisation qualitative.....	207
<b>IV.</b>	<b>Etude de la réaction de réduction du 7NCCA.....</b>	<b>209</b>
IV.1.	La réduction de 7NCCA se déroule en 4 étapes.....	209
IV.1.1.	La reproduction de la courbe.....	209
IV.2.	Recherche des intermédiaires par UPLC.....	209
IV.2.1.	Analyse UPLC des composés connus constituant le milieu réactionnel de départ et final.....	211
IV.2.1.1.	Milieu réactionnel de départ.....	211
IV.2.1.2.	Milieu réactionnel final attendu.....	211
IV.2.2.	Milieu réactionnel en cours de réaction.....	215
IV.3.	Conclusion de l'étude de la réaction de réduction du 7NCCA.....	217
<b>V.</b>	<b>Détermination des constantes enzymatiques de chaque enzyme.....</b>	<b>217</b>
V.1.	Azoréductases.....	219
V.1.1.	Km et Vmax vis-à-vis du substrat MR par absorbance à 435 nm et à 340 nm.....	219
V.1.2.	Km et Vmax vis-à-vis du substrat MR par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm.....	223
V.1.3.	Km et Vmax NAD(P)H par absorbance à 435 nm et à 340 nm.....	225
V.1.4.	Km et Vmax vis-à-vis des cofacteurs NADH et NADPH par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm.....	227
V.2.	Nitroréductases.....	229
V.2.1.	Km et Vmax du substrat 7NCCA.....	229
V.2.2.	Km et Vmax NAD(P)H.....	231
V.2.3.	Conclusion sur la détermination des constantes enzymatiques.....	231
<b>VI.</b>	<b>Etude du rôle <i>in vivo</i> des azoréductases et nitroréductases dans la réduction des substrats « azo » et « nitro » : exemple avec une souche de <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>233</b>
VI.1.	Construction des simples mutants délétés de <i>azoR</i> et/ou <i>nfsA</i> et/ou <i>nfsB</i> .....	233
VI.2.	Construction des doubles et du triple mutants délétés des gènes <i>azoR</i> et/ou <i>nfsA</i> et/ou <i>nfsB</i> .....	237
VI.3.	Complémentation des mutants.....	241
VI.3.1.	Le plasmide pACYC177 vide n'a pas d'incidence sur la souche.....	241
VI.3.2.	Construction des souches complémentées.....	243
VI.4.	Rôle de AzoR, NfsA et NfsB dans l'activité azoréductase.....	243
VI.4.1.	En absence d'oxygène.....	243
VI.4.1.1.	AzoR.....	243
VI.4.1.2.	NfsA et NfsB.....	245
VI.4.2.	En présence d'oxygène.....	245
VI.4.2.1.	AzoR.....	245
VI.4.2.2.	NfsA et NfsB.....	247
VI.5.	Rôle de AzoR, NfsA et NfsB dans l'activité nitroréductase.....	249
VI.5.1.	En absence d'oxygène.....	249
VI.5.2.	En présence d'oxygène.....	249
VI.5.2.1.	L'importance du couple NfsA/NfsB.....	249
VI.5.2.2.	AzoR est capable de compenser la perte d'activité nitroréductase induite par la délétion des 2 gènes <i>nfsA</i> et <i>nfsB</i> .....	249
VI.5.2.3.	Surexpression de <i>azoR</i> sur le plasmide pACYC177.....	251
VI.5.3.	Conclusion.....	251
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>255</b>



I.	L'activité azoréductase.....	257
I.1.	Les moyens de détection de l'activité azoréductase.....	257
I.1.1.	L'absorbance .....	257
I.1.2.	La fluorescence.....	257
I.2.	Activité azoréductase des enzymes pures. ....	261
I.2.1.	Analyse qualitative .....	261
I.2.2.	Analyse quantitative.....	263
I.3.	Les voies métaboliques d'azoréduction chez <i>E. coli</i> .....	267
II.	L'activité nitroréductase.....	269
II.1.	L'activité nitroréductase des enzymes pures .....	269
II.2.	La réaction de réduction du 7NCCA et constantes enzymatiques .....	271
II.3.	Les voies métaboliques de la nitroréduction chez <i>E. coli</i> .....	273
II.3.1.	La sensibilité à l'oxygène .....	273
II.3.2.	Rôle de NfsA et NfsB.....	277
II.3.3.	Rôle de AzoR.....	277
III.	La dépendance à la flavine .....	279
IV.	La classification des enzymes .....	281
V.	L'utilisation des activités azoréductases et nitroréductases dans le domaine du diagnostic <i>in vitro</i> 283	
V.1.	Les activités azoréductases .....	283
V.2.	Les activités nitroréductases .....	283
V.3.	La détection de microorganismes anaérobies stricts ou facultatifs .....	285
VI.	Conclusion et perspectives.....	285
<b>ANNEXES.....</b>		<b>291</b>
Annexe Cartes plasmidiques. ....		293
Annexe Spectre d'absorbance et d'émission des substrats enzymatiques.....		308
Annexe Réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactéries à Gram -, 4 espèces de bactéries à Gram + et 2 espèces de levures dans du TSB. ....		310
Annexe Séquences peptidiques des protéines purifiées chez <i>E. coli</i> .....		329
Annexe Séquences peptidiques des protéines purifiées chez <i>E. faecalis</i> .....		330
Annexe séquençage des gènes clonés dans le vecteur pQE30. ....		331
Annexe arbre phylogénétique des souches d' <i>E. faecalis</i> obtenus d'après l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF .....		341
Annexe Spectres d'absorbance du FMN et FMNH <sub>2</sub> .....		343
Annexe Spectres LC-ESI-MS des échantillons de protéines purifiées en conditions natives et dénaturantes		345
Annexe Effet de la glutamine sur l'activité nitroréductase des enzymes pures.....		349
Annexe séquençage des zones délétées des souches mutantes .....		351
<b>REFERENCES .....</b>		<b>354</b>



## Liste des figures

Figure 1 : Tests diagnostics commercialisés par bioMérieux pour la détection, l'identification et l'antibiogramme des microorganismes. A) galerie API®, B) géloses ChromID®, C) TEMPO® et D) Vitek2® .....	42
Figure 2 : Exemple de réaction d'oxydo-réduction avec le couple rédox NADH/NAD <sup>+</sup> .....	50
Figure 3 : Nombre de publications référencées dans la banque de données du NCBI par an depuis 1959 jusqu'à nos jours sous les mots clés « azoreductase » et « azoreduction » .....	52
Figure 4 : Formule chimique de la tartrazine, colorant « azo » utilisé comme colorant alimentaire (nommé yellow 5 aux USA, E102 en Europe et CI 19140 dans des produits cosmétiques).....	52
Figure 5 : Classification des enzymes azoréductases selon leurs besoins en cofacteur. ....	60
Figure 6 : Azoréductase AzoR d' <i>E. coli</i> .....	62
Figure 7 : Formule chimique du composé quinone lawsone. ....	66
Figure 8 : Schéma d'une réaction de réduction d'un composé "azo" par le mécanisme enzymatique ping-pong. ....	66
Figure 9: Mécanismes de réduction des composés "azo" par les microorganismes suggérés par la littérature. ....	68
Figure 10 : Formules chimiques de substrat ayant une fonction carboxyle en position ortho (Methyl red) ou en para (p-Methyl red) par rapport à la fonction azo et les constantes d'affinités d'AzoR de <i>E. coli</i> vis-à-vis de ces substrats (79,79,79).....	70
Figure 11 : Nombre de publications référencées dans la banque de données du NCBI par an depuis 1956 jusqu'à nos jours sous les mots clés « nitroreductase » et « nitroreduction ».....	86
Figure 12 : Réaction de réduction d'une fonction « nitro » en passant par des stades de réduction intermédiaires formant les composés nitroso et hydroxylamine. ....	86
Figure 13 : Classification des enzymes nitroréductase selon leur sensibilité à l'oxygène et leurs dépendance en NAD(P)H.....	88
Figure 14 : Schéma de réduction d'un composé nitroaromatique par une nitroréductase de type I et une nitroréductase de type II.....	90
Figure 15 : Organisation génétique du régulon <i>mar</i> . ....	102
Figure 16 : Formules des substrats utilisés. ....	118
Figure 17: Schéma de la stratégie de choix des amorces dans le but d'un clonage dans le plasmide pQE30 d'un gène codant une protéine à surproduire. ....	120
Figure 18 : Schéma de la stratégie de choix des amorces dans le but d'un clonage dans le plasmide pACYC177 d'un gène délété dans la souche mutante.....	122
Figure 19 :Marqueur de taille GeneRuler 1 kb (Fermentas). ....	132
Figure 20 : Liaison entre le nickel de la résine accrochée par le groupe nitriloacétique et les atomes d'azote de la chaîne latérales des résidus histidines (Promega).....	134
Figure 21 : Schéma de stratégie de mutagenèse dirigée. ....	140
Figure 22 : Schéma de préparation des plaques pour le suivi des activités enzymatique cellulaires. ....	142
Figure 23 : Lecteurs de plaque Infinite® M200pro et M1000. ....	144
Figure 24 : Système optique de mesure d'absorbance du lecteur de plaque Infinite M1000.....	144



Figure 25 : Système optique de fluorescence des lecteurs de plaque Infinite® M1000 et M200. ....	146
Figure 26 : Cinétique suivant l'équation de Michaelis-Menten. ....	150
Figure 27 : Représentation de la concentration de produit formé en fonction du Temps (A) pour la détermination des vitesses initiales ( $v_i$ = coefficient directeur des tangentes à $t=0$ ) utilisées pour la représentation en double inverse (B) .....	150
Figure 28 : Liste des espèces de microorganismes testées.....	160
Figure 29 : Exemples de courbes de croissance d'une souche pour chaque espèce représentée en présence d'un substrat.....	164
Figure 30 : Alignement des séquences protéiques de YcaK (A) et YieF (B) avec la séquence protéique de AzoR de la souche d' <i>E. coli</i> K12 MG1655. ....	170
Figure 31 : Alignement des séquences protéiques de RutE (A) et YdjA (B) avec la séquence protéique de NfsB de la souche d' <i>E. coli</i> K12 MG1655. ....	172
Figure 32 : Alignement des séquences protéiques de EF1181 (A) et EF0648 (B) avec la séquence protéique de NfsA et de EF0404 (C) et EF0648 (D) avec la séquence protéique de NfsB de la souche d' <i>E. coli</i> K12 MG1655. ....	174
Figure 33 : Arbres phylogénétiques obtenus à partir de 3 méthodes à l'aide du logiciel SeaView : méthode par parcimonie, méthode des distances et méthode des maximums de vraisemblance. ...	176
Figure 34 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des amplifications par PCR des gènes codants les protéines azoréductases.....	178
Figure 35 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des amplifications par PCR des gènes codants les protéines nitroréductases. ....	178
Figure 36 : Design d'amorces internes (flèches rouges) et externes (flèches vertes) au gène <i>azoR</i> (bleu). ....	178
Figure 37 : Résine Ni-NTA lors de la purification.....	180
Figure 38 : SDS-PAGE 12% de toutes les protéines purifiées lors de cette étude d' <i>E. coli</i> (A) et d' <i>E. faecalis</i> (B). ....	180
Figure 39 : Détection de l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA95 et d'AzoA76. ....	182
Figure 40 : Détection de l'activité azoréductase de plusieurs protéines AzoA purifiées à partir du clonage du gène <i>azoA</i> de différentes souches d' <i>E. faecalis</i> . ....	182
Figure 41 : Alignement des protéines AzoA de toutes les souches d' <i>E. faecalis</i> dont gènes <i>azoA</i> ont été clonés. ....	184
Figure 42 : Détection de l'activité azoréductase de NfsA, NfsB, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181 sur MR. ....	184
Figure 43 : Détection de l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA95 et d'AzoA76 sur HABA. ....	186
Figure 44 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA et d'EF0404 purifiées en conditions natives. ....	186
Figure 45 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité azoréductase des apoenzymes AzoR, AzoA et EF0404.....	188
Figure 46 : Effet du NAD(P)H sur l'activité azoréductase des apoenzymes AzoR, AzoA95 et EF0404. ....	188
Figure 47 : Influence de la quantité en NADH sur l'activité azoréductase de AzoA95 purifiée en conditions natives. ....	190



Figure 48 : Détection de l'activité nitroréductase de toutes les protéines purifiées en conditions natives d' <i>E. coli</i> (A) et d' <i>E. faecalis</i> (B). .....	192
Figure 49 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes d' <i>E. coli</i> (A) et d' <i>E. faecalis</i> (B). .....	192
Figure 50 : Spectres d'analyse LC-ESI-MS des échantillons de protéine EF0404. ....	194
Figure 51 : Spectres d'analyse LC-ESI-MS des échantillons de protéine NfsA.. ....	196
Figure 52 : Effet du NAD(P)H sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes purifiées <i>E. coli</i> . .....	198
Figure 53 : Effet du NAD(P)H sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes purifiées <i>E. faecalis</i> . .....	200
Figure 54 : Influence de la quantité en NADH sur l'activité nitroréductase de EF0404 purifiée en conditions natives. ....	200
Figure 55 : Effet de différents milieux sur l'activité nitroréductase des enzymes EF0404 et EF1181 purifiées en conditions natives. ....	202
Figure 56 : Effet de la cystéine (L-Cys) et de la glutamine (Gln) sur la réduction du 7NCCA par la forme apoenzyme de NfsB. ....	204
Figure 57 : Les différentes phases de réduction de 7NCCA par EF0404. ....	208
Figure 58 : Spectres UPLC des composés présents dans le milieu réactionnel de départ (A) et final (B). .....	210
Figure 59 : Spectres UPLC de différents milieux réactionnels. ....	212
Figure 60 : Analyse par UPLC de la réduction enzymatique du substrat 7NCCA par l'enzyme EF0404 purifiée en conditions natives. ....	214
Figure 61: Exemple de représentation en double inverse des vitesses initiales en fonction de la concentration en MR ([MR]) pour l'enzyme AzoR en présence du cofacteur NADH. ....	220
Figure 62 : Fluorescence du milieu réactionnel en fonction de la quantité d'acide anthranilique issue de la réduction du MR en prenant en compte la quantité de MR non dégradé. ....	224
Figure 63 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de vérification du mutant $ECO\Delta azoR$ . .....	234
Figure 64 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de vérification de tous les mutants. ....	236
Figure 65 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de criblage des doubles mutants. ....	238
Figure 66 : Impact du plasmide vide pACYC177 sur la croissance et les activités azoréductase et nitroréductase de la souche ECOK12. ....	240
Figure 67 : Courbes de croissance des souches mutantes en présence de Methyl Red (MR). ....	242
Figure 68 : Réduction de MR par le mutant $ECO\Delta azoR$ en condition statique. ....	242
Figure 69 : Réduction de MR par le mutant $ECO\Delta nfsA$ $ECO\Delta nfsB$ et $ECO\Delta nfsA-nfsB$ complémenté (- -) ou non (-) par le plasmide hybride pACYC177 porteur des gènes délétés sur le chromosome. ....	244
Figure 70 : Réduction du MR par le triple mutant $ECO\Delta azoR-nfsA-nfsB$ sous agitation à 35°C. ....	244
Figure 72 : Réduction du MR par les mutants délétés de <i>azoR</i> et/ou <i>nfsA</i> et/ou <i>nfsB</i> sous agitation à 35°C en plaque 24puits. ....	246
Figure 73 : Réduction de MR par le mutant $ECO\Delta azoR$ sous agitation orbitale sur 22 h. ....	246



Figure 74 : Réduction de MR par les mutants $ECO\Delta azoR$ $ECO\Delta nfsA$ $ECO\Delta nfsB$ et $ECO\Delta nfsA-nfsB$ . ...	247
Figure 75 : Réduction de 7NCCA par les différents mutants en conditions statiques. ....	248
Figure 76 : Réduction de 7NCCA par les différents mutants complémentés ou non en conditions d'agitation. ....	248
Figure 77 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des fragments RT-PCR sur le gène <i>azoR</i> . ....	250
Figure 78 : Suivi de l'oxydation du NADH en présence et en absence de EF0404 purifiée en conditions natives. ....	256
Figure 79 : spectre d'absorbance du NADH et du NAD. ....	258
Figure 80 : Spectre d'absorbance du FMN. ....	258
Figure 81 : Réaction de réduction du Methyl red (MR). ....	264
Figure 82 : Hypothèse de réduction enzymatique du 7NCCA (acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique) en 7ACCA (acide 7-aminocoumarine-3-carboxylique). ....	270



### Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de composés « azo » et leur produits de réduction associée. ....	54
Tableau 2 : Liste d'espèces pour lesquelles une activité azoréductase a été décrite. ....	58
Tableau 3 : Liste de protéines ayant une activité azoréductase décrites dans la littérature. ....	60
Tableau 4 : Exemples de composés quinones ayant un effet accélérateur sur l'azoréduction. ....	76
Tableau 5 : Liste d'espèces de microorganismes pour lesquelles une enzyme nitroréductase a été décrite. ....	88
Tableau 6 : Exemples de composés « nitro ». ....	94
Tableau 7 : Formules des composés « nitro » dont la réduction peut être suivie directement par mesure d'absorbance. ....	96
Tableau 8 : Liste des souches cliniques d'espèces à Gram négatif fournies par le soucier privé de bioMérieux. ....	111
Tableau 9 : Liste des souches cliniques d'espèces à Gram positif fournies par le soucier privé de bioMérieux. ....	112
Tableau 10 : Liste des souches cliniques d'espèces de levures fournies par le soucier privé de bioMérieux. ....	113
Tableau 11 : Liste des souches utilisées pour les manipulations génétiques. ....	113
Tableau 12 : Liste de souches surproduisant des protéines. Toutes ces souches ont été construites durant ce travail à partir de la souche parentale ECOXL1Blue. ....	115
Tableau 13 : Souches porteuses d'une délétion. Toutes ces souches ont été construites durant ce travail à partir de la souche ECOK12. ....	115
Tableau 14 : Liste des souches obtenues lors de la construction des plasmides de complémentation construits à l'aide du plasmide pACYC177. ....	117
Tableau 15 : Liste des souches complémentées avec les plasmides construits à partir du plasmide pACYC177. ....	117
Tableau 16 : Liste des substrats enzymatiques utilisés. ....	118
Tableau 17 : milieux liquides et solides LB supplémentés en antibiotique. ....	119
Tableau 18 : Liste des plasmides utilisés durant ce travail. ....	119
Tableau 19 : Amorces PCR pour le clonage des gènes d'intérêt dans le vecteur pQE30. ....	120
Tableau 20 : Amorces PCR utilisées pour la construction des mutants dirigés. Le fragment PCR construit à partir de ces amorces contient la cassette de résistance au chloramphénicol encadrée par les séquences FRT ainsi que les séquences homologues aux régions flanquantes du gène cible (séquences en noir). L'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol encadrée par les séquences FRT est obtenue à partir du plasmide pKD3 (séquence en rouge), cible de la PCR. Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite). ....	122
Tableau 21 : Amorces PCR utilisées pour vérifier les mutants de délétion. Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite). ....	122
Tableau 22 : Amorces PCR pour le clonage des gènes d'intérêt dans le vecteur pACYC177. ....	124
Tableau 23 : Amorces PCR utilisées pour la reverse transcription de l'ARNm de azoR. ....	124
Tableau 24 : Taille théoriques des sous-unités des protéines purifiées lors de la thèse. ....	138



Tableau 25 : Cartes Vitek®2 utilisées pour l'identification et l'antibiogramme des souches de microorganismes testés. ....	156
Tableau 26 : Caractéristiques optiques des substrats testés. ....	162
Tableau 27 : Résultats des tests de réduction de 9 substrats par 10 espèces microbiennes, chacune représentée par 10 souches. ....	162
Tableau 28 : Récapitulatif des souches ayant un profil de réduction différent de la majorité des souches pour une même espèce. ....	164
Tableau 29 : Sélection des souches pour une étude approfondie des activités réductases. ....	170
Tableau 30 : Pourcentage de flavine éliminée par la méthode de purification en conditions dénaturantes. ....	198
Tableau 31 : Influence de peptides sur la réduction du substrat 7NCCA par les enzymes EF0404 et EF0655 purifiées en conditions dénaturantes. ....	202
Tableau 32: Synthèse des caractéristiques biochimiques déterminées qualitativement des enzymes purifiées au cours de l'étude. ....	206
Tableau 33 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH. ....	222
Tableau 34 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADPH. ....	222
Tableau 35 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH ou du cofacteur NADPH. ....	224
Tableau 36 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur dépendance vis-à-vis du NADPH en présence du MR. ....	226
Tableau 37 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur dépendance vis-à-vis du NADH en présence du MR. ....	226
Tableau 38 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis des cofacteurs NAD(P)H en présence MR. ....	226
Tableau 39 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR , NfsA et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis du 7NCCA en présence des cofacteurs NADH ou NADPH. ....	228
Tableau 40 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR , NfsA et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis du NADH ou NADPH en présence du substrat 7NCCA. ....	230



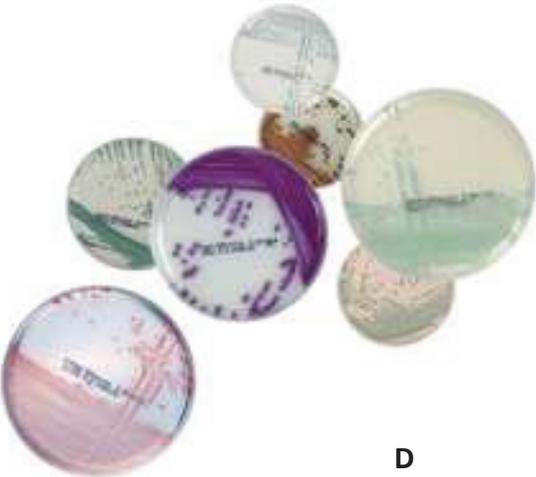
# INTRODUCTION

# GENERALE

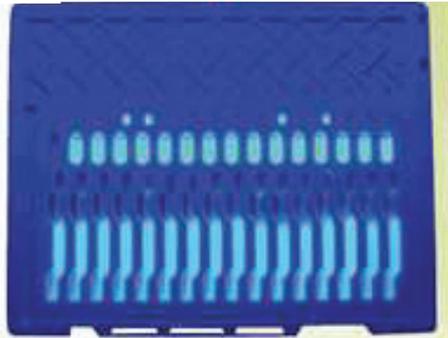
A



B



C



D

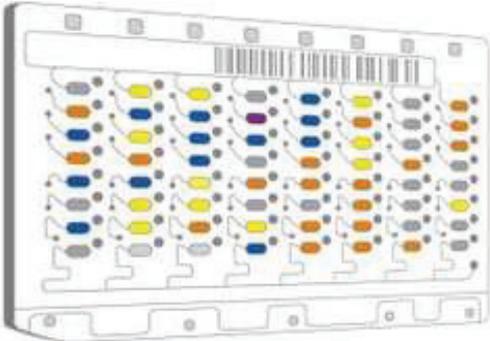


Figure 1 : Tests diagnostics commercialisés par bioMérieux pour la détection, l'identification et l'antibiogramme des microorganismes. A) galerie API®, B) géloses ChromID®, C) TEMPO® et D) Vitek2®

BioMérieux est une société de diagnostic *in vitro* leader mondial dans le domaine de la microbiologie depuis plus de 45 ans. La société est intégrée au groupe de l'Institut Mérieux qui regroupe également les sociétés Mérieux nutriscience, Transgene et ABL. BioMérieux est présent dans plus de 160 pays et possède un large réseau de distributeur. La Recherche et le développement sont principalement situés sur les sites français de Marcy l'étoile (Immuno-essais & Systèmes), La Balme les Grottes (Microbiologie & Systèmes) et Grenoble (Biologie moléculaire & Systèmes) ainsi que sur le site américain de Durham (Microbiologie) et Saint-Louis (Microbiologie & Systèmes) et sur le site italien de Florence (Systèmes).

Les principaux défis du diagnostic sont de trouver de nouvelles solutions plus rapides et fiables pouvant permettre une adaptation du traitement le plus tôt possible. En microbiologie, cela va se traduire par le développement de produits permettant une détection et une identification avec une forte spécificité et une bonne sensibilité diminuant le risque de faux positif vis-à-vis du microorganisme recherché. Cela va également se traduire par la mise au point d'une solution antibiogramme rapide. Les méthodes d'antibiogramme actuelles nécessitent une culture microbienne au préalable ce qui retarde de 24h minimum le rendu des résultats. Dans un souci de rapidité et fiabilité, une solution d'identification en spectrométrie de masse MALDI-TOF a été développée dernièrement sur le site de La Balme les Grottes. Cependant, la plupart des produits disponibles aujourd'hui pour la détection et l'identification sont basés sur la mise en évidence de voies métaboliques spécifiques ou non des microorganismes selon qu'une identification du germe est recherchée ou non. On entend par détection, la mise en évidence de la présence d'un microorganisme dans l'échantillon traité, tandis que par identification, on entend la détermination du genre voire de l'espèce du microorganisme détecté. La mise en évidence de ces voies métaboliques peut se faire tout simplement par l'assimilation d'un substrat qui permet la croissance d'une espèce plutôt qu'une autre ou bien grâce à des substrats chromogènes changeant de couleur et/ou devenant fluorescents une fois métabolisés par le microorganisme ou par modification du milieu de culture (acidification, alcalinisation). Parmi les produits utilisant ce principe et commercialisés par bioMérieux, on peut citer les galeries API, les milieux ChromID, le système Vitek2 ou encore le système TEMPO® (Figure 1).

Sur le site de La Balme les Grottes, une équipe est dédiée à l'étude de nouveaux substrats/voies métaboliques pour la mise au point de nouveaux milieux de



détection/identification. Des collaborations avec des équipes de chimistes des universités de Northumbria et Sunderland permettent l'élaboration de nouveaux substrats potentiellement intéressants pour la détection des microorganismes. Dans ce cadre, de nombreux substrats dont les caractéristiques optiques changent en fonction de leur état d'oxydo-réduction ont été synthétisés. Ainsi, leur réduction par les microorganismes peut être suivie par la variation de l'absorbance et/ou de la fluorescence. Les voies métaboliques responsables de la réduction de ces molécules font potentiellement intervenir des enzymes nommées réductases. Toutefois, les voies métaboliques impliquées sont peu ou mal connues. L'étude de ces voies métaboliques peut permettre de mettre en évidence les étapes clés de la réduction de ces substrats. La connaissance de ces étapes clés permettrait de pouvoir optimiser les tests de détection de microorganismes en apportant les éléments nécessaires à l'optimisation de la réduction des substrats et ainsi à la détection/identification des microorganismes cibles telles que des substances particulières ou des conditions de cultures particulières (température, pH, atmosphère, etc.) .

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté ci-après a été initié dans le but de trouver une solution pour optimiser l'expression des enzymes ayant une activité réductase afin de permettre une détection rapide et fiable des microorganismes. Pour ce faire, l'étude s'est principalement portée sur deux activités réductases : azoréductase et nitroréductase en raison des types de substrats disponibles et de la présence de ces activités enzymatiques chez de nombreux microorganismes. A terme, l'objectif de ce travail est de pouvoir optimiser et étendre l'utilisation de ces activités nitroréductases et azoréductases dans des systèmes de détection et voir d'identification des microorganismes à partir d'un échantillon biologique (clinique ou agroalimentaire) comme le système TEMPO® (206), qui est un système permettant la détection et la numération des microorganismes dans un échantillon alimentaire.

Dans un premier temps, une étude de réduction de plusieurs substrats appartenant aux familles de molécules nitro, « azo » et carbonyle par cinq espèces à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter muytjensii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*), quatre espèces à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* et *Kocuria rosea*) et 2 espèces de levures (*Candida albicans* et *Geotrichum candidum*) a été faite afin d'évaluer la répartition des activités réductase au sein des microorganismes. Dans un second temps, une étude *in vitro*



des enzymes potentiellement impliquées dans la réduction des substrats « nitro » et « azo » a été effectuée. Cette étude a pour but de déterminer les conditions favorables aux activités réductases des enzymes étudiées. En parallèle, une étude *in vivo* des activités nitroréductases et azoréductases a été faite à l'aide de mutants *d'Escherichia coli* délétés pour des gènes codants des enzymes ayant ce type d'activité réductase *in vitro*. Deux espèces bactériennes représentantes de deux grandes classes de bactéries : Gram négatif avec *Escherichia coli* et Gram positif avec *Enterococcus faecalis* ont particulièrement été étudiées.



REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

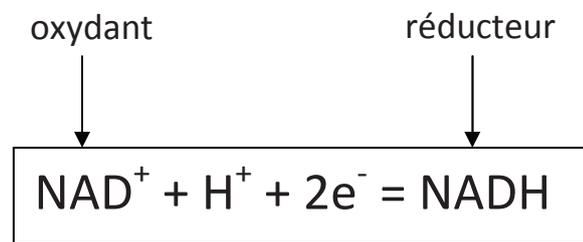


Figure 2 : Exemple de réaction d'oxydo-réduction avec le couple rédox NADH/NAD<sup>+</sup>

## I. L'oxydo-réduction

L'oxydo-réduction consiste en le transfert d'électron(s) entre une molécule donneuse d'électron(s) (réducteur) et une molécule acceptrice d'électron(s) (oxydant) (Figure 2). Une molécule est oxydée lorsqu'elle perd ses électrons alors qu'elle est réduite lorsqu'elle capte des électrons. Un oxydant est toujours lié à un réducteur par le terme couple redox. Ces réactions chimiques sont largement présentes dans le monde vivant et sont catalysées par des enzymes nommées de manière générique : oxydo-réductases.

## II. Les activités oxydo-réductases dans le monde microbien

Les oxydo-réductases sont diverses et variées chez les microorganismes. Elles sont généralement nommées en fonction du substrat qu'elles vont préférentiellement oxyder ou réduire (par exemple glucuronate réductase, UDP-glucose-6-deshydrogénase, lactate deshydrogénase, 2-enoate réductase). Les enzymes sont répertoriées selon une classification numérique EC (Enzyme Commission) basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Dans cette classification, les oxydo-réductases sont regroupées sous le chiffre 1, c'est-à-dire que tous les numéros EC d'oxydo-réductases commencent par 1 (exemple : glucuronate réductase EC 1.1.1.19 ; UDP-glucose-6-deshydrogénase EC 1.1.1.22). Selon cette classification, il existe près de 22 groupes d'oxydo-réductases (EC 1.1 à EC 1.22). Ces groupes correspondent aux types de substrats ciblés par l'enzyme (par exemple, les enzymes du groupe 1 agissent sur les groupement donneurs d'électrons CH-OH alors que les enzymes du groupe 2 agissent sur les fonctions aldehydes (COH) et oxo (CO). Ces groupes sont eux-même partagés en sous-groupe en fonction de la molécule acceptrice d'électron(s) (par exemple les enzymes du groupes EC 1.1.1 agissent sur le groupe CH-OH de donneurs avec  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  comme accepteur alors que pour les enzymes du groupe 1.1.2 l'accepteur est un cytochrome). Le quatrième numéro correspond au substrat pris en charge par l'enzyme. Par exemple les enzymes 1.1.1.19 catalysent la réduction du glucuronate tandis que les enzymes 1.1.1.20 catalysent la réduction du glucuronolactone. Ainsi, des enzymes provenant de différents organismes et catalysant la même réaction reçoivent le même code EC. Cette classification permet de mettre en évidence la diversité existante en terme d'oxydo-réductase.

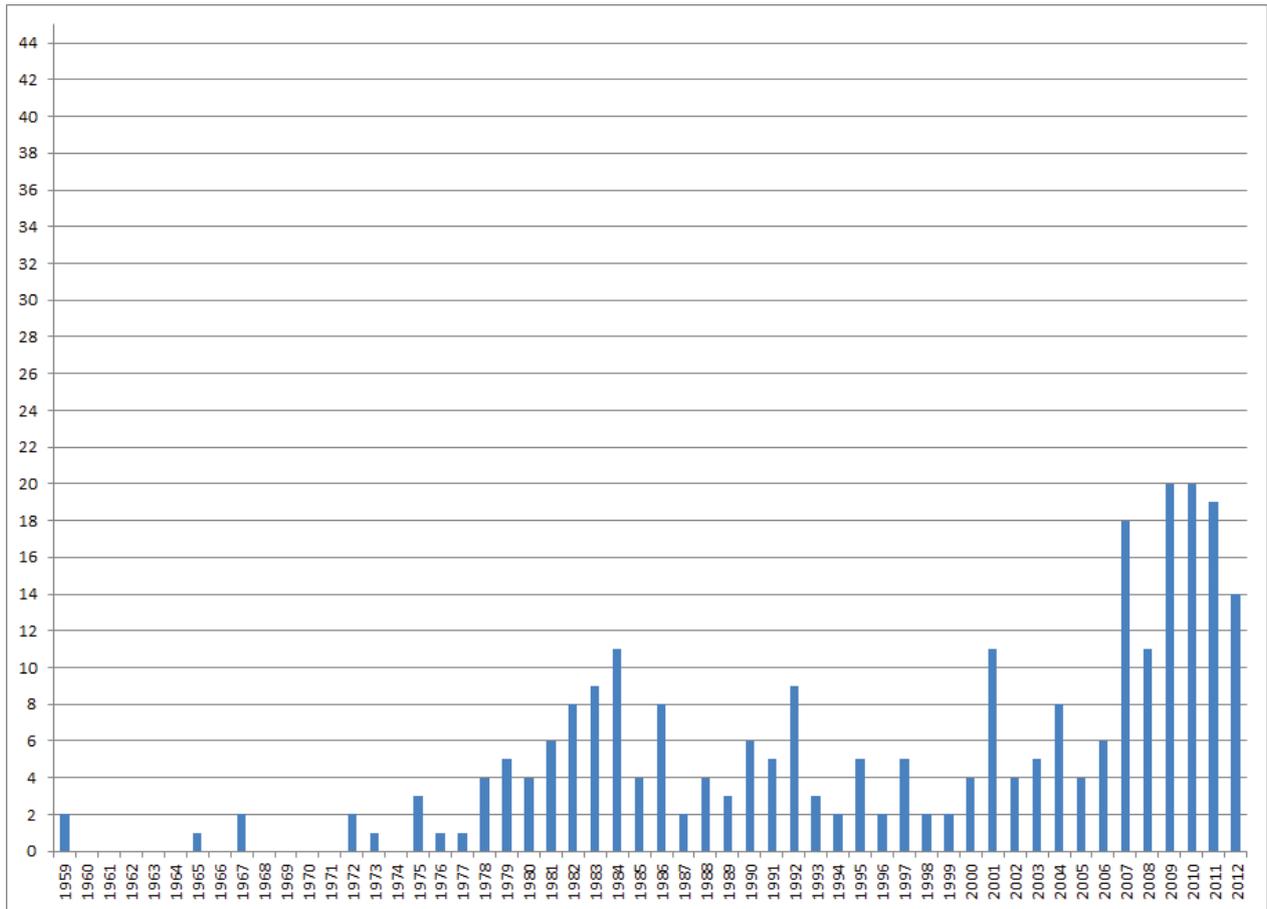


Figure 3 : Nombre de publications référencées dans la banque de données du NCBI par an depuis 1959 jusqu'à nos jours sous les mots clés « azoreductase » et « azoreduction ».

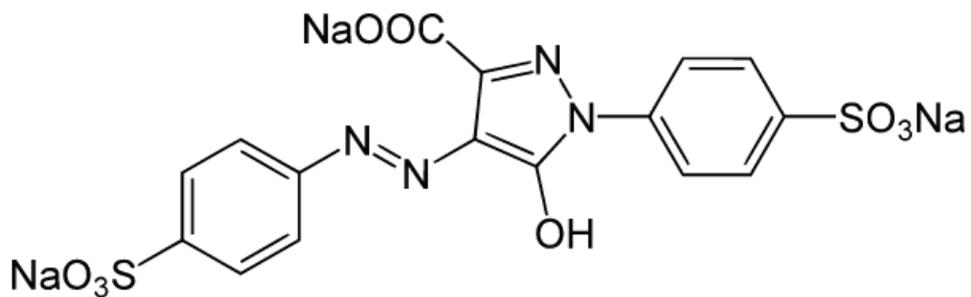


Figure 4 : Formule chimique de la tartrazine, colorant « azo » utilisé comme colorant alimentaire (nommé yellow 5 aux USA, E102 en Europe et CI 19140 dans des produits cosmétiques).

### III. L'activité azoréductase

L'activité azoréductase est étudiée depuis longtemps. Cependant, ces dernières années, ce domaine de la recherche a pris un nouvel essor. En ne prenant en compte que les données disponibles par le centre national de l'information des biotechnologies (NCBI), le nombre de publications par an concernant l'azoréduction et les azoréductases a doublé ces 6 dernières années (Figure 3). Cette augmentation peut s'expliquer par les politiques écologiques mondiales actuelles concernant la dépollution de l'environnement. En effet, ces activités enzymatiques sont essentiellement étudiées dans le cadre du traitement des eaux usées issues des industries utilisant les colorants de type « azo » (appelés également colorants azoïques) dans leur processus de fabrication comme l'industrie textile par exemple. Ainsi, l'étude des mécanismes de réduction de ces composés par les microorganismes a un intérêt économique et écologique.

#### III.1. Les composés « azo » et leur réduction

La fonction « azo » décrit une double liaison entre deux atomes d'azote ( $-N=N-$ ). Sa réduction conduit à la formation d'amines ( $-NH_2$ ). Les molécules « azo » aromatiques sont principalement synthétisées pour être utilisées comme colorant dans les usines textiles, agroalimentaires ou encore cosmétiques (Figure 4). Une fois réduit au niveau de la fonction « azo », beaucoup de ces colorants ont la particularité de devenir incolore. Cette décoloration est utilisée pour suivre la réduction de la molécule par mesure de l'absorbance. La dégradation de ces molécules peut poser des problèmes de toxicité et de mutagénicité, notamment par la formation d'amines aromatiques (Tableau 1).

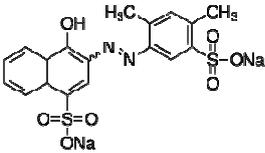
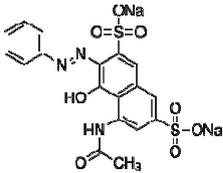
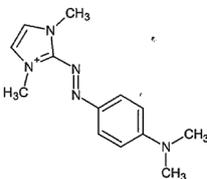
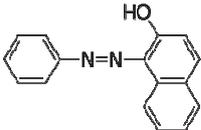
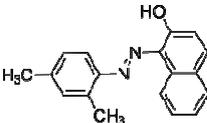
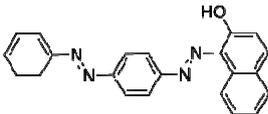
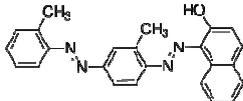
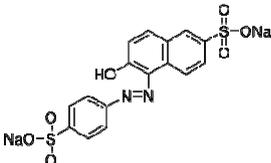
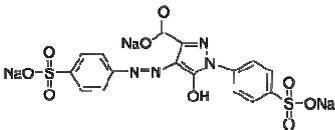
Les composés « azo » peuvent être obtenus de différentes façons. La voie synthétique la plus courante est le couplage « azo ». Cette réaction consiste en une substitution électrophile aromatique (nucléophile) telle que les dérivés du phénol ou de l'aniline. Pour des raisons de mésomérie, le couplage a lieu en position para ou ortho lorsque la position para est occupée. Cette méthode est très employée au niveau de l'industrie des colorants (189). Les composés « azo » symétriques (exemples bleu trypan et Direct blue 6 dans le Tableau 1) peuvent également être synthétisés par condensation des dérivés du nitrobenzène en milieu fortement alcalin et en présence de glucose comme agent réducteur (60). Il est aussi possible d'obtenir des composés « azo » par deshydrogénation d'une

	Composés « azo »	Produits de réduction	Références
<b>Amaranth</b> (520 nm)		naphtalène sulfamide, hydroxynaphtalène diazonium et naphtalène diazonium	57, 166
<b>Bleu Trypan</b> (597 nm)		O-tolidine	7, 40
<b>Direct Black 38</b> (550 nm)		benzidine	11, 40
<b>Direct Blue 6</b>		benzidine	40
<b>Flame Orange</b> (486 nm)		1,4-benzenediamine et 2-amino-1,3 dimethylimidazolium	145
<b>Methyl orange</b> (507 nm)		4-amino- dimethylaniline	40, 166
<b>Methyl red</b> (430 nm)		acide anthranilique (1- amino-2-naphtol) et 4- amino-dimethylaniline	31
<b>Orange I</b> (475 nm)		acide sulphanilique et 1-aminonaphtol	62
<b>Orange II</b> (483 nm)		acide sulphanilique et 1-amino-2-naphtol	40, 166
<b>Para red</b>		1-amino-2-naphtol et 4- nitroaniline	193, 194
<b>Ponceau 3R</b> (504 nm)		2,4,5-trimethylaniline	40, 68

Tableau 1 : Exemples de composés « azo » et leur produits de réduction associée.

La longueur d'onde d'absorption maximale du composé « azo » est indiqué entre parenthèse lorsqu'il est connu. Les couleurs associées au nom des molécules correspondent aux couleurs des molécules en solution dans l'eau.

Tableau 1 : suite

Composés « azo »	Produits de réduction	Références
<b>Ponceau SX</b> <b>(500 nm)</b> 	Dimethylaniline	40, 166
<b>Red 2G</b> 	Aniline	40
<b>Ruby red</b> <b>(526 nm)</b> 	N-1-,N-1-dimethyl-1,4-benzenediamine et 2-amino-1,3-dimethylimidazolium	145
<b>Sudan I</b> <b>(500 nm)</b> 	1-amino-2-naphtol et aniline	33, 194
<b>Sudan II</b> <b>(500 nm)</b> 	1-amino-2-naphtol et 2,4-dimethylaniline	33, 194
<b>Sudan III</b> <b>(507 et 354 nm)</b> 	1-amino-2-naphtol, 1,4-phenylenediamine et aniline	166, 194
<b>Sudan IV</b> <b>(520 et 357 nm)</b> 	1-amino-2-naphtol, 2,5-diaminotoluene et o-toluidine	166, 194
<b>Sunset Yellow</b> <b>(480 nm)</b> 	acide sulphanilique	40, 166
<b>Tartrazine</b> <b>(425 nm)</b> 	acide sulphanilique	40, 166



hydrazine substituée sur une alumine basique ou dopée au fluorure de potassium (KF). Cette méthode est dite « verte » parce qu'elle ne fait pas intervenir de solvants organiques (124).

La couleur vivace des colorants « azo » est dûe à la forte délocalisation des électrons  $\pi$  (Tableau 1). Cette coloration est le principal intérêt de ces molécules. En dehors de leur synthèse et utilisation pour la teinture industrielle, ces molécules n'ont pas de rôles biologiques connus. D'ailleurs, il n'existe pas de composés « azo » naturels d'après mes recherches dans la littérature. De ce fait, il est d'autant plus surprenant que les microorganismes soient capables de les métaboliser.

### **III.2. Réduction des composés « azo » par les microorganismes**

De nombreuses espèces capables de dégrader les composés contenant une fonction « azo » ont été décrites. Parmi elles, des espèces mammifères telles que les rats (109) les cochons d'inde, les lapins ou les hamsters (160) ont pu être identifiées. L'Homme a également potentiellement des enzymes à activité azoréductase puisque ces protéines se retrouvent au niveau des microsomes hépatiques chez le rat. Par exemple, l'enzyme diaphorase DT (EC 1.6.99.2) du rat décrite comme quinone réductase (EC 1.6.99.2) a une activité azoréductase (74) ce qui peut laisser penser que l'enzyme diaphorase DT humaine a également cette activité, mais ceci n'a pas été montré. Cependant, l'activité azoréductase est essentiellement décrite chez les microorganismes.

#### **III.2.1. Les microorganismes eucaryotes (levures/champignons)**

La dégradation des composés azo par des microorganismes eucaryotes, représentés par les levures et les champignons, est faite par différentes enzymes telles que les lignines peroxidases, les manganese peroxidases (MnP), les laccases ou en encore les tyrosinases (173). Par exemple, 200 U.L<sup>-1</sup> de MnP de *Bjerkandera sp.* BOS55 sont capables de dégrader 90% d'Orange II à 100 mg.L<sup>-1</sup> en 10 minutes en association avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apporté de manière continue avec un débit de 50  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> (123). La dégradation de l'Orange II est due alors à une oxydation du composé. Les MnP et laccases réagissent préférentiellement avec les colorants «azo» comprenant un substituant phénolique en position para par rapport au pont «azo» ainsi qu'un substituant méthyle ou méthoxy en position 2 ou 2,6 (diméthyle ou diméthoxy) par rapport au groupement hydroxyle pasti (37,141,173).

Espèces	Enzymes décrites	Références
<i>Alishewanella sp.</i>	NC	92,93
<i>Enterobacter agglomerans</i>	NC	130
<i>Escherichia coli</i>	AzoR	9, 53, 58, 77, 78, 80, 86, 88, 101, 102, 105, 115, 132, 158
<i>Pigmentiphaga kullae</i>	AzoB	19,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PaAzoR1	164, 165, 172, 186, 187, 187
<i>Pseudomonas cepacia</i>	NC	75
<i>Pseudomonas luteola</i>	NC	28, 29, 72
<i>Pseudomonas putida</i>	PpazoR	14, 42, 111, 119, 120
<i>Proteus mirabilis</i>	NC	136
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AZR	15, 102, 104, 170, 188
<i>Shewanella aquimarina</i>	NC	121
<i>Shewanella oneidensis</i>	NC	83, 131, 178, 196
<i>Shigella dysenteriae</i>	Azoréductase I et II	59
<i>Shigella flexneri</i>	ArsH	185
<i>Xenophilus azovorans</i>	AzoB	18,22
<i>Bacillus cereus</i>	ND	69,84,145
<i>Bacillus lentus</i>	ND	139
<i>Bacillus subtilis</i>	azoréductase	35, 36, 47, 97, 133, 175, 180
<i>Bacillus sp. B29</i>	AzrB, AzrC	135,137
<i>Bacillus sp. OY1-2</i>	azoréductase	176
<i>Bacillus velezensis</i>	NC	10
<i>Clostridium perfringens</i>	AzoC	41, 114, 128, 149, 154, 162
<i>Enterococcus faecalis</i>	AzoA	9, 32, 34, 53, 54, 61, 106, 147
<i>Enterococcus faecium</i>	AzoEf1	108
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	AzrG	113, 175
<i>Kocuria rosea</i>	NC	140
<i>Lactobacillus casei</i>	NC	168
<i>Staphylococcus aureus</i>	Azo1	31

**Tableau 2 : Liste d'espèces pour lesquelles une activité azoréductase a été décrite.**

La première moitié du tableau regroupe les bactéries à Gram négatif (rose). La deuxième moitié du tableau regroupe les bactéries à Gram positif (violet). NC signifie que la ou les enzymes n'ont pas été caractérisées. Cette observation indique que l'activité azoréductase a été décrite pour l'espèce mais que l'enzyme responsable de cette activité n'a pas encore été identifiée. Parfois des enzymes ont été décrites mais aucun nom spécifique ne leur a été attribué. Dans ces cas-là, le terme azoréductase a été utilisé.

Deux mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle des levures et moisissures dans le recyclage des colorants « azo ». Le premier repose sur la biosorption et le deuxième sur la biodégradation. La biosorption consiste en la concentration et le stockage des composés toxiques au sein de la cellule (13). A ma connaissance, le mécanisme et le site cellulaire de stockage n'ont pas été décrits pour les colorants « azo ». La biodégradation est définie comme la dégradation de composés chimiques par un procédé biologique, celle-ci peut être qualifiée de complète lorsque la molécule chimique est totalement dégradée en molécules organiques telles que H<sub>2</sub>O ou CO<sub>2</sub> ainsi qu'en produit final inorganique quelconque. Ce phénomène est alors appelé minéralisation (4).

En plus des enzymes décrites ci-dessus, d'autres protéines impliquées dans la dégradation des composés « azo » ont été décrites. Par exemple, chez *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), le système de réductase ferrique participe à la réduction extracellulaire des colorants « azo » par l'intermédiaire de la protéine Fre1p, composante majeure de l'activité azoréductase (157). Par ailleurs, une étude a montré que l'espèce de levure *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) possède une peroxydase (Dyp) impliquée dans la décoloration des colorants « azo » et anthraquinone (89). Toutes ces études montrent que la dégradation des composés « azo » par les microorganismes eucaryotes peut être complexe et faire intervenir différents mécanismes en fonction des espèces. Cependant, les mécanismes de recyclage des composés « azo » par les microorganismes eucaryotes n'ont pas été décrits. Si la voie de biosorption existe, sa mise en évidence et son importance dans le recyclage de colorants « azo » dépendrait également des facteurs favorisant cette biosorption par rapport à la biodégradation ou inversement.

### III.2.2. Microorganismes procaryotes

L'activité azoréductase est largement présente chez les microorganismes procaryotes (Tableau 2). Le tableau 2 répertorie les espèces pour lesquelles l'activité azoréductase a été étudiée spécifiquement. Toutefois, l'activité azoréductase a également été étudiée sur des ensembles microbiens telle que la flore intestinale de l'Homme montrant ainsi que plusieurs espèces de cette flore, tels que *Bacillus sp*, *Citrobacter sp*, *Clostridium clostridiiforme*, *Lactobacille sp* et *Proteus vulgaris*, sont capables de dégrader des composés « azo » (40,152,190,193).

Espèces	Protéines	Caractéristiques	Cofacteurs	Nombre d'acides aminés	Références
<i>E. coli</i>	AzoR	homodimère	FMN, NADH	201	132
<i>X. azovorans</i>	AzoB	monomère	NAD(P)H	286	18
<i>P. aeruginosa</i>	paAzpR1	homotétramère	FMN, NAD(P)H	202	186
<i>P. kullae</i>	AzoB	monomère	NAD(P)H	203	30
<i>Bacillus sp</i>	AzrA, AzrB, AzrC	homodimère	NADPH	208	113, 137, 176
<i>E. faecalis</i>	AzoA	homodimère	FMN, NADH	208	32, 147
<i>S. aureus</i>	Azo1	Homotétramère	FMN, NADPH	188	31
<i>E. faecium</i>	AzoEf1	ND	FMN, NAD(P)H	188	108
<i>G. stearothermophilus</i>	AzrG	homodimère	FMN, NADH	174	113

Tableau 3 : Liste de protéines ayant une activité azoréductase décrites dans la littérature.

La première moitié du tableau regroupe les bactéries à Gram négatif (rose). La deuxième moitié du tableau regroupe les bactéries à Gram positif (violet). ND signifie Non Déterminé..

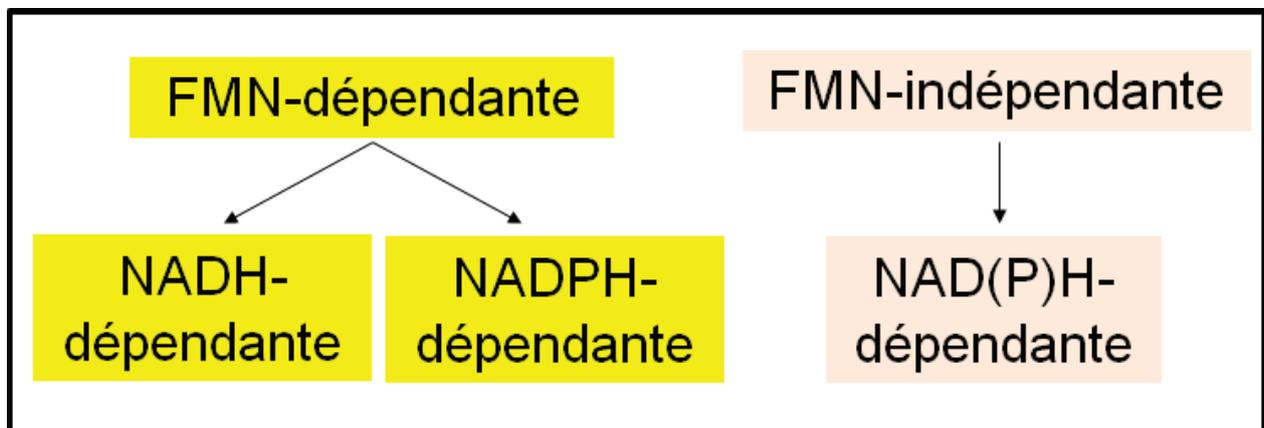


Figure 5 : Classification des enzymes azoréductases selon leurs besoins en cofacteur.

La vitesse de réduction des composés « azo » par les microorganismes est dépendante de l'espèce et de la molécule. En effet, dans le cas d'un inoculum de départ correspondant à une culture en phase stationnaire diluée au 1/10 de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), une réduction de 80% du Methyl red à 200 µM en 1 h et 100% en 3 h a pu être observée alors que seulement 56% d'Orange I à 200 µM était réduit en 20h d'incubation (31).

La plupart des colorants « azo » sont réduits par des microorganismes uniquement en présence d'autres sources de carbone qui permettent d'assurer leur multiplication. Ceci indique que les bactéries ne sont probablement pas capables d'utiliser les molécules « azo » comme seule source de carbone et/ou d'énergie (173). Toutefois, un cas d'utilisation d'une molécule « azo » comme seule source de carbone et d'énergie a été montrée avec une souche de *Hydrogenophaga palleronii* provenant d'une souche de la même espèce s'étant adapté à un milieu contenant le composé 4-carboxy-4'-sulfoazobenzène comme unique source de carbone (207).

### III.3. Description des azoréductases

#### III.3.1. Les différentes familles d'azoréductases

Les azoréductases des microorganismes sont des enzymes d'environ 200 acides aminés classées sous le code EC 1.7.1.6. Ce sont des enzymes capables de réduire une fonction « azo » d'une molécule pour produire deux composés aminés :



Ces protéines sont très souvent sous formes dimériques, mais il existe des formes monomériques comme AzoB de *Xenophilus azovorans* (*X. azovorans*) (18), ainsi que des formes tétramériques comme Azo1 de *S. aureus* (31) (Tableau 3). Ces enzymes sont réparties en 2 grandes familles : les enzymes indépendantes de la flavine (FMN) (18,19) et les enzymes dépendantes de la flavine. Parmi ces dernières, on peut distinguer les enzymes dépendantes du cofacteur NADH (32,132) et celles dépendantes du cofacteur NADPH (31) (Figure 5). Les sites de fixation de NAD(P)H sont généralement des zones riches en glycine. La gamme de substrats réductibles par une espèce bactérienne est due à la spécificité de l'enzyme azoréductase. Ceci signifie qu'une enzyme azoréductase n'est pas forcément capable de réduire tous les composés « azo » et que 2 azoréductases d'une même espèce peuvent avoir des préférences de substrats différentes. Par exemple, l'azoréductase AzrG de *Geobacillus*

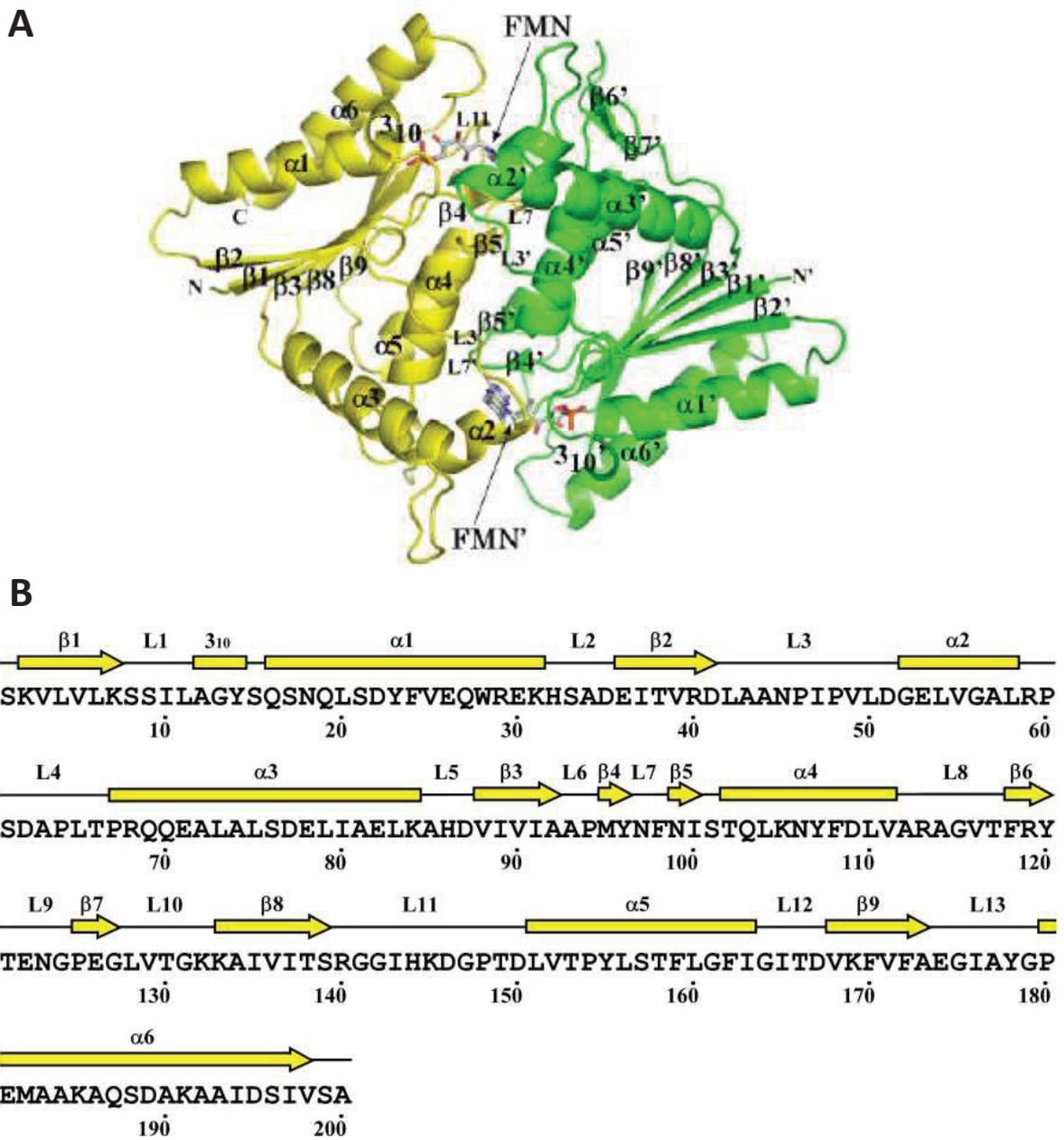


Figure 6 : Azoréductase AzoR d'*E. coli*.

A) Structure tridimensionnelle de la protéine homodimérique AzoR avec le groupement prosthétique FMN. B) Séquence peptidique de la protéine AzoR avec l'identification des régions en hélice  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$ . (78,187,187)

*stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*) est capable de dégrader rapidement l'ethyl red mais très difficilement l'Orange I et l'Orange II à 30°C. La spécificité de cette enzyme peut être modifiée par la température qui induit un changement de conformation. En augmentant la température à 60°C voire même à 85°C l'enzyme AzrG devient capable de réduire l'Orange I et l'Orange II (113). A la différence de *G. stearothermophilus*, l'espèce *P. aeruginosa* possède deux enzymes azoréductases dont une est spécifique de l'Orange I et l'autre spécifique de l'Orange II. Ces 2 enzymes sont fonctionnelles à 30°C sur leur substrat respectif (204,205).

### III.3.2. Stratégies d'identification des azoréductases

Lors de l'étude de l'activité azoréductase de *Bacillus sp.* OY1-2, Suzuki et collaborateurs ont purifié une protéine ayant l'activité azoréductase (176). Afin d'identifier cette protéine, la séquence d'acide aminée du côté N-terminal a été déterminée par un séquençage selon la méthode d'Edman. Aucune homologie significative n'a alors été trouvée entre la séquence peptidique obtenue et les séquences peptidiques contenues dans les bases de données. Cette protéine ayant l'activité azoréductase n'avait donc jamais été étudiée. Ainsi, à partir d'amorces PCR définies sur la base de la séquence N-terminale de la protéine purifiée, le premier gène codant une azoréductase a pu être identifié et cloné. Suite à ce clonage, une protéine homologue à 52,8% chez l'espèce *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), dont la fonction était inconnue, a été identifiée (Genbank accession n° : Y14079) ainsi que le motif de liaison du NADH (GXGXXG) par comparaison avec la séquence protéique d'autres enzymes NADH-dépendantes (176). Dans de nombreux cas, on constate que les azoréductases sont des protéines qui ont été identifiées au préalable comme des protéines acyl-carrier phosphodiesterases (AcpD) (EC 3.1.4.14 : hydrolase agissant sur les ponts phosphodiester). Par exemple, la séquence peptidique d'AzoR, azoréductase d'*E. coli*, a tout d'abord été annotée AcpD. Cette enzyme convertit l'holoprotéine acyl carrier Acp en apoAcp en catalysant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester entre la sérine 36 de Acp et le groupement prosthétique 4'-phosphopanthéine. Le rôle physiologique de l'enzyme AcpD n'a pas tout de suite été identifié (55). Ce n'est qu'en 2001 qu'une équipe a mis en évidence l'activité azoréductase de cette protéine AcpD (132), ce qui ne répond pas à la question du rôle physiologique de cette enzyme mais contribue à sa caractérisation. La caractérisation



d'AzoR d'*E. coli* se poursuit, avec notamment des études de cristallographie qui ont révélé la responsabilité de la tyrosine 120 (feuillet  $\beta$ 6) et de la phenylalanine 162 (hélice  $\alpha$ 5) dans la liaison au NADH (Figure 6) (79).

### III.3.3. Les azoréductases ne sont pas uniques au sein des génomes

Plusieurs copies de gènes homologues codant potentiellement des azoréductases sur des loci individuels au sein du génome de différentes espèces peuvent être présentes. Par exemple, chez *Bacillus sp.* les gènes *AzrA* (Genbank accession n°AB263756) (138), *AzrB* (Genbank accession n°AB471797) et *AzrC* (Genbank accession n°AB471798) (137) ont été identifiés. Toutes ces protéines présentent une homologie significative avec les azoréductases connues chez *E. coli* et *E. faecalis* (137). Parmi les multiples copies de gènes codants des azoréductases chez une même espèce, différentes spécificités de substrats ont été mises en évidence pour chaque enzyme. Par exemple, chez *P. aeruginosa* il existe au moins 3 protéines homologues à des azoréductases (186). Parmi elles, il existe une azoréductase spécifique de l'Orange I et une azoréductase spécifique de l'Orange II. Même si les enzymes pures présentent des homologies fortes, une étude immunologique n'a montré aucune réaction croisée entre les anticorps spécifiques de l'azoréductase spécifique de l'Orange I et l'azoréductase spécifique de l'Orange II. De plus, l'azoréductase spécifique de l'Orange I est synthétisée de façon constitutive alors que celle spécifique de l'Orange II est induite par diverses molécules « azo » (204,205). Cependant, les mécanismes d'induction ne sont pas connus à ce jour. L'expression de ces deux protéines chez *P. aeruginosa* est donc soumise à deux voies de régulation différentes. Ainsi, au sein d'une même espèce bactérienne il peut y avoir différentes voies métaboliques indépendantes liées à l'activité azoréductase.

### III.3.4. Les autres activités des protéines azoréductases

Les composés quinones sont importants pour la compréhension des mécanismes et des rôles des azoréductases. Ce sont des composés électrophiles comme les composés « azo ». Ces molécules sont caractérisées par 2 groupes carbonyles sur un noyau phénolique et font partie d'une importante classe de composés naturels ubiquitaires incluant plusieurs coenzymes biologiques importants (ubiquinone) et vitamines (vitamine K, vitamine E) (46). Les oxydo-réductases impliquées dans la réduction des composés quinone sont appelés

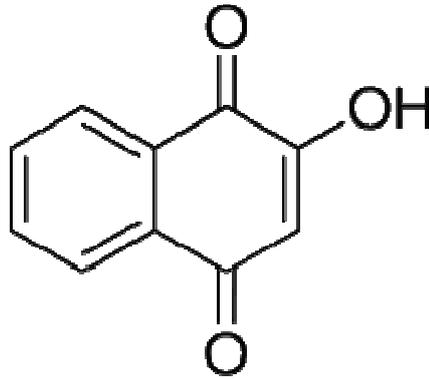


Figure 7 : Formule chimique du composé quinone Lawsone.

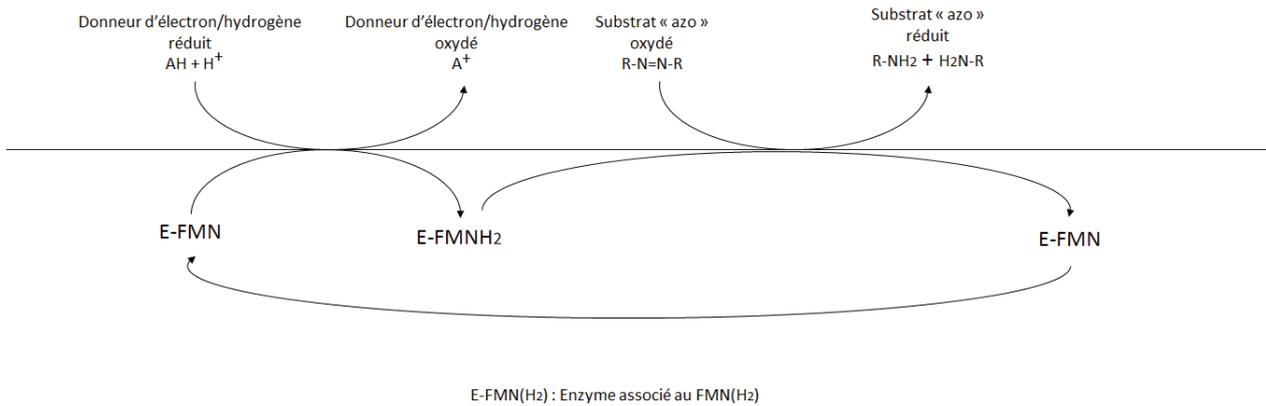


Figure 8 : Schéma d'une réaction de réduction d'un composé "azo" par le mécanisme enzymatique ping-pong.

quinone réductases (NAD(P)H dépendantes) (179,195). Les quinones sont réduites en composés quinols, lesquels peuvent être impliqués dans la réponse au stress oxydatif (46). Il a été montré que la protéine AZR codée par le gène *azr* de *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*) possède une activité quinone réductase en plus de ses activités azo- et nitroréductase. Lorsque la souche JM109 d'*E. coli* est transformée avec le plasmide recombinant contenant le gène *azr*, une augmentation de la survie de la bactérie est constatée en cas de stress oxydatif (101). De plus, la même équipe a montré qu'une souche d'*E. coli* recombinante, surexprimant le gène *azr*, est capable de réduire 75% de la quantité d'Acid Red 27 disponible (1mM) en seulement 2 h avec un inoculum préparé à partir de cellules récupérées à DO<sub>600nm</sub> 0,6. Cette réduction est possible uniquement en présence du composé quinone Lawsone (Figure 7) (105).

Une étude d'alignement de séquences peptidiques de quinone réductases avec la protéine AzoR d'*E. coli* a montré une forte similarité au niveau du milieu de la séquence, de la proline 95 à la glycine 148 d'AzoR. Les résidus tyrosine 96, asparagine 97, phenylalanine 98, glycine 141 et glycine 142, qui sont impliqués dans la liaison de FMN, sont relativement conservés parmi les quinone réductases (ChR de *Pseudomonas putida* (*P. putida*), WrbA d'*E. coli*, NQO1 d'*Homo sapiens* (*H. sapiens*), Lot6p de *S. cerevisiae*, YvB de *B. subtilis* et AZR de *R. sphaeroides*)(105).

Certaines azoréductases peuvent également avoir une activité enzymatique sur des composés indigoids. L'exemple d'une azoréductase de *B. subtilis* capable de réduire aussi bien des composés « azo » tels que le Flame Orange et le Ruby red que des composés indigoid comme l'indigo carmine peut être cité (145). Ainsi, les enzymes ayant une activité azoréductase ont souvent d'autres activités enzymatiques. D'ailleurs, il est probable que, d'un point de vue évolution, ce soit plutôt des enzymes ayant des activités nitroréductase, quinone réductase ou autre activité réductase à l'origine qui au cours de l'évolution ont acquis la capacité de réduire les composés « azo » puisque peu de composés « azo » existent dans la nature. Actuellement, les principaux substrats « azo » utilisés dans les études sont synthétiques.

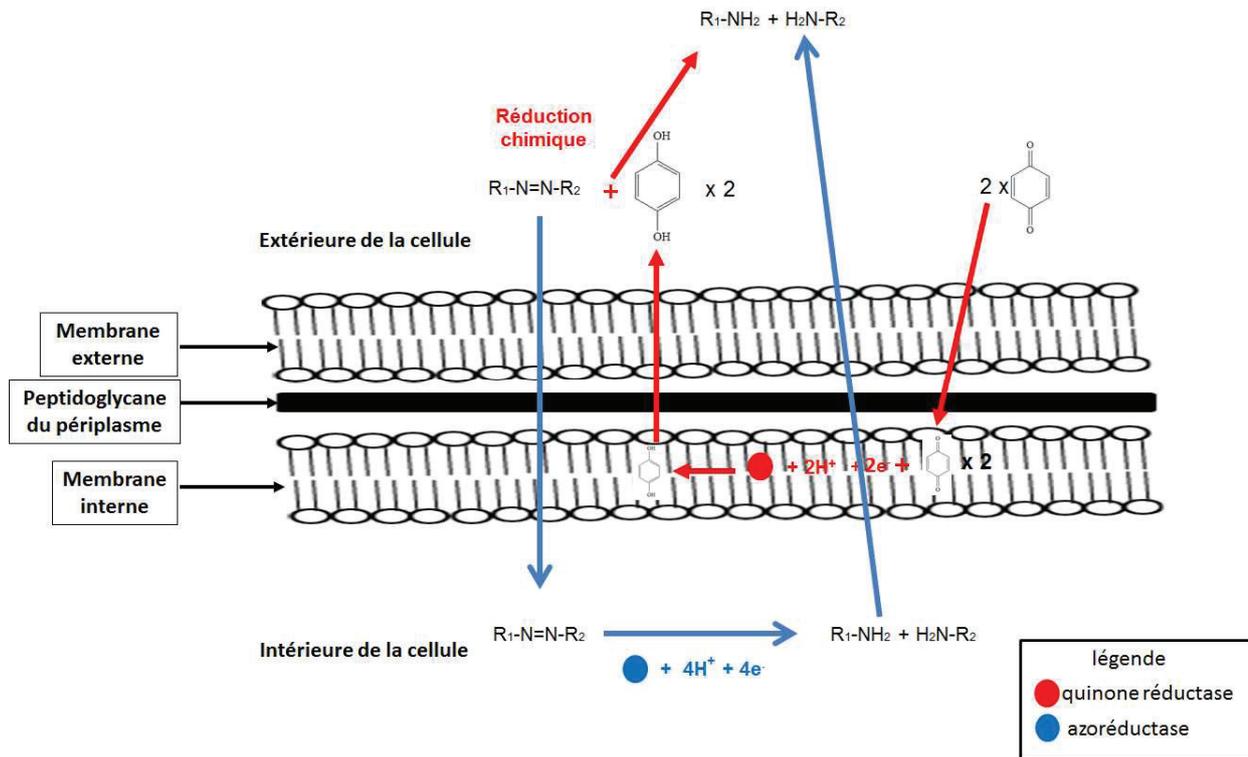


Figure 9: Mécanismes de réduction des composés "azo" par les microorganismes suggérés par la littérature.

En aérobie (flèches bleues), les composés « azo » sont spécifiquement réduits par les enzymes azoréductases. En anaérobie (flèches rouges), les composés « azo » sont réduits chimiquement par des hydroquinones issues de la réduction des quinones par les quinones réductases. L'enveloppe cellulaire représentée correspond à l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif mais les mécanismes sont les mêmes pour les bactéries à Gram positif (158).

### III.1. Mécanismes de réduction proposés

La réaction enzymatique de réduction des composés « azo » par les azoréductases met en œuvre une réaction ping-pong, appelé ainsi car le coenzyme flavine (FMN ou FAD) est régénéré en fin de réaction (Figure 8). La caractérisation biochimique des azoréductases a conduit à une classification prenant en compte les dépendances en cofacteurs. Toutefois, les différences observées dans les réactions d'azoréduction en fonction de l'apport en oxygène a permis de suggérer 2 voies métaboliques d'azoréduction : une voie spécifique, privilégiée en condition d'aérobie et une voie non spécifique privilégiée en condition d'anaérobie (Figure 9) (85,94). Ces 2 mécanismes n'ont cependant pas été réellement démontrés à ce jour.

#### III.1.1. Voie spécifique privilégiée en aérobie

Le rôle des enzymes azoréductases serait prédominant dans la voie spécifique. Une fois le composé entré dans la cellule, une azoréductase prendrait directement en charge sa réduction en supposant que l'azoréductase se situe dans le cytoplasme (Figure 9) (85). Cette voie spécifique implique que la molécule et l'enzyme azoréductase soit au même endroit. Ceci amène la question de la localisation cellulaire de l'enzyme azoréductase. Des essais de réduction des composés « azo » sulfonés par des extraits cellulaires de *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ont montré de meilleurs résultats que par les cellules entières (118). L'azoréduction d'un substrat par les cellules microbiennes peut donc être limité par le manque de perméabilité des cellules vis-à-vis de certains substrats « azo » tels que les composés « azo » sulfonés hautement polaires, ce qui indique que l'enzyme azoréductase de *B. cereus* serait intracellulaire. Par ailleurs, une étude par microscopie électronique, à l'aide d'anticorps fluorescents anti-azoréductase de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), a montré une localisation cytoplasmique de l'azoréductase sans association particulière à la membrane ou à une autre structure cellulaire, ainsi qu'une sécrétion de l'enzyme (155). D'après ces données, la localisation cellulaire ou extracellulaires des azoréductases n'est pas totalement définie et peut dépendre de l'espèce bactérienne.

#### III.1.2. Voie non spécifique privilégiée en anaérobie

Dans la voie non spécifique, la réduction de la fonction « azo » serait chimique et non



biochimique (i.e. enzymatique). Les quinones réductases sont des enzymes principalement impliquées dans la respiration cellulaire (195) et sont localisées dans la membrane cytoplasmique (76). Des composés quinones présents dans le milieu seraient réduits enzymatiquement en hydroquinone par les quinones réductases de la membrane cellulaire (par exemple les flavine réductases qui sont une forme de quinone réductase) (163). A leur tour Les hydroquinones sécrétées seraient capables de réduire chimiquement le composé « azo » présent dans l'environnement extérieur de la cellule, de ce fait ce mécanisme ne requiererait pas la pénétration du substrat « azo » dans la cellule il n'y aurait pas d'intervention d'azoréductase spécifiquement (Figure 9).

### III.1.3. Le rôle des azoréductases

Le rôle physiologique des azoréductases n'a pas encore été identifié. Des systèmes de régulation de l'expression des azoréductases proposés montrent des similitudes avec des systèmes de régulation des enzymes impliquées dans la résistance au stress oxydatif (97,180), mais aucune fonction vitale pour la bactérie n'a pu être mise en évidence.

## III.2. Les facteurs influençant la réduction des composés « azo »

Différents facteurs peuvent influencer la réduction des composés « azo ». Ces facteurs peuvent être intrinsèques au substrat « azo », liés aux cofacteurs indispensables ou aux éléments présents dans le milieu réactionnel.

### III.2.1. Influence de la structure chimique des composés « azo »

L'accessibilité des colorants « azo » aux azoréductases dépend de la structure chimique des molécules. Lors de leur étude, Ito *et al.* ont montré que la position du groupement carboxyle était déterminante pour la spécificité du substrat vis-à-vis de la protéine AzoR, l'azoréductase d'*E. coli*. En effet, AzoR semble avoir une meilleure affinité pour le Methyl red, qui possède son groupement carboxyle en position ortho par rapport à sa fonction « azo », que pour le p-Methyl red dont le groupement carboxyle se retrouve en position para par rapport à la fonction « azo » (Figure 10) (79). Une étude a établi que des azoréductases étaient capables de réduire plusieurs composés « azo » possédant un groupe hydroxyle en position 2 du noyau naphthol (94). De ce fait, une hypothèse a été émise sur l'attraction des électrons sur le noyau phénolique accélérant la réduction de la liaison



« azo », et sur la présence d'un groupement fonctionnel chargé à proximité de la fonction « azo » ou d'un second groupement polaire interférant avec la réaction (18). Une étude sur les dérivés de l'Orange II a montré que les groupements sulfates à proximité de la fonction « azo » (en ortho ou en para) empêchaient l'enzyme d'agir alors qu'un groupement méthyle non chargé n'était pas du tout gênant. Les colorants portant 2 groupements hautement polaires (sulfo ou phospho) seraient alors des substrats pour lesquels les enzymes azoréductases auraient moins d'affinité (205).

Les colorants « azo » ne portant aucun substituant ou portant un groupement hydroxyle en ortho sur le noyau naphthol ne sont pas du tout pris en charge par l'azoréductase spécifique de Orange I de *P. aeruginosa* (204). De même, un substrat possédant un groupement phénol à la place d'un groupement naphthol n'est pas hydrolysé par cette enzyme. Par ailleurs, la substitution du groupe naphthol par un noyau anthranol conduit à une faible diminution d'activité. Ces études nous montrent que la spécificité des azoréductases peut être très étroite, car même 2 molécules extrêmement proches chimiquement peuvent ne pas être prises en charge par la même enzyme.

Selon Zimmermann *et al*, la position des substituants peut également influencer la capacité d'une molécule à induire la production de l'enzyme Orange II azoréductase. Par exemple, seules les molécules ayant des groupements hydroxyles en position ortho ont la capacité d'induire l'expression de l'azoréductase spécifique de l'Orange II. Les substituants sont tolérés sur le noyau phenyl mais en aucun cas sur le noyau naphthol, ce qui bloquerait toute capacité inductive à la molécule (204,205). Par contre, l'expression de l'enzyme de *P. aeruginosa* spécifique de l'Orange I est qualifiée de constitutive. Toutefois, les travaux sur l'induction des azoréductases ne sont pas complets car seules des données sur la quantité de protéines produites en présence et en absence de composés inducteurs sont disponibles, aucun résultat sur l'expression même des gènes codants les azoréductase en présence de différents substrats « azo » n'a été publié.

Pour résumer, la structure générale requise pour un bon substrat de l'azoréductase spécifique de l'Orange II :

- ✓ groupement hydroxyle en position 2 sur le noyau naphthol
- ✓ pas de groupements chargés à proximité de la fonction « azo » car ils bloquent la



réaction

- ✓ pas de second groupement polaire sur la molécule car il diminue l'affinité de l'enzyme et bloque la réaction
- ✓ l'attraction des électrons sur un noyau phenyl accélère la réaction

Globalement, la position du groupe hydroxyle en ortho par rapport à la fonction « azo » permet une meilleure activité par rapport à la position para (sauf pour l'azoréductase spécifique de l'Orange I de *P. aeruginosa*). L'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle peut former une liaison hydrogène intramoléculaire avec l'atome d'azote du groupe « azo » et ainsi faciliter le clivage. De plus, il a été observé que l'augmentation du nombre de substituants acide sulfonique résultait en une augmentation du taux de réduction. Cet effet peut être causé par l'effet d'attraction des électrons du substituant sulfonique qui réduit la densité électronique du pont « azo » et donc qui rend la fonction « azo » plus accessible aux électrons (71).

Les colorants « azo » Sudan sont mono ou diazotés. Ils sont réduits par un large panel d'espèces bactériennes (excepté le Sudan II qui libère des amines aromatiques toxiques). Ces colorants sont capables de former des liaisons hydrogènes avec les têtes polaires des phospholipides membranaires via les groupements « azo » et hydroxyles. Ces molécules sont très bien réduites par *E. faecalis* mais ne le sont pas du tout par *E. coli*. On suppose que le colorant « azo » se lie à la membrane, mais que, d'une part l'enzyme responsable de la réduction est absente de la membrane, et d'autre part, cette liaison à la membrane ne doit pas permettre l'entrée de la molécule dans la cellule (194). La perméabilité membranaire est donc un facteur important pour la réduction des substrats par les microorganismes.

La description du substrat « azo » idéal reste délicate car le substrat idéal peut varier d'une enzyme azoréductase à l'autre comme l'a montré Zimmermann *et al* avec les enzymes de *P. aeruginosa* (204,205). Cependant, selon les données récoltées, il est possible d'imaginer un substrat « azo » pouvant être réduit par un grand nombre d'azoréductases et donc d'espèces bactériennes, s'il n'y a pas de problème de perméabilité entre le substrat et la cellule bactérienne. Ce substrat devrait posséder un groupement attracteur d'électrons à proximité de la fonction « azo », préférentiellement en position para ou ortho par rapport à cette fonction « azo ».

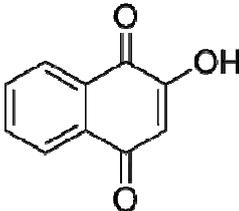
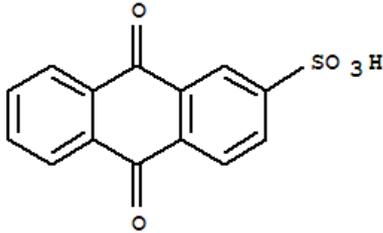
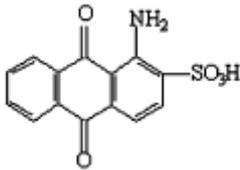
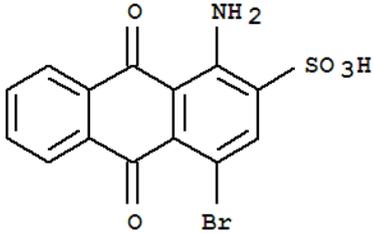
Nom de la molécule	Formule
lawsone	
acide anthraquinone-2-sulfonique (AQS)	
acide 1-aminoanthraquinone-2-sulfonique (ASA2)	
Acide 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonique (BAA)	

Tableau 4 : Exemples de composés quinones ayant un effet accélérateur sur l'azoréduction.

### III.2.2. Les cofacteurs

Les études sur des azoréductases purifiées ont permis d'identifier les propriétés biochimiques de ces enzymes. Les azoréductases font partie de la famille des flavoprotéines. Ces enzymes nécessitent la flavine comme coenzyme et des cofacteurs donneurs d'électrons tels que NADH et NADPH (58,59). La FMN est un coenzyme nécessaire pour le transfert d'hydrogène entre le NAD(P)H, l'enzyme et le substrat « azo ». Ce mécanisme enzymatique est appelé ping-pong (Figure 8).

### III.2.3. Les sources de carbone

Au cours des études sur l'azoréduction par les microorganismes entiers, des conditions de culture favorisant la réduction des composés « azo » ont pu être mises en évidence. Notamment, la nature de la source de carbone est importante car elle peut être différente d'une espèce à l'autre pour obtenir un bon rendement de dégradation. Par exemple, l'extrait de levure ( $0,02 \text{ g.l}^{-1}$ ) augmente considérablement le pourcentage de décoloration du Methyl Orange par *K. rosea* (90% de décoloration du Methyl Orange à  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  en 48 h) alors que le glucose à la même concentration ne permet qu'une faible décoloration par le même inoculum (inoculum non précisé) (140). Le glucose peut même avoir un effet inhibiteur sur la réduction comme chez les espèces *Pseudomonas luteola* (avec des cellules en phase stationnaire de croissance et avec  $1,25 \text{ g.L}^{-1}$  de glucose) et *Shewanella sp.* (avec un inoculum de départ correspondant à une  $\text{DO}_{550\text{nm}}$  1,0 et avec 0 à  $5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose) (28,87). Mais, cette activité répresseur est dépendante de l'espèce. En effet, en 2007 une équipe a testé plusieurs sources de carbone pour voir leur effet sur la réduction des composés « azo » par *Sphingomonas xenophaga*. Le meilleur taux de réduction a été obtenu avec le glucose à  $4 \text{ g.l}^{-1}$  avec  $4,5 \mu\text{mol}$  de substrat dégradé par gramme de cellules par heure (107). Le choix de la source de carbone est donc important à prendre en compte pour le développement d'un milieu de culture favorisant la réduction des composés « azo » par les microorganismes.

### III.2.4. Les composés quinones

Dans le développement d'un milieu de culture favorisant la réduction des composés « azo » par les microorganismes, l'apport en composé quinone peut également trouver son



importance. En effet, les quinones peuvent être des accélérateurs de réduction des composés « azo » en conditions d'anaérobie (Tableau 4). Le taux de réduction est dépendant de la molécule quinone, de sa concentration et des espèces microbiennes. Par exemple, le lawsone est plus efficace que l'antraquinone-2-sulfonate (AQS) chez *E. coli* alors qu'on observe le contraire chez *S. xenophaga* (158). Autre exemple, l'acide 1-aminoanthraquinone-2-sulfonique (ASA-2) est un meilleur accélérateur que l'acide 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonique (BAA) pour la réduction de l'Acid Red 3R par *S. xenophaga*. L'ASA-2 à 0,4mM peut augmenter de 5 fois le taux de réduction de 0,2 mM d'Acide Red 3R par un inoculum de départ de *S. xenophaga* correspondant à une  $DO_{660nm}$  de 0,4-0,45 (107). Les quinones pourraient agir comme des intermédiaires de réaction (Figure 9). Le mécanisme proposé implique des quinones réductases et non des azoréductases. Les quinones seraient tout d'abord réduites enzymatiquement. Les hydroquinones issues de cette réaction seraient capables ensuite de réduire chimiquement les composés « azo ». La réduction chimique d'une mole de colorant amaranth par AQS ou lawsone requiert 2 moles d'une des deux hydroquinones (158).

Toutefois, les azoréductases peuvent également avoir une activité quinone réductase comme les protéines AzoR d'*E. coli* (101) et AZR de *R. sphaeroides* (102). Lorsqu'une enzyme possède les deux types d'activités enzymatiques, azoréductase et quinone réductase, l'activité quinone réductase détectée en conditions d'anaérobie est-elle due à la même enzyme que l'activité azoréductase détectée en conditions d'aérobie ? L'activité azoréductase de l'enzyme AZR de *R. sphaeroides* a été démontrée en conditions d'aérobie et d'anaérobie avec 0,5 µg d'enzyme pure sur 100 µM de Methyl red en présence de 200 µM de NADH, montrant ainsi l'insensibilité à l'oxygène de cette enzyme (15). Par ailleurs, la souche *E. coli* JM109 a été modifiée pour exprimer le gène *azr* codant la protéine AZR de *R. sphaeroides*. Les auteurs ont constaté que la souche parentale et la souche surexprimant le gène *azr* n'étaient pas capables de réduire le composé « azo » Acid Red 27 en absence du composé quinone lawsone en conditions d'anaérobie. Par contre, en ajoutant du lawsone (0,2 mM), la souche surexprimant *azr* était capable de réduire 75% du composé « azo » Acid Red 27 (1 mM) en 1,5 h alors que la souche parentale mettait 5,5 h pour réduire la même quantité d'Acid Red 27 dans les mêmes conditions (105). Ces données tendent à montrer un rôle de la protéine AZR dans la réduction du substrat « azo » Acid Red 27 en conditions



d'anaérobie grâce à son activité quinone réductase. Il est donc possible qu'une même enzyme ayant les 2 activités enzymatiques, azoréductase et quinone réductase, soient impliquées dans la réduction des composés « azo » en conditions d'aérobie grâce à son activité azoréductase et en condition d'anaérobie grâce à son activité quinone réductase. Cependant, il semblerait que ce rôle soit dépendant du substrat au vu de l'activité azoréductase de la protéine AZR sur le Methyl red en conditions d'anaérobie démontrée précédemment. Mais cela reste à confirmer car les tests avec le Methyl red et l'Acid Red 27 n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions. L'activité azoréductase de AZR a été déterminée *in vitro* avec le Methyl red alors que le rôle de quinone réductase dans la réduction anaérobie de l'Acid Red 27 a été testé *in vivo*.

### III.2.5. Les autres facteurs

Les métabolites extracellulaires produits par les bactéries durant leur croissance en présence (culture de décoloration : CD) ou en absence (culture de croissance : CC) de composé « azo » peuvent agir comme stimulateurs de décoloration des colorants « azo ». Par exemple, l'ajout de surnageant de CC récolté en phase stationnaire de croissance ou de CD du substrat Reactive Red 22 récolté après différents cycles de décoloration augmente le taux de réduction du substrat. Par cycle de décoloration, on entend la dégradation totale d'une quantité de substrat « azo » donnée. Par exemple le premier cycle correspond au temps de dégradation d'une quantité x de substrat. Une fois que la quantité x de substrat est réduite, 2x de substrat sont rajoutés à la culture, etc. Les métabolites issus de la réduction du composé « azo » (surnageant de CD) semblent permettre une décoloration encore plus rapide que les métabolites contenus dans le surnageant de CC (27). Ce qui est également surprenant dans cette étude, c'est l'activité dérépresseur des métabolites issus d'une CD sur le glucose. En présence de glucose 0,125% la réduction du substrat Reactive Red 22 à 200 mg.l<sup>-1</sup> est très faible par rapport aux résultats obtenus en absence de glucose. Par contre, dès l'ajout de surnageant de CD obtenu après un premier cycle de décoloration avec 200 mg.l<sup>-1</sup>, la réduction du substrat est plus rapide (27). Toutefois, les métabolites responsables de cette stimulation ou de cet effet dérépresseur n'ont pas été identifiés.

Par ailleurs, selon une étude sur *Sphingomonas sp.* le facteur extracellulaire stimulant la réduction serait non protéique, étant donné l'absence de modification de réaction après



traitement à la protéinase K du surnageant (85) mais aucune précision n'a été apportée à ce jour.

Suite à ces informations, il serait intéressant d'identifier ces métabolites excrétés par la cellule lors de sa croissance de manière à pouvoir les ajouter directement dans le milieu de culture pour favoriser la réduction des composés « azo ».

### **III.3. Etude des activités azoréductases**

#### **III.3.1. Suivi de la réaction par décoloration**

Les activités azoréductases sont principalement étudiées en utilisant des substrats colorés (communément appelés colorants « azo »). La réduction de ces colorants « azo » induit une décoloration du substrat. La réaction peut donc être suivie en mesurant l'absorbance du substrat à sa longueur d'onde d'absorption maximale (cf Tableau 1) (26,49,54). La diminution de l'absorbance indique une décoloration et donc une réduction du substrat. L'avantage de ces propriétés optiques est la facilité d'un suivi direct de la dégradation du substrat. Cependant, cette méthode peut présenter des inconvénients. En effet, suivre la disparition d'un substrat est moins sensible que de suivre l'apparition d'un produit. Le pourcentage de substrat réduit est relativement moins important que le pourcentage de produit apparu. Dans le cas de 5% de substrat réduit, on passe de 100% de substrat à 95%, tandis que pour le produit on passe de 0% à 500% de produit en supplémentaire dans le milieu réactionnel. De ce fait, le début de la décoloration peut être difficile à observer à cause de la grande quantité de substrat restante qui masque le substrat réduit. Il peut donc être intéressant de trouver un autre moyen de suivre la réduction des composés « azo » pour avoir une meilleure sensibilité de détection.

#### **III.3.2. Suivi de la réaction par consommation du NAD(P)H**

Les azoréductases sont des enzymes utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons. Des études suivent la consommation du NAD(P)H à 340nm en partant du principe que s'il y a consommation du NAD(P)H c'est qu'il y a consommation du substrat « azo » (101). Cette méthode présente des avantages dans le cas de substrat de réductase dont les propriétés chimiques ne permettent pas un suivi direct de sa réduction. Cependant, ce n'est pas le cas pour les colorants « azo » qui, pour la majorité, deviennent incolores une fois réduits. L'utilisation de la réaction d'oxydation du NADH comme marqueur de suivi de la réduction



du composé « azo » peut éventuellement trouver un intérêt dans le cas où le coefficient d'extinction molaire est inconnu et dans le cas où il est nécessaire de déterminer les concentrations de substrat consommé. Dans ces conditions, il est important de s'assurer que l'oxydation du NADH n'est pas obtenue indépendamment de la réduction du substrat étudié, qu'il s'agisse d'une réduction chimiquement indépendante de la présence de l'enzyme ou d'une réduction biochimique non corrélée à la réduction du substrat. De plus, dans le cas de cellules entières, le NAD(P)H peut être utilisé par une multitude d'enzymes indépendantes du système étudié ce qui ne permet pas d'utiliser le phénomène d'oxydation du NAD(P)H comme marqueur de la réduction du composé « azo » suivie.

#### **III.4. Azoréduction chez *Escherichia coli***

L'activité azoréductase a commencé à être décrite dans les années 60 dans le tissu de foie de rat (70,110,112). Avant 1993, peu de travaux ont été publiés sur les activités azoréductases des espèces bactériennes de la flore intestinale de l'Homme dont *E. coli* fait partie. En 1993, Ghosh et ses collaborateurs publient leur travaux sur la mise en évidence de 2 activités azoréductase chez une souche d'*E. coli* (58). Cependant, aucune autre étude n'a pu confirmer l'existence de 2 enzymes distinctes correspondantes aux 2 activités azoréductases décrites par Gosh *et al.* Il a fallu attendre l'année 2001 pour qu'un gène codant une enzyme azoréductase chez *E. coli* soit décrit. Dans ce cadre, le gène *acpD* a été depuis renommé *azoR* (132).

#### **III.5. Azoréduction chez *Enterococcus faecalis***

L'activité azoréductase d'*E. faecalis* a été décrite pour la première fois en 1970 (167). Un gène codant une azoréductase chez *E. faecalis* a été découvert et cloné par recherche d'homologues du gène *acpD* d'*E. coli* sur le génome séquencé de la souche V583 d'*E. faecalis*. Une seule protéine a été identifiée par l'équipe de Chen *et al.* Cette protéine présente 38% d'homologie avec AcpD d'*E. coli*. Six différences du type délétion/insertion ont été identifiées entre les 2 protéines (32). Une recherche d'homologue sur la souche de *E. faecalis* ATCC 19433 a mis en évidence un gène nommé *azoA* (Genbank accession n° : AY422207) ayant seulement 3 substitutions par rapport au gène de la souche séquencée V583.

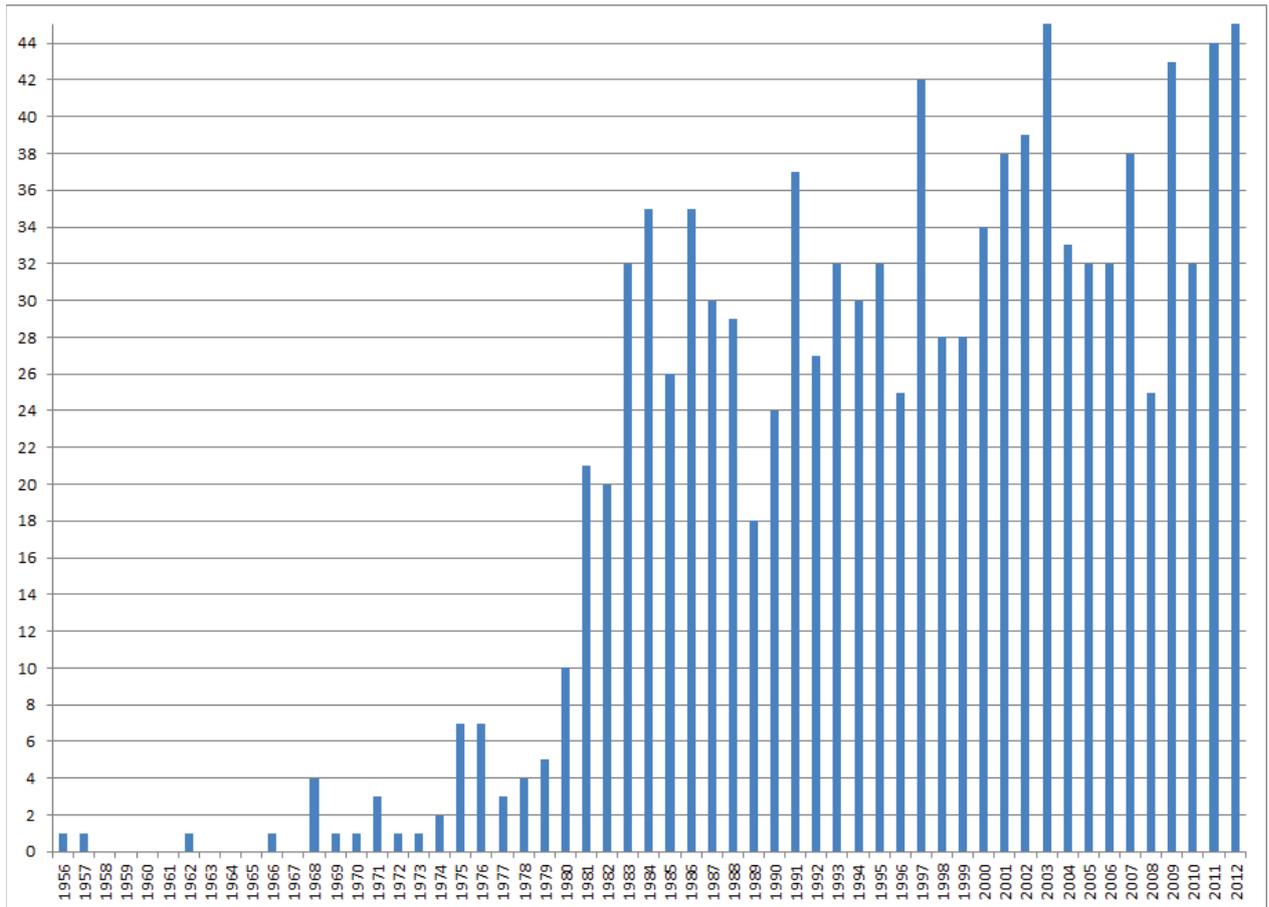


Figure 11 : Nombre de publications référencées dans la banque de données du NCBI par an depuis 1956 jusqu'à nos jours sous les mots clés « nitroreductase » et « nitroreduction ».

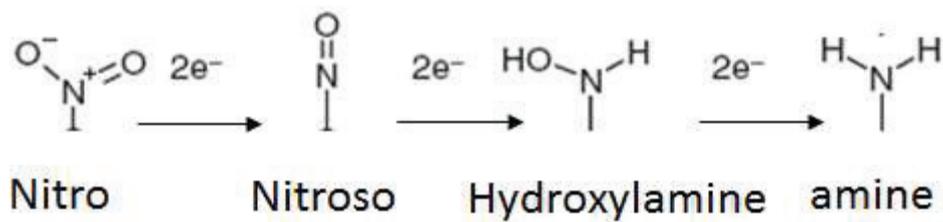


Figure 12 : Réaction de réduction d'une fonction « nitro » en passant par des stades de réduction intermédiaires formant les composés nitroso et hydroxylamine.

## IV. L'activité nitroréductase

Les recherches concernant l'activité nitroréductase se sont intensifiées depuis les années 1980 avec en moyenne une trentaine de publications par an (Figure 11). Cette activité enzymatique est importante dans des études de dépollution comme dans le cas des azoréductases, mais aussi dans le secteur pharmaceutique dans le cadre de l'utilisation de certaines prodrogues. Dans ce cas, une nitroréductase est utilisée pour réduire un substrat qui, en se clivant, libère un principe actif contre une pathologie. Par exemple, le substrat CB1954 est reconnu par la nitroréductase NfsB d'*E. coli*. NfsB converti CB1954 en 2 formes hydroxylamine : 2-hydroxylamine (2HX) et 4-hydroxylamine (4HX), cette dernière étant la forme la plus cytotoxique. Ces produits hydroxylamines agissent aussi bien sur les cellules en division que sur les cellules qui ne sont pas en division (5,66). La réduction du substrat CB1954 est étudiée dans le cadre de la mise au point de thérapie contre le cancer. Une enzyme capable de réduire spécifiquement le substrat CB1954 pourrait être amené spécifiquement dans les cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un vecteur tel un virus. Ainsi, la réduction du substrat CB1954 ne s'effectuerait que dans les cellules possédant cette enzyme, c'est-à-dire les cellules cancéreuses.

### IV.1. Les composés « nitro » et leur réduction

Les composés « nitro » sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs fonctions « nitro » ( $-\text{NO}_2$ ) pouvant être réduite en amine ( $-\text{NH}_2$ ). Les composés « nitro » sont largement utilisés en industrie pharmaceutique, agroalimentaire et production d'explosifs. Ils sont également utilisés comme précurseurs dans les usines de plastiques et colorants. Les activités nitroréductases n'ont été décrites que pour des composés pour lesquels la fonction « nitro » est liée à un noyau aromatique (composés nitroaromatiques).

En raison de la présence de l'atome d'oxygène qui est plus électronégatif que l'atome d'azote, la polarisation de la liaison azote-oxygène fait que l'atome d'azote porte une charge positive partielle et sert d'électrophile. Ainsi, la réaction la plus commune sur les fonctions « nitro » dans les systèmes biologiques est la réduction par des mécanismes faisant intervenir des transferts d'électrons seuls ou de paires d'électrons (171). La réduction enzymatique ou chimique d'un composé « nitro » passe par différents états intermédiaires : nitroso, hydroxylamino et amine (Figure 12).

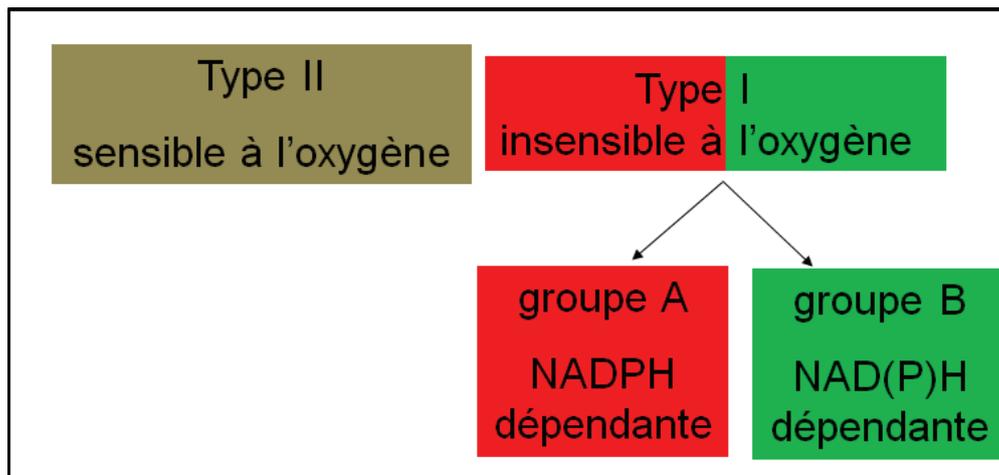


Figure 13 : Classification des enzymes nitroréductase selon leur sensibilité à l'oxygène et leurs dépendance en NAD(P)H.

Espèce	Enzymes nitroréductase insensible à l'oxygène	Références
<i>Bacillus licheniformis</i>	YfkO	50
<i>Bacillus subtilis</i>	NfrA1, YwrO	6, 198
<i>Escherichia coli</i>	NfsA, NfsB, YdjA	38, 199, 201
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NfsA(Kp)	146
<i>Pseudomonas putida</i>	PnrA, PnrB	23
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	NprA, NprB	16, 161
<i>Salmonella tiphymurium</i>	SnrA	134, 191
<i>Vibrio harveyi</i>	FRP	98
<i>Vibrio fischeri</i>	Frase1	202
<i>Lactococcus lactis</i>	YtjD	67
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PnbA	67
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Ssap-NtrB	24
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ddn	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Frmp2, Hbn1p	45

Tableau 5 : Liste d'espèces de microorganismes pour lesquelles une enzyme nitroréductase a été décrite.

La première partie du tableau regroupe les bactéries à Gram négatif (rose), la deuxième partie du tableau regroupe les bactéries à Gram positif (violet) et la troisième partie du tableau regroupe les levures. Les nitroréductases insensibles à l'oxygène du groupe A (NADPH dépendantes) sont en rouge et celles du groupe B (NAD(P)H dépendantes) sont en vert. Les enzymes pour lesquelles le groupe n'a pas été défini sont en noir.

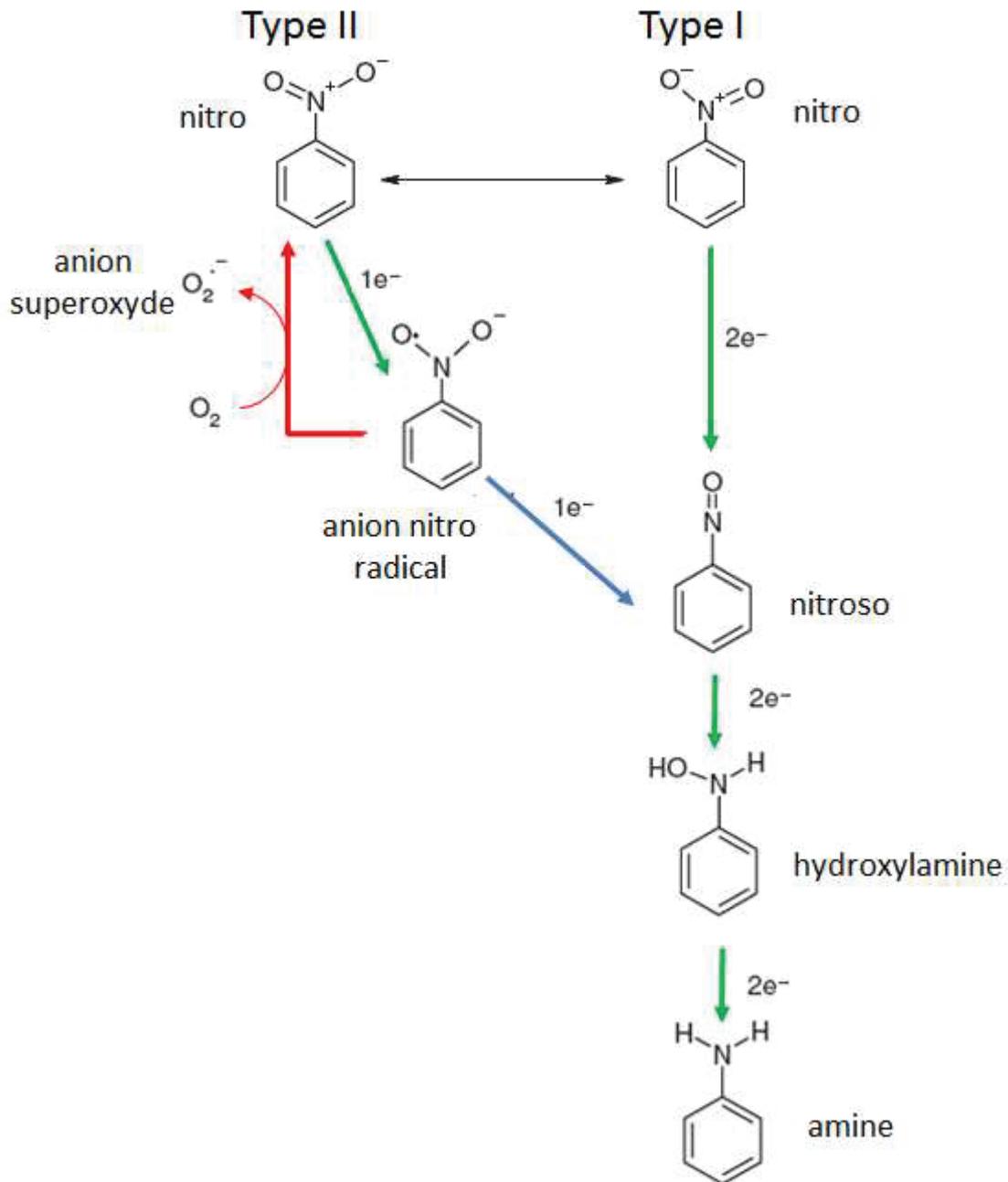
De nombreux organismes possèdent l'activité nitroréductase, que ce soient des organismes supérieurs comme les mammifères (diaphorase DT humaine (90) ou les microorganismes eucaryotes (Frm2 de *S. cerevisiae* (45)) et procaryotes (bactéries anaérobies de la flore intestinale (156)). Malgré l'ubiquité de cette activité enzymatique parmi les différents types d'organismes vivants le rôle physiologique de cette activité enzymatique n'est pas connu.

## IV.2. Description des nitroréductases

### IV.2.1. Généralités

Les nitroréductases sont des enzymes de 200 acides aminées en moyenne. Contrairement aux azoréductases, aucun numéro EC n'est clairement défini pour les nitroréductases. Certaines nitroréductases, telles que NfnB de *Cronobacter turicensis*, *Citrobacter rodentium* et *E. coli* ont été classées selon le numéro EC 1.5.1.34 comme les dihydroptéridine réductases qui catalysent la réduction du 6,7-dihydroptéridine en 5,6,7,8-tetrahydroptéridine en présence de NAD(P)H.

De manière générale, les nitroréductases se trouvent sous forme d'homodimères. A l'origine, ces protéines ont été décrites chez les eubactéries et classées dans le même groupe selon leur similarité de séquences. Ces enzymes sont aujourd'hui classées selon leur sensibilité à l'oxygène (144). Les enzymes insensibles à l'oxygène sont dites de type I et les enzymes sensibles à l'oxygène sont dites de type II (161) (Figure 13). De nombreuses nitroréductases insensibles à l'oxygène ont été décrites chez différentes espèces bactériennes (Tableau 5). A l'inverse, aucune enzyme sensible à l'oxygène n'a été décrite à ce jour. Une étude décrivait pourtant une activité nitroréductase sensible à l'oxygène chez plusieurs espèces du genre *Clostridium* (*Clostridium perfringens*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium clostridiiforme*) (156), mais l'enzyme responsable de cette activité nitroréductase en anaérobiose n'a jamais été décrite (171). La question de l'existence de ces enzymes reste donc à démontrer. Deux groupes ont été décrits parmi les nitroréductases insensibles à l'oxygène : les enzymes capables d'utiliser uniquement le NADPH comme donneur d'électron (groupe A) et les enzymes capables d'utiliser le NADH et le NADPH comme donneur d'électron (groupe B) (Figure 13) (161).



**Figure 14 : Schéma de réduction d'un composé nitroaromatique par une nitroréductase de type I et une nitroréductase de type II.**

La nitroréductase de type I catalyse la réduction de la fonction « nitro » en fonction amine par transfert de paires d'électron et formant ainsi les intermédiaires de réaction hydroxylamine et nitroso. La nitroréductase de type II catalyse la réduction de la fonction « nitro » par transfert d'électron seul formant dans un premier temps l'anion radical « nitro » qui, en présence d'oxygène (flèche rouge), se régénère en fonction « nitro » et libère l'anion superoxyde. En absence d'oxygène (flèches bleues) la réaction se poursuit telle que dans le cas la nitroréductase de type I (79,161,187). Les flèches vertes indiquent les réactions insensibles à l'oxygène.

#### IV.2.2. Les mécanismes de nitroréduction

Le système enzymatique nitroréductase est décrit comme un mécanisme ping-pong (cf Figure 8 dans lequel le composé « azo » peut être remplacé par le composé « nitro »). Une réaction enzymatique produisant différents intermédiaires de réaction a été suggérée pour chaque type d'enzyme selon leur sensibilité à l'oxygène. Chaque intermédiaire est potentiellement réduit par un mécanisme ping-pong comme décrit en figure 8.

Les nitroréductases de type I catalysent la réduction par transfert de paires d'électrons en formant le composé nitroso et hydroxylamine en tant qu'intermédiaires conduisant à la réduction totale de la fonction « nitro » en fonction amine primaire (Figure 14) (21).

Les nitroréductases de type II seraient capables de transférer uniquement les électrons de manière unique. Ce transfert d'électron par électron conduit à la formation de l'anion « nitro » radical. En présence d'oxygène, la fonction « nitro » serait régénérée à partir de l'anion « nitro » radical, formant ainsi l'anion superoxyde et provoquant un stress oxydatif (144). En absence d'oxygène, l'enzyme sensible à l'oxygène catalyse le transfert d'un deuxième électron sur l'anion « nitro » radical formant la fonction nitroso. La réduction jusqu'à la forme amine se poursuit par transfert de paires d'électrons (Figure 14).

Lors d'études de réaction de nitroréduction, des analyses par HPLC ont été réalisées pour déterminer les métabolites formés lors de la réduction. Il a été montré que, très souvent, la forme finale du substrat obtenu enzymatiquement correspond à la forme hydroxylamine (5,39,116,144). Par contre, la forme nitroso est difficilement observable. L'équipe de Race *et al* a montré qu'un substrat analogue à la forme nitroso prédite de la nitrofurazone et nitrofurantoïne était un meilleur substrat que la forme nitro. L'affinité de l'enzyme nitroréductase serait donc plus forte pour la forme nitroso que pour la forme nitro. De plus, la réduction du composé nitroso en composé hydroxylamine est plus rapide que la réduction du composé « nitro » en composé nitroso. Ceci pourrait expliquer la difficulté d'identifier le composé nitroso intermédiaire lors de la réduction d'un composé « nitro » (148).

La localisation de l'activité nitroréductase chez les microorganismes eucaryotes ou procaryotes n'a pas été identifiée à ce jour. Aucune donnée n'indique si la réaction de réduction des composés « nitro » se trouve au niveau du cytoplasme, des membranes



cellulaires ou encore si les nitroréductases sont excrétées et que la nitroréduction se passe dans l'environnement extérieur de la cellule. Or il serait intéressant de connaître cette localisation pour définir si les différences de réduction entre deux substrats « nitro » pourrait être dues à un défaut de perméabilité ou à un défaut d'affinité entre l'enzyme et le substrat.

### IV.3. Le rôle des nitroréductases

La question de l'importance des nitroréductases dans l'adaptation et l'évolution reste un mystère. Roldan *et al* suggèrent que la fonction primaire des nitroréductases aurait pu être perdue ou modifiée pour permettre la réduction de différents composés nitroaromatiques, et donc la survie de la bactérie dans un environnement pollué (161).

Des études ont montré un rôle probable des nitroréductases dans la réponse au stress oxydatif des microorganismes. Ainsi, la nitroréductase NfrA1 de *B. subtilis*, synthétisée durant la phase stationnaire et essentielle pour la bactérie, a été classée parmi les « heat shock » protéines. Son expression est spécifiquement induite par la chaleur mais, le mécanisme d'induction n'a pas encore été élucidé (127). Par ailleurs, une étude sur puce à ADN plus récente montre que l'expression du gène *nfrA1* peut également être induite par un stress oxydatif (129).

Une protéine homologue à NfrA1 de *B. subtilis* a été identifiée chez *S. aureus* : NfrA. Contrairement à la protéine NfrA1, la protéine NfrA n'est pas essentielle à la survie de *S. aureus*. De plus, *nfrA* est transcrit tout au long de la vie de la bactérie avec un pic d'expression à la fin de la phase exponentielle de croissance. La transcription du gène codant NfrA peut être aussi induite par l'éthanol, le diamide et la nitrofurantoïne mais pas par la chaleur, les sels ou le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à basse concentration. Dans le cas d'une forte concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une faible induction de NfrA a été observée, mais cette protéine seule ne suffit pas à résister à l'agent stressant car la bactérie arrête alors de se multiplier pour combattre pleinement le stress oxydatif et reprendre sa croissance ensuite (174).

Un autre exemple concerne la protéine CinD de *Lactococcus lactis* qui possède une activité nitroréductase et un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydatif. Cependant, cette enzyme possède également une activité laccase. Son rôle contre le stress

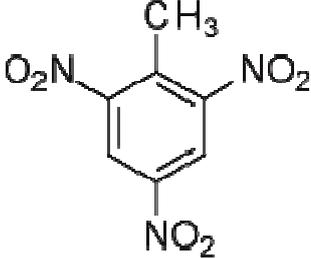
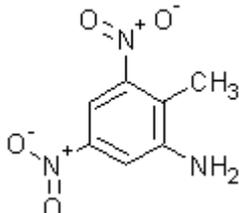
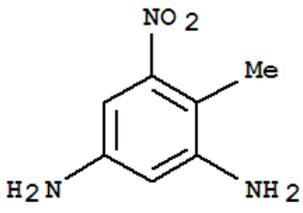
Nom de la molécule	Formule
Trinitrotoluène (TNT)	
2-amino-4,6-dinitrotoluène (ADNT)	
2,4-diamino-6-nitrotoluène (DANT)	

Tableau 6 : Exemples de composés « nitro ».

oxydatif peut donc être lié à son activité catalase et non nitroréductase (122).

Les nitroréductases de l'espèce de levure *S. cerevisiae* influence la réponse au stress oxydatif en régulant la quantité de glutathion (GSH) et les activités enzymatiques antioxydantes telle que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (45). De plus, d'après Paterson et ses collaborateurs l'expression du gène *nfsA* chez *E. coli* est régulée par SoxS (142). Or ce système SoxRS est connu pour protéger du stress oxydatif induit par l'anion superoxyde et l'oxyde nitrique. Toutes ces données indiquent que les nitroréductases n'ont certainement pas les mêmes rôles suivant les espèces, même si ces protéines semblent souvent jouer un rôle direct ou indirect dans la résistance à un stress (principalement le stress oxydatif).

#### **IV.4. Les facteurs influençant l'activité nitroréductase**

Très peu de données ont été publiées jusqu'alors sur les facteurs pouvant influencer l'activité nitroréductase.

La possibilité de réduction d'un composé « nitro » dépend de la nature des substituants différents du groupe « nitro » présents sur le noyau aromatique et du potentiel de réduction du milieu réactionnel. Les groupes attracteurs d'électrons activent la molécule pour la réduction du groupe « nitro », alors que les groupes donneurs d'électrons rendent le noyau aromatique plus accessible aux attaques électrophiles. Dans le cas des nitrotoluènes, la probabilité de réduction augmente et la probabilité des attaques électrophiles diminuent à mesure que le nombre de groupes « nitro » augmentent. De ce fait, la réduction d'un groupe « nitro » de la molécule trinitrotoluène (TNT) (Tableau 6) est très rapide dans de nombreuses conditions, y compris les conditions qui prévalent pour la culture de bactéries en aérobie (171). Au contraire, la réduction du 2-amino-4,6-dinitrotoluène (ADNT) requiert un potentiel redox plus bas et la réduction du 2,4-diamino-6-nitrotoluène (DANT) (Tableau 6) requiert un potentiel redox inférieur à -200 mV car les propriétés de donneur d'électrons du groupe amine diminuent le déficit en électron de la molécule (56).

Par ailleurs, une équipe a montré que le propionate comme donneur d'électron était plus favorable à la réduction du nitrobenzène que l'acétate. Cependant, la quantité de sulfate influe sur le taux de réduction du nitrobenzène puisque l'augmentation de la quantité de sulfate diminue le taux de réduction du nitrobenzène (73). En dehors de cette

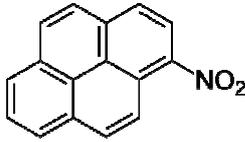
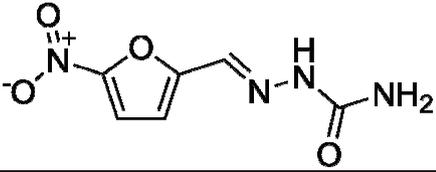
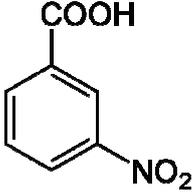
Nom de la molécule	Formule
1-nitropyrrène	
nitrofurazone	
Acide 3-nitrobenzoïque	

Tableau 7 : Formules des composés « nitro » dont la réduction peut être suivie directement par mesure d'absorbance.

étude, peu de données sont publiées sur les facteurs favorisant ou inhibant la nitroréduction par les microorganismes.

## **IV.5. Etude des activités nitroréductase**

### **IV.5.1. Détection directe de l'activité nitroréductase**

La détection de l'activité nitroréductase est différente selon le substrat utilisé. Il existe des substrats « nitro » colorés comme le 1-nitropyrrène (Tableau 7) jaune qui devient incolore une fois réduit. Ce substrat peut être utilisé en milieu gélosé. Un halo décoloré entoure les souches productrices de nitroréductases, ce qui permet de détecter ces souches (156). Il est également possible de suivre la réduction du substrat nitrofurazone (Tableau 7) par diminution de l'absorbance à la longueur d'onde 375 nm (coefficient d'extinction molaire  $15,85 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (116). La réduction de ce substrat donne un produit ayant une absorption maximale à 320 nm en conditions d'anaérobiose, alors qu'en conditions d'aérobiose, il y a formation d'un produit ayant une absorption maximale à 278 nm (20). Il y aurait donc possibilité de suivre également l'apparition d'un produit de réduction du nitrofurazone en utilisant ces longueurs d'ondes. Cependant, aucun résultat n'a été publié utilisant cette méthode de suivi de réduction du nitrofurazone.

Le produit de réduction du substrat acide 3-nitrobenzoïque (Tableau 7) est détecté par mesure de l'absorbance à 266 nm après avoir stoppé la réaction avec de l'acide chlorhydrique 1,2 N et en utilisant le tampon phosphate comme blanc (65) ce qui laisse supposer que la longueur d'onde 266 nm correspond à la valeur maximale d'absorption de l'acide 3-amino benzoïque mais aucune information n'est disponible sur les capacités d'absorption de cette molécule.

L'activité nitroréductase peut également être suivie en fluorescence. Le composé 7-aminocoumarine-3carboxylique, produit de réduction de l'acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, est fluorescent aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm ce qui permet de suivre son apparition dans le milieu réactionnel (81).

### **IV.5.2. Détection indirecte de l'activité nitroréductase**

Il n'est pas toujours possible de suivre directement la réduction des composés « nitro » car les propriétés optiques ne le permettent pas. La réduction peut être suivie par oxydation du NAD(P)H à 340 nm, comme dans le cas de la réduction des composés « azo »



(43,91). C'est d'ailleurs la méthode la plus couramment utilisée.

D'autres méthodes ont été mises au point pour détecter l'activité nitroréductase. Par exemple, l'acide 4-nitrobenzoïque est réduit en acide 4-aminobenzoïque. Un protocole complexe a été mis au point pour détecter ce produit : incubation 1h à 37°C des solutions contenant le produit à détecter, acidification des solutions avec ajout de 0,21% d'acide trichloroacétique en concentration finale puis ajout de nitrite de sodium à une concentration finale de 0,007% pour former un sel de diazonium avec le composé acide 4-aminobenzoïque. Les solutions sont incubées 20 minutes à température ambiante, puis du sulfamate d'ammonium est ajouté à une concentration finale de 0,04% pour neutraliser le nitrite de sodium. Enfin, après 3 minutes d'incubation à température ambiante, le composé N-(1-naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) est ajouté à une concentration finale de 0,35%. Le sel de diazonium précédemment formé couplé au NEDD dans une solution acide produit un colorant « azo » de couleur rouge-violet dont l'absorbance peut être mesurée à 540 nm. Une mole d'acide 4-aminobenzoïque donne une mole de composé « azo » (156). De ce fait, la quantité de composé « azo » formée correspond à la quantité d'acide 4-aminobenzoïque produite. Ce protocole de détection de produit de réduction d'un composé « nitro » est fastidieux, c'est pourquoi il est plus souvent utilisé une méthode directe si le substrat le permet, ou bien le suivi de l'oxydation du NAD(P)H.

#### **IV.6. Nitroréductases chez *Escherichia coli***

L'espèce bactérienne *E. coli* possède au minimum 11 gènes codants des enzymes ayant potentiellement une activité nitroréductase. Parmi ces 11 protéines, on retrouve NfsA, NfsB, YdjA, NemaA et Azor pour lesquelles une activité nitroréductase a été décrite (146). Les nitroréductases d'*E. coli* ont tout d'abord été décrites comme activateurs des antibiotiques de la famille des nitrofuranes : nitrofurazone et nitrofurantoïne. Ces molécules deviennent toxiques une fois la fonction « nitro » réduite et inhibent les enzymes impliquées dans la dégradation du glucose et du pyruvate. Certaines de leur formes réduites, notamment la forme hydroxylamine, ont un pouvoir alkylant et peuvent causer des dommages à l'ADN et aux protéines (116). Une mutation sur le gène codant NfsA peut entraîner une résistance de la souche aux nitrofuranes.

Les 2 protéines majoritairement décrites ayant une activité nitroréductase chez



*E. coli* sont NfsA et NfsB (8,39,64,99,100,142,146,159,183,184,192,199,201). Leur nom est lié à leur rôle dans la sensibilité aux nitrofuranes (116). Ces protéines ont été classées parmi les nitroréductases insensibles à l'oxygène (type II) (199,201). Leur caractérisation biochimique a abouti à classer NfsA dans le groupe A des nitroréductases car son affinité pour le cofacteur NADPH est plus grande que pour le cofacteur NADH (199) alors que NfsB a été classée dans le groupe B des nitroréductases car cette enzyme est capable d'utiliser le NADH aussi bien que le NADPH comme donneur d'électron (201). La flavine mononucléotide (FMN) a été identifiée comme coenzyme pour NfsA et NfsB. Cependant, la dépendance au FMN de l'activité nitroréductase a été montrée uniquement pour NfsB dont la forme apoenzyme a été purifiée en dénaturant et précipitant les protéines. La forme holoenzyme a été reconstruite avec une solution de FMN (201). La dépendance au FMN de NfsA pour son activité nitroréductase a été déduite des résultats obtenus avec NfsB (199). Deux autres protéines ont été minoritairement étudiées.

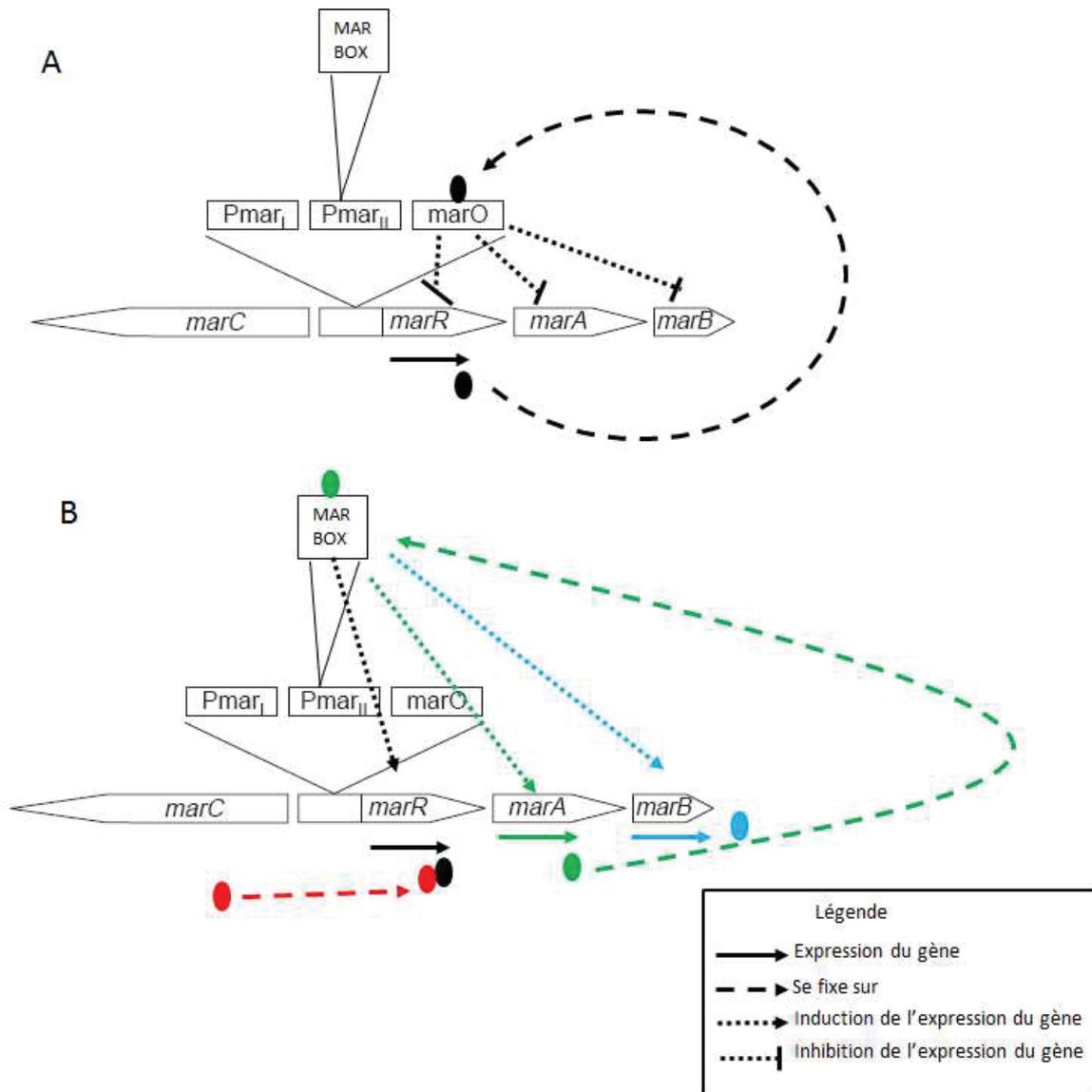
NfsA et NfsB sont des nitroréductases beaucoup plus étudiées que d'autres protéines ayant une activité nitroréductase comme ydjA (38) et NemaA (64,126,146,182) pour différentes raisons :

- leur rôle dans l'activation de prodrogues anticancéreuses telles que CB1954 (8,39,184) ;
- leur rôle dans la résistance au stress oxydatif puisqu' il a été montré que les gènes *nfsA* et *nfsB* étaient surexprimés en conditions de stress oxydatifs ( (100,142) ;
- leur rôle dans la résistance aux nitrofuranes (116,192) ;
- leur rôle dans l'activité azoréductase de *E. coli* (126,159).

Ce sont des modèles simples à étudier puisque leur purification après clonage des gènes codant ces 2 enzymes est relativement facile. Elles représentent les 2 groupes de la familles des nitroréductases de type II, insensibles à l'oxygène, ce qui peut permettre d'extrapoler aux enzymes homologues chez d'autres organismes.

#### **IV.7. Nitroréductases de *Enterococcus faecalis***

L'activité nitroréductase d'*E. faecalis* a été très peu étudiée et aucune enzyme ayant cette activité n'a été décrite à ce jour. Cependant, des études ont montré que des souches d'*E. faecalis* étaient sensibles à la nitrofurantoïne (82,203), antibiotique de la famille des



**Figure 15 : Organisation génétique du régulon *mar*.**

A) Le répresseur MarR contrôle négativement l'expression de l'opéron *marRAB* en se liant à *marO*. B) Un composé dit inducteur (en rouge) empêche la répression de l'opéron *marRAB* en se liant à la protéine MarR (en noir). Le gène *marA* est exprimé (en vert) et la protéine MarA se lie à la marbox ce qui induit l'expression de de l'opéron *marRAB* (en bleu) et des gènes impliqués, entre autres, dans la résistance aux antibiotiques. MarB est une protéine de fonction inconnue mais peut affecter MarA. MarC est potentiellement une protéine de la membrane interne mais sa fonction reste inconnue (3).

nitrofuranes. Ces molécules deviennent toxiques pour les cellules bactériennes une fois que leur fonction « nitro » est réduite. Ces antibiotiques sont donc des marqueurs d'activité nitroréductase. Ainsi, la sensibilité d'*E. faecalis* à la nitrofurantoïne indique la présence d'activité nitroréductase.

#### IV.8. La régulation des azoréductases et nitroréductases

La régulation des nitroréductases et azoréductases est très peu connue. Les rôles pressentis et décrits dans la résistance aux stress oxydatifs permettent de suggérer un lien entre la régulation de l'expression des protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif (comme les systèmes *mar* (multiple antibiotic resistance) et la régulation de l'expression des protéines azoréductases et nitroréductases.

##### IV.8.1. Les régulateurs de la famille MarR

Les régulateurs de la famille MarR régulent l'expression de gènes de résistance à de multiples antibiotiques, composés aromatiques, solvants organiques ou agents de stress oxydatif via un système de régulation codé dans le régulon *mar* (multiple antibiotic resistance). Le locus *mar* chez *E. coli* comprend 2 unités transcriptionnelles appelées : opéron *marC* et opéron *marRAB*. Il a été montré que la délétion ou l'inactivation de l'opéron *marRAB* augmente la sensibilité de la cellule vis-à-vis de multiples antibiotiques, agents de stress oxydatif et solvants organiques. Les petites protéines de type MarR contrôlent des opérons cataboliques. La liaison à l'ADN est possible grâce au motif conservé HTH au centre de la protéine (181).

L'expression de chaque opéron (*marC* et *marRAB*) est sous contrôle de deux différents promoteur ( $P_{marI}$  et  $P_{marII}$ ) (Figure 15). Le gène *marC* code potentiellement pour une protéine de la membrane interne de fonction inconnue tandis que *marRAB* code pour le répresseur MarR, l'activateur MarA et une petite protéine de fonction inconnue MarB. En absence d'inducteur tels que des antibiotiques, le répresseur MarR se lie aux séquences d'ADN  $P_{marI}$  et  $P_{marII}$  ainsi qu'à la séquence *marO* qui est contenue dans cette zone (Figure 15A). De cette façon, MarR bloque la transcription de l'opéron *marRAB*. Par contre, aucune information n'a été trouvée sur le rôle que pourrait avoir MarR sur la transcription de *marC*. En présence de composés chimiques contenant un noyau phénolique comme le chloramphénicol et la tétracycline, MarR est inactivée, ce qui permet l'expression de



l'opéron *marRAB* (Figure 15B). MarA est un activateur qui contrôle l'expression de l'opéron *marRAB* et d'autres gènes sur le chromosome tels que *acrAB* impliqués dans un système de pompe à efflux, *sodA* impliqué dans la réponse au stress oxydatif ou encore *nfo* impliqué dans la réparation de l'ADN (Figure 15) (2,3). MarA appartient à la famille des protéines XylS/AraC. Ces protéines possèdent 21 résidus putatifs en forme d'hélice-tour-hélice capables de se lier à un domaine spécifique de l'ADN. MarA est capable de se lier à des domaines de l'ADN appelés marbox. Cette marbox est contenue dans la séquence promotrice P<sub>marII</sub>. La marbox liant MarA est homologue à la soxbox permettant la liaison de SoxS. La soxbox contient le motif conservé GCAY. Dans la marbox, la base pyrimidine Y est remplacée par la base purique adénine. Cette fine différence entre marbox et soxbox permet à la marbox d'être reconnue par d'autres facteurs de transcription (2). Par ailleurs, les facteurs de régulation codés par *marA* et *soxS* contrôlent l'expression des mêmes ensembles de gènes avec une préférence d'action sur les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques pour MarA et les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif pour SoxS (12,125). Chez *E. coli*, quarante gènes sont surexprimés via l'action de la protéine MarA, dont 9 appartiennent au groupe des 15 gènes surexprimés via l'action de SoxS. Au vu de ces résultats, le régulon *mar* est considéré comme l'un des régulons le plus large connu à ce jour (12).

#### IV.8.2. Exemples de régulation par les protéines MarR

Chez *B. subtilis* le répresseur YodB de la famille MarR régule négativement la transcription du gène codant la nitroréductase YodC. A l'inverse, YkvE, protéine appartenant également à la famille MarR, réprime la transcription du gène codant l'azoréductase AzoR2 (180).

Chez *E. coli*, l'expression de 62 gènes a été identifiée comme étant régulée par MarA : 47 induits (dont *nsfA* et *nfsB*) et 15 réprimés (12). Par ailleurs, la régulation du gène codant la protéine NfsA chez *E. coli* par SoxS a été également montrée (100).

De même, des *marbox* ont été identifiées en amont de la séquence codante pour NprA, une des deux nitroréductases décrites chez l'espèce *R. capsulatus* (143) ce qui peut laisser supposer que le gène codant pour NprA est également régulé par un système similaire au régulon *mar* d'*E. coli*.



Toutes ces informations amènent à penser que les gènes codant les azoréductases et les nitroréductases sont régulés par des système de type *soxR/S* ou *mar*.

## V. Conclusion

Les substrats « azo » et « nitro » sont potentiellement des marqueurs d'activité microbienne intéressants au vu de leurs propriétés optiques spécifiques en fonction de leur état d'oxydo-réduction. De plus, les activités azoréductases et nitroréductases semblent particulièrement bien réparties au sein de la population microbienne alors qu'aucune fonction physiologique n'a été précisément identifiée à ce jour. De même, des incertitudes persistent sur les voies métaboliques utilisant ces enzymes et les conditions d'expression de ces activités enzymatiques.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à mieux caractériser des enzymes capables de réduire les substrats « azo » et « nitro » disponibles dans la chimiothèque. Tout d'abord, il était important d'évaluer les capacités de réduction de différents groupes de microorganismes (Gram positifs, Gram négatifs, levures) avant de rechercher *in silico* les protéines pouvant être impliquée dans la réduction de ces substrats pour deux espèces de bactéries choisies comme modèle : *E. coli* pour les bactéries à Gram négatif et *E. faecalis* pour les bactéries à Gram positif. Ensuite, une phase de caractérisation biochimique *in vitro* de ces enzymes a été faite, ainsi qu'une caractérisation *in vivo* à l'aide de mutants délétés pour les gènes codants ces enzymes afin de mieux comprendre le métabolisme des cellules bactériennes vis-à-vis de la réduction des substrats « azo » et « nitro ». Ces travaux ont été effectués dans le but d'appréhender une solution pour l'optimisation de l'expression des activités azoréductases et nitroréductases afin d'obtenir une réponse rapide en matière de présence de microorganismes dans un échantillon biologique tel qu'un échantillon alimentaire (optimisation de paramètres TEMPO®).



# MATERIELS ET METHODES



## I. Choix des souches

### I.1. Souches cliniques

Les souches cliniques des espèces à Gram négatif (Tableau 8), des espèces à Gram positif (Tableau 9) et des espèces de levures (Tableau 10) ont été fournies par le soucier privé de bioMérieux (3 route de port Michaud 38390 La Balme les Grottes).

Genre	Espèce	N° souche	Collection	Code
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	7302005	NA	PDB73
		7701120	NA	PDB77
		8308043	ATCC 23220	PDB83
		8901033	NA	PDB89
		9212046	ATCC 19606	PDB92
		9803047	NA	PDB98
		0511044	NA	PDB05
		0603011	NA	PDB06
		0809002	NA	PDB08
		0910010	NA	PDB09
<i>Cronobacter</i>	<i>muytjensii</i>	8001061	NA	EHY80
		8110043	NA	EHY81
		8307023	ATCC 51329	EHY83
		8405628	NA	EHY84
		0707080	NA	EHY07
	<i>sakazakii</i>	8107026	ATCC 29544	EES81
		8703210	NA	EES87
		9106042	NA	EES91
		9501006	NA	EES95
		0501034	NA	EES05
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	7308009	ATCC 11775	ECO73
		7610041	NA	ECO76
		8004018	NA	ECO80
		8501130	NA	ECO85
		8703057	NA	ECO87
		9001050	NA	ECO90
		9605094	NA	ECO96
		0003001	ATCC 8739	ECO00
		0404027	NA	ECO04
		0606206	NA	ECO06
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	7309001	ATCC 10145	PPA73
		8008017	NA	PPA80
		8512095	NA	PPA85
		9210035	NA	PPA92
		9607056	NA	PPA96
		0101079	ATCC 9027	PPA01
		0412249	NA	PPA04
		0706063	NA	PPA07
		0711115	NA	PPA0711
		0806067	NA	PPA08

Tableau 8 : Liste des souches cliniques d'espèces à Gram négatif fournies par le soucier privé de bioMérieux.

Genre	Espèce	N° souche	Collection	Code
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	7611007	ATCC 19433	SFL76
		8004017	NA	SFL80
		8602027	NA	SFL86
		8311066	ATCC 29212	SFL83
		9501009	NA	SFL9501
		9507074	NA	SFL95
		9806158	NA	SFL98
		0008222	NA	SFL00
		0405001	NA	SFL04
		0706031	NA	SFL07
<i>Kocuria</i>	<i>rosea</i>	7515048	ATCC 186	MMR75
		8237509	ATCC 177	MMR82
		8237512	NA	MMR8237
		9303042	NA	MMR93
		9308003	NA	MMR9308
		8506197	NA	MMR85
		0005012	ATCC 178	MMR00
		0005008	NA	MMR0005
		0104121	NA	MMR01
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus ssp aureus</i>	7509008	ATCC 25923	MAU75
		7702152	NA	MAU77
		8146972	NA	MAU81
		8712082	ATCC 12600	MAU87
		9010050	NA	MAU90
		9501049	NA	MAU95
		9901013	NA	MAU99
		0008228	NA	MAU00
		0607070	NA	MAU06
		0205008	NA	MAU02
	<i>epidermidis</i>	7509009	ATCC 12228	MEP75
		8005076	NA	MEP80
		8503246	ATCC 14990	MEP85
		8607202	NA	MEP86
		9003024	NA	MEP90
		9404046	NA	MEP94
		9709162	NA	MEP97
		0008216	NA	MEP00
		0201027	NA	MEP02
		0406224	NA	MEP04

Tableau 9 : Liste des souches cliniques d'espèces à Gram positif fournies par le soucier privé de bioMérieux

Genre	Espèce	N° souche	Collection	Code
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	8304015	NA	NA
		8504277	ATCC 18804	UCA85
		9003019	NA	UCA90
		9604013	NA	UCA96
		9902097	NA	UCA99
		0009003	NA	UCA00
		0801025	ATCC 10231	UCA08
		0411007	NA	UCA04
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	7407005	NA	UTA74
		7612056	NA	UTA76
		7905006	NA	UTA79
		8503069	NA	UTA85
		9112031	ATCC 34614	UTA91
		9605039	NA	UTA96
		9706045	NA	UTA97
		9711001	NA	UTA9711
		9605016	NA	UTA9605
		8406044	NA	UTA84

Tableau 10 : Liste des souches cliniques d'espèces de levures fournies par le soucier privé de bioMérieux

## I.2. Souches utilisées pour les manipulations génétiques

Les souches utilisées pour les manipulations ont été fournies par le soucier de l'équipe Mécanismes de virulence et de multi-résistance chez *Legionella* de l'Unité Mixte de Recherche 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (Tableau 11).

Espèce	Souche	Caractéristiques	Code	Référence
<i>Escherichia coli</i>	XL1Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>	ECOXL1B	Stratagène
<i>Escherichia coli</i>	K12-MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	ECOK12	(17)
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	ECODH5α	(177)

Tableau 11 : Liste des souches utilisées pour les manipulations génétiques.

## I.3. Souches construites en laboratoire durant la thèse :

### I.3.1. Souches surproduisant des protéines

Les souches surproduisant des protéines ont été construites à partir de la souche d'*E. coli* XL1Blue. Cette souche a été transformée avec un plasmide hybride contenant le gène codant pour les protéines d'intérêt à surproduire (Tableau 12). Les clones transformés



sont sélectionnés sur géloses LB supplémentées avec  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ampicilline car le plasmide pQE30 possède le gène *bla* apportant la résistance à l'ampicilline.

Une autre souche surproduisant la protéine AzoR a été construite à partir de la souche mutante  $\text{ECO}\Delta\text{azoR-nfsA-nfsB}$  :  $\text{ECO}\Delta\text{azoR-nfsA-nfsB} + \text{pQE30-azoR}$

Nom	plasmide	Caractéristique
<b>ECO/pazoR87</b>	pQE30-azoR87	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoR87 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA95</b>	pQE30-azoA95	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA95 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA76</b>	pQE30-azoA76	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA76 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA80</b>	pQE30-azoA80	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA80 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA83</b>	pQE30-azoA83	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA83 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA86</b>	pQE30-azoA86	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA86 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA9501</b>	pQE30-azoA9501	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA9501 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA98</b>	pQE30-azoA98	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA98 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA00</b>	pQE30-azoA00	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA00 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA04</b>	pQE30-azoA04	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA04 en présence d'IPTG
<b>ECO/pazoA07</b>	pQE30-azoA07	Amp <sup>R</sup> , surproduit AzoA07 en présence d'IPTG
<b>ECO/pEF0404</b>	pQE30-EF0404	Amp <sup>R</sup> , surproduit EF0404 en présence d'IPTG
<b>ECO/pEF1181</b>	pQE30-EF1181	Amp <sup>R</sup> , surproduit EF1181 en présence d'IPTG
<b>ECO/pEF0648</b>	pQE30-EF0648	Amp <sup>R</sup> , surproduit EF0648 en présence d'IPTG
<b>ECO/pEF0655</b>	pQE30-EF0655	Amp <sup>R</sup> , surproduit EF0655 en présence d'IPTG
<b>ECO/pnfsA</b>	pQE30-nfsA	Amp <sup>R</sup> , surproduit NfsA en présence d'IPTG
<b>ECO/pnfsB</b>	pQE30-nfsB	Amp <sup>R</sup> , surproduit NfsB en présence d'IPTG

**Tableau 12** : Liste de souches surproduisant des protéines. Toutes ces souches ont été construites durant ce travail à partir de la souche parentale ECOXL1Blue.

### I.3.2. Souches mutantes

Les souches mutantes ont été construites à partir de la souche parentale *E. coli* K12 MG1655 (Tableau 13). Les mutations consistent en la délétion d'un, deux ou trois gènes.

Nom	Gènes délétés
<b>ECO<math>\Delta</math>azoR</b>	<i>azoR</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>nfsA</b>	<i>nfsA</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>nfsB</b>	<i>nfsB</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>azoR-nfsA</b>	<i>azoR, nfsA</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>azoR-nfsB</b>	<i>azoR, nfsB</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>nfsA-nfsB</b>	<i>nfsA, nfsB</i>
<b>ECO<math>\Delta</math>azoR-nfsA-nfsB</b>	<i>azoR, nfsA, nfsB</i>

**Tableau 13** : Souches porteuses d'une délétion. Toutes ces souches ont été construites durant ce travail à partir de la souche ECOK12.

### I.3.3. Souches de complémentation

Les souches de complémentation ont été construites à partir des souches mutantes. Les plasmides de complémentation ont été construits à partir du plasmide pACYC177 dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  (Tableau 14).



Nom	plasmide	caractéristique
DH5/pazoR	pazoR	Amp <sup>R</sup>
DH5/pnfsA	pnfsA	Amp <sup>R</sup>
DH5/pnfsB	pnfsB	Amp <sup>R</sup>
DH5/pazoR-nfsA	pazoR-nfsA	Amp <sup>R</sup>
DH5/pazoR-nfsB	pazoR-nfsB	Amp <sup>R</sup>
DH5/pnfsA-nfsB	pnfsA-nfsB	Amp <sup>R</sup>
DH5/pazoR-nfsA-nfsB	pazoR-nfsA-nfsB	Amp <sup>R</sup>

Tableau 14 : Liste des souches obtenues lors de la construction des plasmides de complémentation construits à l'aide du plasmide pACYC177.

Toutes ces souches ont été construites à partir de la souche ECODH5α. Amp<sup>R</sup> signifie résistant à l'ampicilline.

Les souches mutantes ont ensuite été transformées avec les plasmides de complémentation construits dans la souche *E. coli* DH5α (Tableau 15). Les clones transformés sont sélectionnés sur géloses LB supplémentées avec 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline car le plasmide pACYC177 possède le gène *bla* de résistance à l'ampicilline.

Nom	plasmide	caractéristique
ECO pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR/pazoR	pazoR	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA/pnfsA	pnfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsB/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsB/pnfsB	pnfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA/pazoR-nfsA	pazoR-nfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA/pazoR	pazoR	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA/pnfsA	pnfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsB/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsB/pazoR-nfsB	pazoR-nfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsB/pazoR	pazoR	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsB/pnfsB	pnfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA-nfsB/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA-nfsB/pnfsA-nfsB	pnfsA-nfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA-nfsB/pnfsA	pnfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔnfsA-nfsB/pnfsB	pnfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pACYC	pACYC177	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pazoR-nfsA-nfsB	pazoR-nfsA-nfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pazoR-nfsA	pazoR-nfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pazoR-nfsB	pazoR-nfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pnfsA-nfsB	pnfsA-nfsB	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pazoR	pazoR	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pnfsA	pnfsA	Amp <sup>R</sup>
ECOΔazoR-nfsA-nfsB/pnfsB	pnfsB	Amp <sup>R</sup>

Tableau 15 : Liste des souches complémentées avec les plasmides construits à partir du plasmide pACYC177.

Toutes ces souches ont été construites à partir des souches mutantes du tableau 9.

Abbréviation	substrat	Solvant
7NCCA	Acide 7-Nitrocoumarine-3-carboxylique	100% H <sub>2</sub> O
HABA	Acide 3-(4-Hydroxyphénylazo)benzoïque	40% tween 20 + 60% MPLD
MR	Methyl red, sel de sodium	100% H <sub>2</sub> O
Tar	Tartrazine	100% H <sub>2</sub> O
OrII	Orange II	100% H <sub>2</sub> O
OrI	Orange I	100% H <sub>2</sub> O
CMPAI	3-(4'-Carboxyméthylphénylazo)indole	100% MPLD
OrG	Orange G	100% H <sub>2</sub> O
PDMAC	p-(Diméthylamino)-cinnamaldehyde	100% MPLD

Tableau 16 : Liste des substrats enzymatiques utilisés.

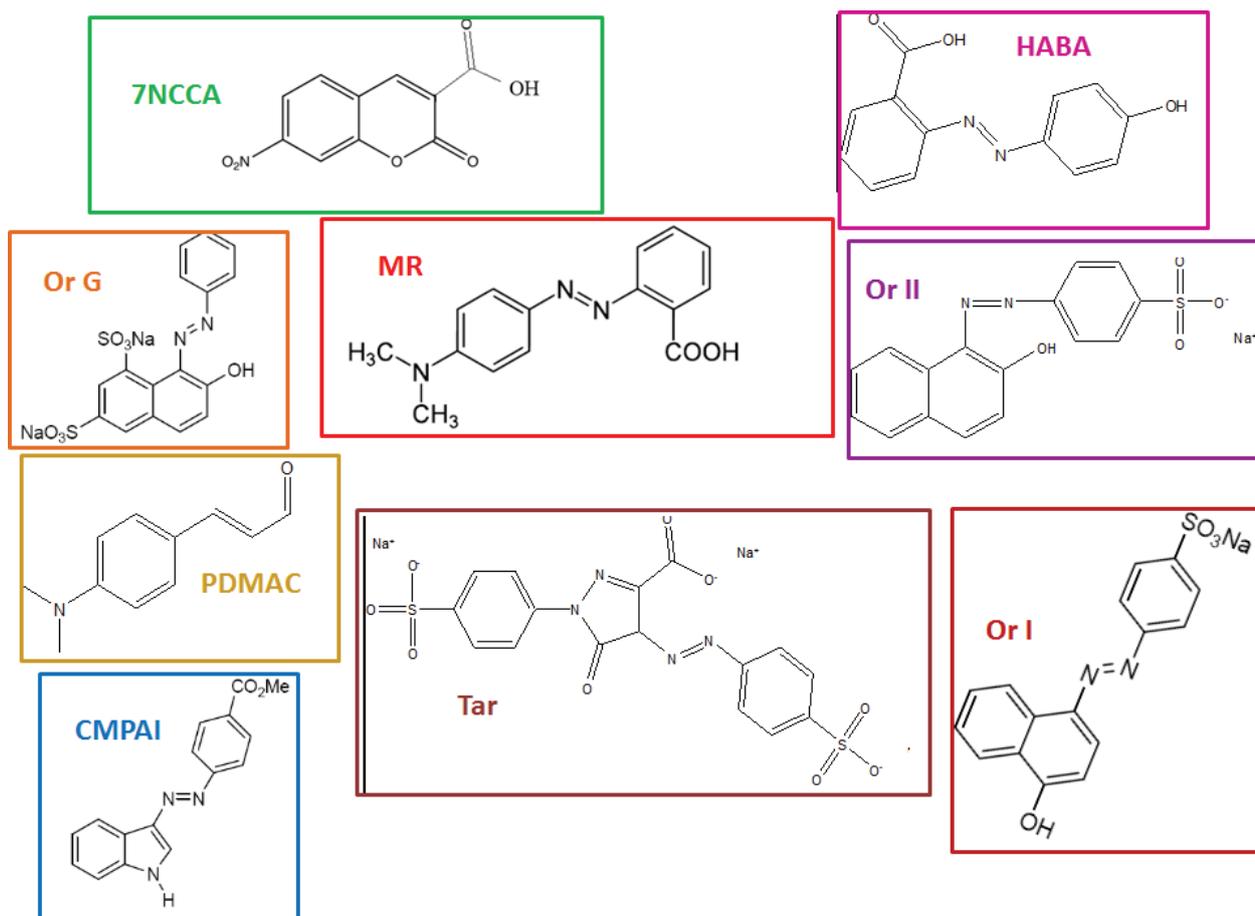


Figure 16 : Formules des substrats utilisés.

#### I.4. Milieux de culture

Toutes les souches utilisées lors de cette étude ont été cultivées en milieu liquide dans du milieu Lysogeny Broth (LB) ou du bouillon trypticase soja (TSB) en fonction des expériences, supplémentés en antibiotique si nécessaire (Tableau 17). Sur milieu solide, les souches ont été cultivées sur géloses 1,2% agar LB supplémentées en antibiotique si nécessaire (Tableau 17) ou bien sur géloses columbia au sang de mouton (COS, référence 43041, bioMérieux, France).

Milieu	Antibiotique	Concentration	Code milieu liquide	Code milieu solide
LB	ampicilline	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	LB-amp	GL-amp
LB	chloramphénicol	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	LB-cm	GL-cm

Tableau 17 : milieux liquides et solides LB supplémentés en antibiotique.

## II. Substrats enzymatiques

Les différents substrats utilisés lors de cette étude représentent les familles de substrats « nitro », « azo » et carbonyle (Tableau 16 et Figure 16). Un substrat de la famille « nitro », 7 substrats de la famille « azo » et un substrat de la famille carbonyle ont été testés.

## III. Techniques de manipulation des acides nucléiques (ADN et ARN)

### III.1. Banque de plasmides

Lors de cette étude, les différents plasmides ont été utilisés comme vecteur d'expression (clonage), comme cible PCR ou pour leur gène codant une enzyme recombinase (Tableau 18).

Plasmide	Utilisation	T°	Carte plasmide
pQE30	Clonage/surproduction protéine	37°C	Annexe page 293
PACYC177	Clonage/complémentation des mutants	37°C	Annexe page 295
pKD3	PCR fragment FRT- <i>cat</i> -FRT	37°C	Annexe page 303
pKD46	Lambda Red recombinase	30°C	Annexe page 305
pCP20	FLP recombinase	30°C	Annexe page 307

Tableau 18 : Liste des plasmides utilisés durant ce travail.

La température T° correspond à la température à laquelle les cellules de *E. coli* doivent être cultivées pour permettre une bonne réplification du plasmide.



Figure 17: Schéma de la stratégie de choix des amorces dans le but d'un clonage dans le plasmide pQE30 d'un gène codant une protéine à surproduire.

L'amorce sens (pQEgène S) (en rouge) doit impérativement se situer juste après le codon initiateur ATG, tandis que l'amorce antisens (pQEgèneR) (en vert) doit juste d'être en aval du gène. Plusieurs exemples d'amorces antisens sont représentés sur ce schéma. Cette amorce antisens peut couvrir l'extrémité 3' du gène (R1 et R2) ou être plus en aval (R3) du codon stop (CS).

Gène ciblé	Couple d'amorces	Sites de restriction introduits	séquences	Tm (°C)	Taille du produit PCR
<i>azoA</i>	pQE <i>azoA</i> S	BamHI	cgggatccTCAAAATTATTAGTTGTTAAAGCACATCC	59,5	644 pb
	pQE <i>azoA</i> R	Sall	acgcgtcgacATTTAGAATGTTTTACCGTATTCAGTTGC	60,4	
<i>azoR</i>	pQE <i>azoR</i> S	pael	acatgcatgcAGCAAGGTATTAGTTCTTAAATCCAGC	59,1	622 pb
	pQE <i>azoR</i> R	pstI	aaactgacagTTATGCAGAAACAATGCTGTCTG	59,1	
<i>EF0404</i>	pQEEF0404 S	BamHI	cgggatccACAACATATACAACGAATGATTTTTTCAG	59,0	660 pb
	pQEEF0404 R	Sall	acgcgtcgacTTTTATTGCCTATTCAAATGTCGTG	59,5	
<i>EF1181</i>	pQEEF1181 S	BamHI	cgggatccAATCAAACAATCGAACAATTACTAAGTC	57,7	763 pb
	pQEEF1181 R	Sall	acgcgtcgacCACGCTCTTTTGTGTTAGACATC	58,2	
<i>EF0648</i>	pQEEF0648 S	BamHI	cgggatccATGTATCAAGATGTTGTTTCGCAGC	60,6	701 pb
	pQEEF0648R	Sall	acgcgtcgacCAATCACTTTGGATGTTTGTTC	58,6	
<i>EF0655</i>	pQEEF0655 S	BamHI	cgggatccTCAAAATTTACTGAAATGATGAAAAACC	60,1	652 pb
	pQEEF0655R	Sall	acgcgtcgacGCTTTCCTCTTTCTCTTCG	59,7	
<i>nfsA</i>	pQEnfsA S	BamHI	cgggatccACGCCAACCATTGAACCTATTTG	60,3	795 pb
	pQEnfsA R	Sall	acgcgtcgacGCACCTCTCTGTCAGACCTGG	60,1	
<i>nfsB</i>	pQEnfsB S	BamHI	cgggatccGATATCATTCTGTGTCGCCTTAAAGC	59,8	681 pb
	pQEnfsB R	Sall	acgcgtcgacGGCAAGAGAGAATTACACTTCGG	59,5	

Tableau 19 : Amorces PCR pour le clonage des gènes d'intérêt dans le vecteur pQE30.

Les sites de restriction insérés sont de même couleur que l'enzyme de restriction associée. Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite).

## III.2. Banque d'oligonucléotides

### III.2.1. Oligonucléotides utilisés pour le clonages dans le vecteur d'expression pQE30

Le plasmide pQE30 (Qiagen, Courtaboeuf, France) est utilisé pour le clonage de gène codant une protéine à surproduire (Annexe page 293). Ce plasmide possède un site multiple de clonage (MCS) dans lequel il est possible d'insérer le gène codant la protéine côté 5' en phase avec le cadre de lecture d'un codon initiateur ATG présent dans le MCS et d'une étiquette codant 6 histidines (6-His). Dans ce plasmide, l'expression du gène codant la protéine recombinante est sous la dépendance du promoteur fort du phage T5 et de deux séquences opératrice *lac*. L' amorce PCR sens (S ou amont) du gène à cloner se situe juste après le codon initiateur du gène et en phase avec le pQE30. L'amorce anti-sens (R ou aval) est légèrement en aval du gène. Le codon stop n'est pas forcément inclus dans l'amorce R, mais le fragment PCR final doit contenir ce codon stop (Figure 17). Pour insérer le fragment dans le plasmide cible, il est nécessaire d'ajouter des sites de restriction par l'intermédiaire des amorces PCR. Les sites de restriction doivent être présents dans le plasmide et absents du gène à cloner (Tableau 19).

Les gènes *azoR*, *nfsA*, *nfsB* sont amplifiés à partir du chromosome d'une souche d'*E. coli* et les gènes *azoA*, *EF0404*, *EF0648*, *EF0655*, *EF1181* sont amplifiés à partir du chromosome d'une souche d'*E. faecalis*.

### III.2.2. Oligonucléotides utilisés pour l'obtention de mutants délétés chez *E. coli*

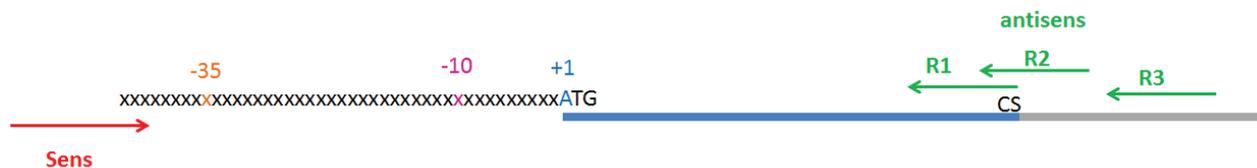
Les fragments PCR permettant la délétion des gènes d'intérêt ont été amplifiés à partir du plasmide pKD3 qui contient la cassette de résistance au chloramphénicol encadré des séquences FRT (carte en annexe page 303). Une séquence homologue à la séquence en amont du gène à déléter a été rajoutée à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide S et une séquence homologue à la séquence en aval du gène à déléter a été ajoutée à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide R (Tableau 20 et annexe page 351).

Gène ciblé	Couple d'amorces	séquences	Tm (°C)	Taille du produit PCR
<i>azoR</i>	FRT- <i>azoR</i> S	CATCGCCATTCAAACATCTATAAGGAAACACC GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60°C	1083 pb
	FRT- <i>azoR</i> R	CTGAATATCTACAGTCCACATCAAGACCGTGTCCG GTCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	60°C	
<i>nfsA</i>	FRT- <i>nfsA</i> S	GCCCCACAGCTGATGAACCGTCCACCGCAATATTC GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60°C	1084 pb
	FRT- <i>nfsA</i> R	CAATATGGCAATTTTCACCTGCACCTCTCTGTC GTCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	60°C	
<i>nfsB</i>	FRT- <i>nfsB</i> S	GCCTATGATGACGGCTGAAACAGGGTTATGCAAATC GTAGGCTGGAGCTGCTTCG	60°C	1086 pb
	FRT- <i>nfsB</i> R	CATTTCTCGTTGAACCTTGTAATCTGCTGGCACGC GTCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC	60°C	

**Tableau 20 : Amorces PCR utilisées pour la construction des mutants dirigés.** Le fragment PCR construit à partir de ces amorces contient la cassette de résistance au chloramphénicol encadrée par les séquences FRT ainsi que les séquences homologues aux régions flanquantes du gène cible (séquences en noir). L'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol encadrée par les séquences FRT est obtenue à partir du plasmide pKD3 (séquence en rouge), cible de la PCR. Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite).

Gène ciblé	Couple d'amorces	séquences	Tm (°C)	Taille du produit PCR souche sauvage	Taille du produit PCR souche mutante + FRT-cat-FRT	Taille du produit PCR souche délétée du gène
<i>azoR</i>	amont <i>azoR</i>	AACAACAGGGAAAGATAGTCAGGG	60	1724 pb	2133 pb	1117 pb
	aval <i>azoR</i>	CAGCTCCATACAGATTTTCGGTAAC	60,4			
<i>nfsA</i>	amont <i>nfsA</i>	CAGCGTAGAGAAGTCCTGAAACC	59,7	2498 pb	2848 pb	1708 pb
	aval <i>nfsA</i>	GCAATCACCTCCATCACCAAC	60,4			
<i>nfsB</i>	amont <i>nfsB</i>	AAGGAGTCAGAAACCAGAGACCAG	60,4	2248 pb	2541 pb	1521 pb
	aval <i>nfsB</i>	CAGGCATTTTGCTGATGGC	60,4			

**Tableau 21 : Amorces PCR utilisées pour vérifier les mutants de délétion.** Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite).



**Figure 18 : Schéma de la stratégie de choix des amorces dans le but d'un clonage dans le plasmide pACYC177 d'un gène délété dans la souche mutante.**

L'amorce sens (*pgène S*)(en rouge) doit se situer en amont de la zone promotrice -35, tandis que l'amorce antisens (*pgène R*)(en vert) doit juste d'être en aval du gène. Plusieurs exemples d'amorces antisens sont représentés sur ce schéma. Cette amorce antisens peut couvrir l'extrémité 3' du gène (R1 et R2) ou être plus en aval (R3) du codon stop (CS).

### III.2.3. Oligonucléotides utilisés pour la vérification des mutants chez *E. coli*

Les zones délétées des gènes d'intérêt du chromosome des souches mutantes obtenues chez *E. coli* ont été vérifiées par PCR sur colonie à l'aide d'amorces choisies en amont et aval de la zone à déléter (Tableau 21 et annexe page 351).

### III.2.4. Oligonucléotides utilisés pour le clonage dans le vecteur d'expression pACYC177 pour la complémentation des mutants

Le plasmide pACYC177 sélectionné pour la complémentation est un plasmide à faible nombre de copie (environ 15 par cellule) pour reproduire au maximum les conditions d'expression du gène en conditions natives (carte en annexe page 295).

La stratégie de choix des amorces pour le clonage est différente de celle utilisée pour le clonage dans le vecteur d'expression pQE30. Pour rester au plus près des conditions d'expression naturelle du gène cloné, il est nécessaire de garder son promoteur natif. Chez les organismes procaryotes, le promoteur se situe en amont du codon initiateur ATG du gène. Le promoteur comprend les régions consensus présentes en -10 (TATAbox) et -35 par rapport à la base initiatrice de la transcription (+1). L'amorce sens est donc choisie en amont de la région -35. L'amorce anti-sens est dessinée en aval du gène comme dans le cas du clonage dans le vecteur pQE30 (Figure 18). De même que précédemment, il est nécessaire d'ajouter des sites de restriction au fragment PCR par l'intermédiaire des amorces PCR pour insérer le fragment PCR dans le plasmide cible. Les sites de restriction doivent être présents dans le plasmide et absents du gène à cloner (Tableau 22).

### III.2.5. Oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR sur le gène *azoR*

Les amorces utilisées lors de l'expérience de RT-PCR pour évaluer le taux d'expression du gène *azoR* ont été dessinées en amont et en aval du gène *azoR* (Tableau 23).

## III.3. Extraction d'ADN chromosomique

L'ADN chromosomique est extrait à partir de 2 mL de culture bactérienne en phase stationnaire. Le culot de cellules est repris dans 500  $\mu$ L de tris (0,1 M)-EDTA (0,01 M) pH 8 additionné de lysozyme 20 mg.mL<sup>-1</sup>. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 30 minutes pour lyser les cellules. Le mélange est ensuite additionné de protéinase K 1,4 mg.mL<sup>-1</sup>, RNase 1,4 mg.mL<sup>-1</sup>/ sarcosyl 2% et incubé 1 h à 37°C sous agitation douce.

Gène ciblé	Couple d'amorces	Site de restriction introduit	séquences	Tm (°C)	Taille du produit PCR
<i>azoR</i>	pACYCazoR S	Xmal	tcccccgggGCAGGATTGTGAATAAAGTGTCAAC	59,2	837pb
	pACYCazoR R	HindIII	cccaagcttTGGGAAAACAGGTAAGTGGATTG	60,3	
<i>nfsA</i>	pACYCnfsA S	NheI	ctagctagcAACGTCTTGCCCCACAGC	59,9	864pb
	pACYCnfsA R	XhoI	ccgctcgagGCACCTCTCTGTCAGACCTGG	60,1	
<i>nfsB</i>	pACYCnfsB S	XhoI	ccgctcgagCATTTTTCTCGTTACCATTTCTC	58,6	837pb
	pACYCnfsB R	Xmal	tcccccgggAGCAGCCTATGATGACGGC	59,1	

**Tableau 22 : Amorces PCR pour le clonage des gènes d'intérêt dans le vecteur pACYC177.**

Ces clonages sont utilisés pour la complémentation des mutants. Les sites de restriction insérés sont de même couleur que l'enzyme de restriction associée. Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite).

Gène ciblé	Couple d'amorces	séquences	Tm (°C)	Taille du produit PCR
<i>azoR</i>	RTAzoR1	CTTCCGATGAGTTGATTGCC	59,8	353pb
	RTAzoR2	GCTTTGCGTCAGACTGTGC	59,9	

**Tableau 23 : Amorces PCR utilisées pour la reverse transcription de l'ARNm de *azoR*.**

Les séquences sont écrites du côté 5' (à gauche) vers le côté 3' (à droite).

Deux extractions avec 500  $\mu$ L de mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (V/V/V ; 25/24/1) (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) sont effectuées suivies d'une extraction avec 500  $\mu$ L de chloroforme/isoamylalcool (V/V ; 24/1). Le dernier surnageant est ajusté à 400  $\mu$ L avec du Tris (0,01 M)-EDTA (0,001 M)/ sarcosyl 0,5% avant d'ajouter 50  $\mu$ L de solution III (acétate de potassium 3 M/acide acétique glacial 12,5%). Finalement, 1,2 mL d'éthanol froid  $-20^{\circ}\text{C}$  sont ajoutés et la solution obtenue est mélangée par renversement 10 à 15 fois pour observer et récupérer la pelote d'ADN à l'aide d'un fil de platine. Cette pelote d'ADN est séchée puis réhydratée dans 200  $\mu$ L de Tris (0,01 M)-EDTA (0,001 M) pH 8.

### **III.4. Extraction d'ADN plasmidique**

#### **III.4.1. Mini préparations d'ADN plasmidique sur silice**

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 1,5 mL de culture en phase stationnaire. Le culot cellulaire est repris dans 200  $\mu$ L de solution I (Tris HCl 25 mM/EDTA,  $\text{Na}_2$  10 mM/glucose 50 mM pH 8)) additionnée de 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de lysozyme. 200  $\mu$ L de solution II (NaOH 0,68% /SDS 1%) sont ensuite ajoutés et les tubes sont mixés par retournements successifs avant d'ajouter 150  $\mu$ L de solution III (acétate de potassium 3 M/acide acétique glacial 12,5%). Suite à une centrifugation (13000 rpm, 10 minutes), le surnageant est récupéré et mis en contact avec 200  $\mu$ L de silice à 0,07 mg/mL pendant 20 minutes sous agitation à température ambiante pour que l'ADN s'adsorbe sur la silice. Après centrifugation (12 000 rpm, 2 minutes), le surnageant est éliminé et le culot de silice lavé 2 fois par 500  $\mu$ L de solution d'éthanol « wash » (50% éthanol pur, 0,58% NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl). Le culot est finalement séché au speed vac pour éliminer toute trace d'éthanol. L'ADN est désorbé de la silice par 30  $\mu$ L de solution Tris-EDTA (10 mM/1 mM) à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes.

#### **III.4.2. Maxipréparations d'ADN plasmidique**

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 20 mL de culture en phase stationnaire. Le culot de cellules est repris dans 2 mL de solution I (cf III.4.1). 2 mL de solution II (cf III.4.1) sont ajoutés à la solution I et les solutions sont mélangées par retournements successifs avant d'ajouter 1,5 mL de solution III (cf III.4.1). Après centrifugation (13000 rpm, 10 minutes), le surnageant est récupéré par filtration à travers de la gaze. L'ADN est alors extrait par 4 mL de mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (V/V/V ; 25/24/1) (Roth,



Karlsruhe, Allemagne). Après centrifugation, la phase aqueuse (supérieure) est prélevée et 2,5 volumes d'éthanol froid -20°C sont ajoutés. Le mélange est incubé à -20°C pendant 15 minutes. Après centrifugation (14000 rpm, 20 minutes), le culot est lavé à l'éthanol 70°, puis repris dans une solution NaCl 0,4 M/PEG 8000 6,5%. Ce mélange est incubé dans la glace pendant 20 minutes puis centrifugé (10000 rpm, 10 minutes). Le culot est lavé avec 400 µL d'éthanol 70°. L'éthanol est éliminé après centrifugation (10000 rpm, 10 minutes). Le culot final est lyophilisé et repris dans 150 µL de tris (10 mM)-EDTA (1 mM) pH 8.

### III.5. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN a été effectuée selon le protocole recommandé par le kit TRIzol de la société Invitrogen (Saint Aubin, France).

### III.6. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

Cette technique permet d'obtenir, *in vitro*, un grand nombre de fragments d'ADN identiques à partir d'un fragment d'ADN cible ou d'ARNm cible. Cette méthode fait intervenir des amorces spécifiques du fragment cible, des désoxyribonucléotides et une ADN polymérase couplée à une Reverse Transcriptase dans le cas d'ARNm cible.

Durant cette thèse, différents kits de PCR ont été utilisés : Phusion (référence F-530, Thermo scientific, Courtaboeuf, France) et DyNAzyme (référence F508-S, Finnzyme, Thermo scientific, Courtaboeuf, France).

#### III.6.1. Cible ADN pur : chromosome ou plasmide

Le mélange réactionnel suivant est préparé pour les PCR avec le kit phusion :

Tampon HF	10 µL
DNTPs 10mM	1 µL
Amorce S 10µM	2,5 µL
Amorce R 10µM	2,5 µL
ADN	200 ng chromosome
Polymérase	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 50 µL

La réaction d'amplification par PCR avec le kit Phusion se déroule selon les étapes suivantes:



Dénaturation initiale à 98°C pendant 3 minutes

x 30 {  
 Dénaturation à 98°C pendant 30 secondes  
 Hybridation à T<sub>m</sub> pendant 30 secondes  
 Elongation à 72°C pendant 70 secondes

Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes

Le mélange réactionnel suivant est préparé pour les PCR avec le kit DyNAzyme :

Amorce S 10μM	2,5 μL
Amorce R 10μM	2,5 μL
ADN	1 μL de plasmide ou 200 ng chromosome
Mix DyNAzyme	25 μL
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 50 μL

La réaction d'amplification par PCR sur colonie avec le kit DyNAzyme se déroule selon les étapes suivantes:

Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes

x 30 {  
 Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes  
 Hybridation à T<sub>m</sub>-5°C pendant 30 secondes  
 Elongation à 72°C pendant 70 secondes

Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes

### III.6.2.Cible : colonie

Les colonies sont prélevées à l'aide d'un cône stérile et repris dans 50 μL d'eau ultra pure. Les colonies sont lysées à 100°C pendant 10 minutes. Les PCR sur colonies sont faites avec le kit DyNAzyme. Le mélange réactionnel suivant est préparé :

Amorce S 10μM	2,5 μL
Amorce R 10μM	2,5 μL
ADN	5 μL colonie bouillie
Mix DyNAzyme	25 μL
H <sub>2</sub> O	q.s.p. 50 μL



La réaction d'amplification par PCR sur colonie se déroule selon les étapes suivantes:

	Dénaturation initiale à 98°C pendant 1 minute	
	Dénaturation à 94°C pendant 3 minutes	
x 30	{ Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes Hybridation à Tm-5°C pendant 30 secondes Elongation à 72°C pendant 70 secondes	
		Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes

### III.6.3. RT-PCR

L'expérience est effectuée avec une quantité de 200 ng d'ARN dans un volume réactionnel de 25 µL contenant les éléments suivants :

Amorce S 100 µM	1,5 µL
Amorce R 100 µM	1,5 µL
dNTPs 10 mM	1 µL
ARNs	200 ng
Tampon Qiagen X5	5 µL
Qiagen One-step RT-PCR enzyme mix	1 µL
H <sub>2</sub> O RNase free	q.s.p. 25 µL

Dans un premier temps, les extraits ARNs sont ajoutés uniquement dans les tubes essais (tubes E) pour évaluer l'expression du gène d'intérêt mais pas dans les témoins (tubes T). Les témoins sont utilisés pour vérifier l'ADN résiduel dans les extraits ARNs.

La transcription reverse des ARNm en ADNc se déroule selon une réaction d'amplification par PCR suivant le programme qui suit:

Transcription Reverse à 50°C pendant 30 minutes

Inactivation RT/Activation DNA polymérase à 95°C pendant 15 minutes

A l'issue de cette étape, les extraits ARNs sont ajoutés dans les tubes témoins T et une amplification de l'ADN présent dans le tube est effectuée selon les étapes suivantes :

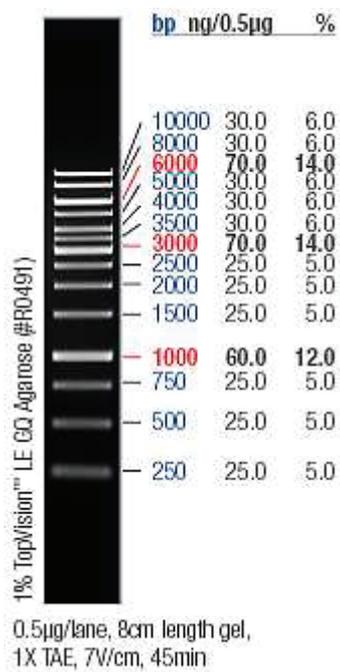


Figure 19 :Marqueur de taille GeneRuler 1 kb (Fermentas).

x 30 {  
 Dénaturation à 94°C pendant 40 secondes  
 Hybridation à  $T_m - 5^\circ\text{C}$  pendant 30 secondes  
 Elongation à 72°C pendant 70 secondes  
 Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes

### III.7. Analyse de l'ADN par électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet la séparation des acides nucléiques en fonction de leur taille. Les acides nucléiques (chargés négativement) migrent à travers le gel d'agarose sous l'effet d'un champ électrique. Plus les molécules sont petites, plus elles migrent loin. Le pourcentage en agarose du gel influe sur la migration. Pour pouvoir séparer des fragments d'ADN de petites tailles, un gel riche en agarose est nécessaire. Pour la plupart des analyses d'acides nucléiques effectuées durant cette thèse, un gel d'agarose à 1,2% a été utilisé avec 0,006% de BET. Le BET est un agent fluorescent sous UV qui s'intercale entre les bases de l'ADN. Cet agent permet de visualiser sous UV les bandes d'ADN sur le gel. De manière générale, les échantillons sont déposés à hauteur de 3 à 5  $\mu\text{L}$  additionné de 2  $\mu\text{L}$  de bleu de dépôt 5 fois concentré ou 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon additionné de 5  $\mu\text{L}$  de bleu de dépôt 5 fois concentré lorsqu'il s'agit de digestion par enzyme de restriction. Le bleu de dépôt contient du glycérol pour faciliter le dépôt de l'échantillon dans le puits et du bleu de bromophénol, qui permet de suivre la migration en temps réel grâce à sa charge négative.

Un courant électrique appliqué à l'aide d'un générateur permet la migration. Plus le voltage est important, plus la migration est rapide. De manière générale, la migration s'est effectuée à environ 100 V pour les expérimentations menées lors de ce travail de thèse. Le marqueur de taille utilisé est le GeneRuler 1 kb de Fermentas (Courtaboeuf, France) (Figure 19).

### III.8. Purification des produits PCR

Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (Quiagen, Courtaboeuf, France). Brièvement, le volume de produit PCR est repris dans 5 volumes de tampon de liaison à la silice de la colonne de purification. Après centrifugation et élimination du tampon contenu dans le tube collecteur, 700  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage sont ajoutés sur la colonne et éliminés par centrifugation. Les fragments PCR purs sont élués par 35  $\mu\text{L}$  d'eau

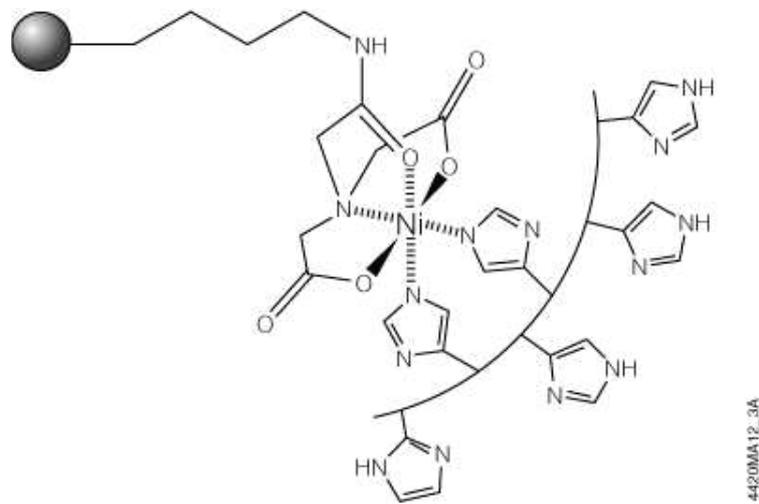


Figure 20 : Liaison entre le nickel de la résine accrochée par le groupe nitriloacétique et les atomes d'azote de la chaîne latérales des résidus histidines (Promega).

ultra pure.

### III.9. Digestion par enzymes de restriction

Les digestions enzymatiques des plasmides et fragments PCR sont effectuées par des enzymes de restriction. Les digestions sont faites dans les tampons adaptés à chaque enzyme fournis par le fabricant avec 1  $\mu\text{L}$  d'enzymes pour 50  $\mu\text{L}$  final. Les doubles digestions peuvent être effectuées avec les 2 enzymes en même temps si celles-ci ont la même température optimale d'activation ainsi qu'un tampon de réaction compatible. Si ce n'est pas le cas, les digestions peuvent se faire successivement.

### III.10. Ligature

Les ligatures sont effectuées dans 30  $\mu\text{L}$  de volume final avec du tampon de ligature fourni par le fabricant, le double de volume d'insert par rapport au volume de vecteur et 2 U de T4 DNA ligase. Les réactions de ligature sont faites 1 h à 22°C. La ligase est ensuite inactivée par 10 minutes d'incubation à 65°C.

## IV. Préparation des cellules d'*E. coli* électrocompétentes

A partir d'une préculture de nuit, une culture de 100 mL d'*E. coli* ensemencée à  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,05$  est incubée à 37°C sous agitation. Lorsque la culture atteint une  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,5$ , les cellules sont récoltées par centrifugation (8000 rpm, 10 minutes) et lavées 2 fois à l'aide de 50 mM d'eau déminéralisée froide (4°C). A l'issue des lavages, une dernière centrifugation (8000 rpm, 10 minutes, 4°C) est effectuée et le culot final de cellules est repris par du glycérol 20% dans  $1/100^{\text{ème}}$  du volume de culture initial.

## V. Techniques de purification de protéines

### V.1. Principe

Les gènes codant les protéines d'intérêt ont été préalablement clonés dans le vecteur pQE30 permettant la synthèse d'une protéine fusionnée à une étiquette de 6 histidines. La technique de purification utilise l'affinité du nickel (lié à une résine par du nitriloacétique : résine Ni-NTA) pour l'azote des chaînes latérales des histidines de l'étiquette 6-histidines des protéines (Figure 20). Après plusieurs lavages pour éliminer les protéines liées non spécifiquement à la résine, les protéines pures sont éluées avec une solution contenant de



l'imidazole, qui est un compétiteur de l'histidine pour le nickel. Les échantillons de protéines pures sont ensuite mis en dialyse dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 pour éliminer l'imidazole des échantillons.

### **V.2. Surproduction de protéines possédant une étiquette 6-histidine**

Les gènes clonés dans le vecteur pQE30 sont sous le contrôle du promoteur T5 lui-même sous le contrôle de l'opérateur *lacO*. Le répresseur LacI, naturellement présent en grande quantité chez *E. coli* dans un contexte *lacI<sup>q</sup>*, empêche la transcription des gènes sous son contrôle en se fixant sur l'opérateur *lacO* situé sur le vecteur pQE30 en amont de la cassette de clonage. En présence d'IPTG (inducteur) le répresseur LacI change de conformation et n'est plus capable de se fixer sur l'opérateur *lacO*. Ainsi le promoteur T5 devient accessible, la transcription suivie de la traduction des protéines clonées dans la cassette de clonage va pouvoir s'effectuer. La transcription des gènes clonés est induite par 1 mM d'IPTG pendant 3h lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} = 0,5$ ).

### **V.3. Purification en conditions natives**

Les cellules sont récoltées par centrifugation puis cassées à l'aide d'une presse de French dans du tampon A (tris-HCl 50 mM pH 7,5/NaCl 300 mM/ $\beta$ -mercaptoethanol 1 mM/EDTA 1 mM/PMSF 1 mM/glycérol 10%). Les débris cellulaires sont centrifugés à 4°C (14000 rpm, 10 minutes). Le surnageant est incubé avec de la résine Ni-NTA pendant 1h à 4°C. La protéine se fixe sur le nickel de la résine par affinité via l'étiquette 6 histidines. Les protéines étiquetées sont récupérées par 4 éluions de 300  $\mu$ L de tampon A additionné de 150 mM d'imidazole après 2 lavages de 2 mL avec le tampon A sans imidazole, 2 lavages de 2 mL le tampon A additionné de 10 mM d'imidazole et 2 lavages de 1 mL de tampon A additionné de 20 mM d'imidazole pour éliminer les protéines fixées aspécifiquement.

### **V.4. Purification en conditions dénaturantes suivie d'une renaturation**

Les cellules sont récoltées par centrifugation puis lysées dans un tampon 1 ( phosphate de sodium 100 mM pH 8/ urée 8 M/ lysozyme 20 mg.mL<sup>-1</sup>) pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation douce. Les débris cellulaires sont centrifugés à 4°C (14000 rpm,

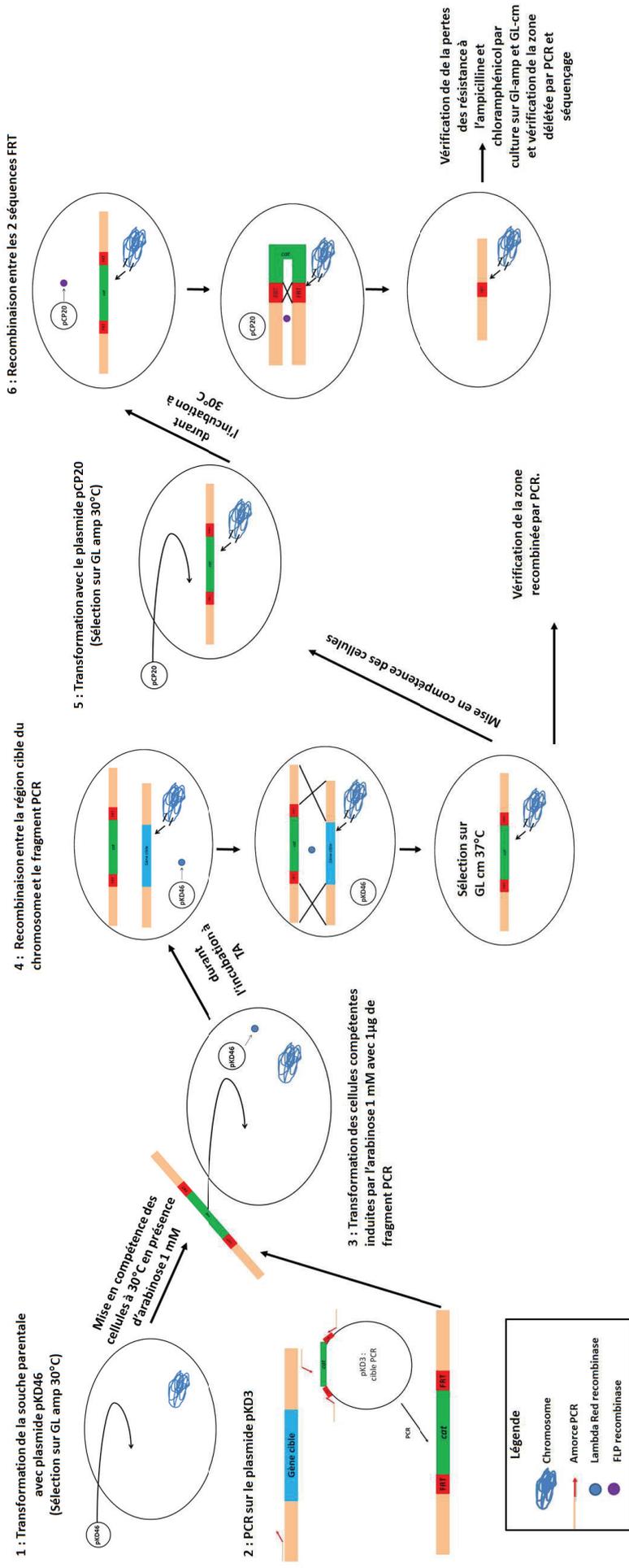
Protéine	Nombre acides aminés	Taille théorique en kDa
AzoR	201	22,110
NfsA	240	26,400
NfsB	217	23,970
AzoA	208	22,880
EF0404	211	23,210
EF0648	205	22,550
EF0655	198	21,781
EF1181	244	26,840

Tableau 24 : Taille théoriques des sous-unités des protéines purifiées lors de la thèse.

10 minutes). Le surnageant est incubé avec la résine Ni-NTA pendant 1 h à 4°C. Un premier lavage est fait avec du tampon 1 (4 mL) suivi de 2 lavages avec 4 mL de tampon 6 (phosphate de sodium 100 mM pH 6,3/ urée 8 M) pour éliminer le maximum de protéines fixées non spécifiquement. Les protéines fixées sur la colonne sont renaturées en diminuant progressivement la concentration en urée (8 M à 0 M) à l'aide d'une pompe péristaltique. Le gradient de concentration s'écoule avec un débit de 0,5 mL par minute. A l'issue du gradient, un lavage avec 2 mL de tampon 3 (phosphate de sodium 100 mM pH 7,5/imidazole 10 mM) et un lavage avec 2 mL de tampon 4 (phosphate de sodium 100 mM pH 7,5/imidazole 20 mM) sont réalisés pour éliminer le reste des protéines fixées aspécifiquement. Les protéines étiquetées renaturées sont récupérées par élution avec le tampon 5 (phosphate de sodium 100 mM pH 7,5/imidazole 150 mM) (4 x 300 µL).

### **V.5. Analyse des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium**

Cette méthode découle de celle décrite par Laemmli *et al* en 1970 (95). Le dodécylsulfate de sodium (SDS), chargé négativement, se lie aux protéines et les charge négativement pour permettre une migration en fonction du poids moléculaire uniquement. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 minutes dans un mélange volume à volume entre l'échantillon et une solution Tris-HCl 0,5 M pH 6,8/ SDS 2%/glycérol 20%/ bleu de bromophénol  $5 \cdot 10^{-4}\%$ /  $\beta$ -mercapto ethanol 100 µM). Le  $\beta$ -mercapto ethanol et les 5 minutes dans l'eau bouillante permettent la dénaturation des protéines et la destruction des ponts disulfures entre les polymères éventuels. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits du gel. Le gel est constitué d'un gel de concentration (polyacrylamide/bisacrylamide (37,5 :1) 6%,Tris-HCl 0,125 M pH 6,8/SDS 0,1%/ APS 0,1%/ TEMED 0,1%) et d'un gel de séparation (polyacrylamide/bisacrylamide (37,5 :1)/ tris-HCl 0,375 M pH 8,8/ SDS 0,1%/ APS 0,1%/ TEMED à 0,1%). Le TEMED et l'APS sont des agents de polymérisation de l'acrylamide et bisacrylamide. Le gel de séparation contient un pourcentage de polyacrylamide qui varie en fonction de la taille des protéines à étudier (Tableau 24). Plus la concentration en polyacrylamide est élevée, plus les protéines de petits poids moléculaires seront bien séparées. De manière générale, les gels utilisés durant cette thèse contenaient 12 à 15% de polyacrylamide.

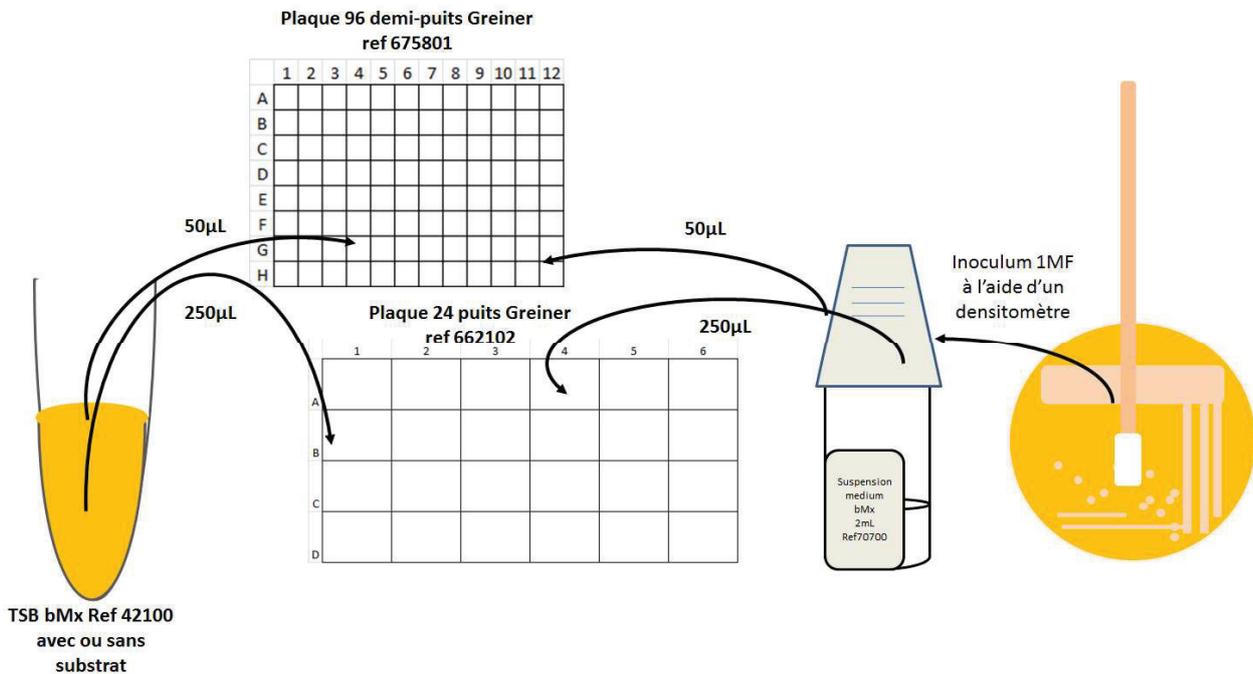


**Figure 21 :** Schéma de stratégie de mutagenèse dirigée.

1 : les cellules de la souche parentale sont mises en compétence et transformées avec le plasmide thermosensible pKD46. En parallèle, 2) production du fragment PCR contenant la cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*) encadrée des séquences FRT à partir du plasmide pKD3 comme cible PCR. 3) Les cellules obtenues en 1) sont rendues compétentes à 30°C en présence d'arabinose 1 mM pour induire l'expression de l'enzyme Lambda red recombinase. La souche parentale pour laquelle l'enzyme Lambda red recombinase a été induite est transformée avec le fragment PCR construit en 1),4) Lors de l'incubation à température ambiante (TA) avant étalement sur GL-cm la recombinaison entre le fragment PCR et la zone du gène à déléter s'effectue. Les clones résistants au chloramphénicol sont vérifiés par PCR pour vérifier la zone de recombinaison. 5) Les cellules des clones pour lesquels la recombinaison est correcte sont rendues compétentes et transformées avec le plasmide thermosensible pCP20. 6) Lors de l'incubation à 30°C la FLP recombinase codée par le plasmide pCP20 catalyse la recombinaison entre les 2 séquences FRT pour exciser la cassette de résistance au chloramphénicol. La délétion du gène d'intérêt et l'excision de la cassette de résistance au chloramphénicol sont vérifiées par PCR sur des clones sensibles à l'ampicilline et au chloramphénicol.

## VI. Stratégie de mutagénèse

La stratégie de mutagénèse repose sur la méthode décrite par Datsenko et Wanner en 2000 (44). Le principe général est de transformer les cellules avec un fragment PCR dont les extrémités sont homologues avec les régions flanquantes du gène cible. La partie interne du fragment PCR comprend une cassette de résistance au chloramphénicol encadrée de 2 séquences FRT (Figure 21,2). Les cellules transformées avec ce fragment PCR (Figure 21,3) ont été préalablement transformées avec le plasmide thermosensible pKD46 codant pour l'enzyme Lambda Red recombinaise dont l'expression est induite par 1 mM d'arabinose (Figure 21,1). Cette enzyme permet la recombinaison entre le fragment PCR et la région cible (Figure 21,4). Après une sélection des clones recombinants par résistance au chloramphénicol, les clones positifs sont transformés avec le plasmide thermosensible pCP20 codant pour la FLP recombinaise et sont sélectionnés par résistance à l'ampicilline (Figure 21,5). Cette recombinaise reconnaît spécifiquement les séquences FRT et peut exciser la cassette de résistance au chloramphénicol en laissant seulement une cicatrice de séquence FRT (Figure 21,6). A l'issue de cette étape, toutes les résistances aux antibiotiques chloramphénicol et ampicilline sont perdues. Pour vérification, une étape de culture est faite à 42°C pour perdre les plasmides thermosensibles et une vérification des résistances est faite sur les milieux gélosés GL-amp ou GL-cm.



**Figure 22 : Schéma de préparation des plaques pour le suivi des activités enzymatique cellulaires.**

Le milieu de culture TSB avec ou sans substrat est réparti dans les puits de la plaque à hauteur de 50 µL par puits d'une plaque 96 puits ou 250 µL par puits d'une plaque 24 puits. L'inoculum de microorganismes est préparé à 1 MF (unité McFarland) dans l'eau déminéralisée (suspension medium) et réparti dans les puits à hauteur de 50 µL par puits d'une plaque 96 puits ou 250 µL par puits d'une plaque 24 puits pour obtenir un inoculum final de 0,5 MF par puits.

## VII. Test de réduction des substrats enzymatiques

Pour l'étude de la réduction des substrats, 2 types de plaques UV Star® fournie par Greiner BioOne (Courtaboeuf, France) ont été utilisées :

96 demi-puits (référence 675801)

24 puits (référence 66210102)

Ces plaques sont faiblement autofluorescentes ce qui permet des mesures en fluorescence sur une grande gamme de longueurs d'ondes d'excitation/émission. Cependant, les couvercles associés aux plaques ne sont pas toujours compatibles avec les longueurs d'ondes utilisées pour les mesures en fluorescence. C'est pourquoi, les plaques utilisées lors de nos expériences sont recouvertes d'un film à autofluorescence minimale pour éviter l'évaporation pendant une longue incubation et permettre des mesures de fluorescence à toutes les longueurs d'ondes voulues (films VIEWseal, référence 676070, Greiner BioOne, Courtaboeuf, France).

### VII.1. Réduction enzymatique

#### VII.1.1. Cellules entières

Les plaques sont préparées selon le schéma général prévu en figure 22 pour l'étude des activités enzymatiques cellulaires avant d'être recouvertes d'un film à autofluorescence minimale Viewseal. Au final, 100  $\mu\text{M}$  de substrat sont testés avec une concentration cellulaire finale équivalente à 0,5 McFarland (MF). L'unité McFarland est un standard utilisé en microbiologie pour ajuster la turbidité d'une suspension bactérienne correspondant à une concentration cellulaire. 0,5 MF correspond à une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,132 et à  $1,5 \cdot 10^8 \text{ cellules.mL}^{-1}$  (117).

#### VII.1.2. Enzymes pures

Lors de l'étude des activités enzymatiques des enzymes pures, l'ordre privilégié pour la répartition des différents composants des 100  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel dans les puits est :

- 1) tampon phosphate de sodium 50 mM pH7
- 2) substrat 100  $\mu\text{M}$
- 3) FMN 5  $\mu\text{M}$
- 4) Enzyme pure (quantités utilisées comprises entre 0,1 et 1  $\mu\text{g}$ )

M200Pro



M1000



Figure 23 : Lecteurs de plaque Infinite® M200pro et M1000.

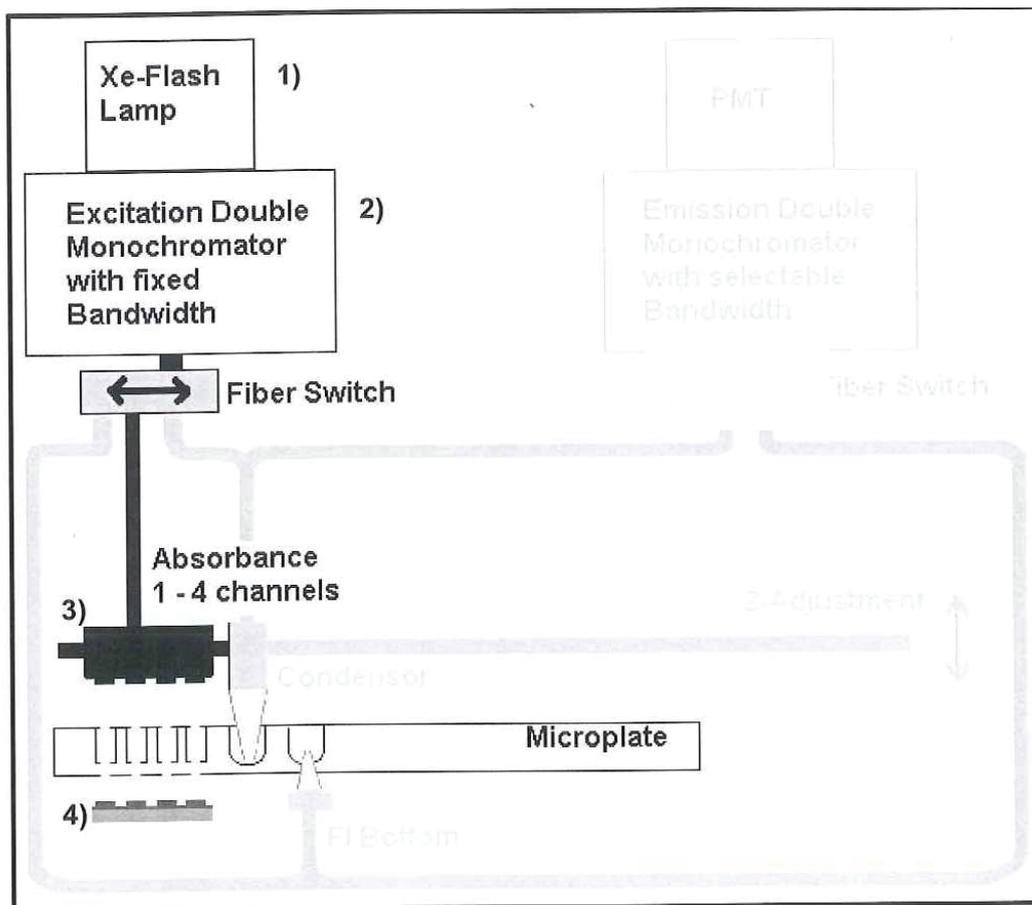


Figure 24 : Système optique de mesure d'absorbance du lecteur de plaque Infinite M1000.

Ce système optique est constitué d'une source lumineuse au xénon (1), le monochromateur d'excitation (2). Une fibre guide la lumière vers le système optique (3) qui cible la lumière dans les puits. La lumière transmise est mesurée par des photodiodes silicines localisées sous la plaque (4). Le système du lecteur M1000 permet la lecture de 4 puits en même temps alors que celui du M200 ne permet la lecture que d'un puits à la fois (Tecan SA).

5) NAD(P)H (concentrations utilisées comprises entre 0,1 et 0,5 mM)

Les puits sont ensuite recouverts d'un film à autofluorescence minimale Viewseal.

### VII.1.3. Incubation

Une fois préparées, les plaques sont directement déposées dans le lecteur de plaque. L'incubation et les lectures sont ensuite effectuées selon les méthodes exposées ci-après. En dehors des longueurs d'ondes spécifiques des substrats qui ont été déterminées durant l'étude, des longueurs d'ondes d'absorbance ont été utilisées pour le suivi d'autres paramètres comme la croissance à 660 nm (longueur d'onde utilisée par le système Vitek2 pour le suivi de la croissance) et le NAD(P)H à 340nm.

## VII.2. Présentation du lecteur de plaque Infinite®

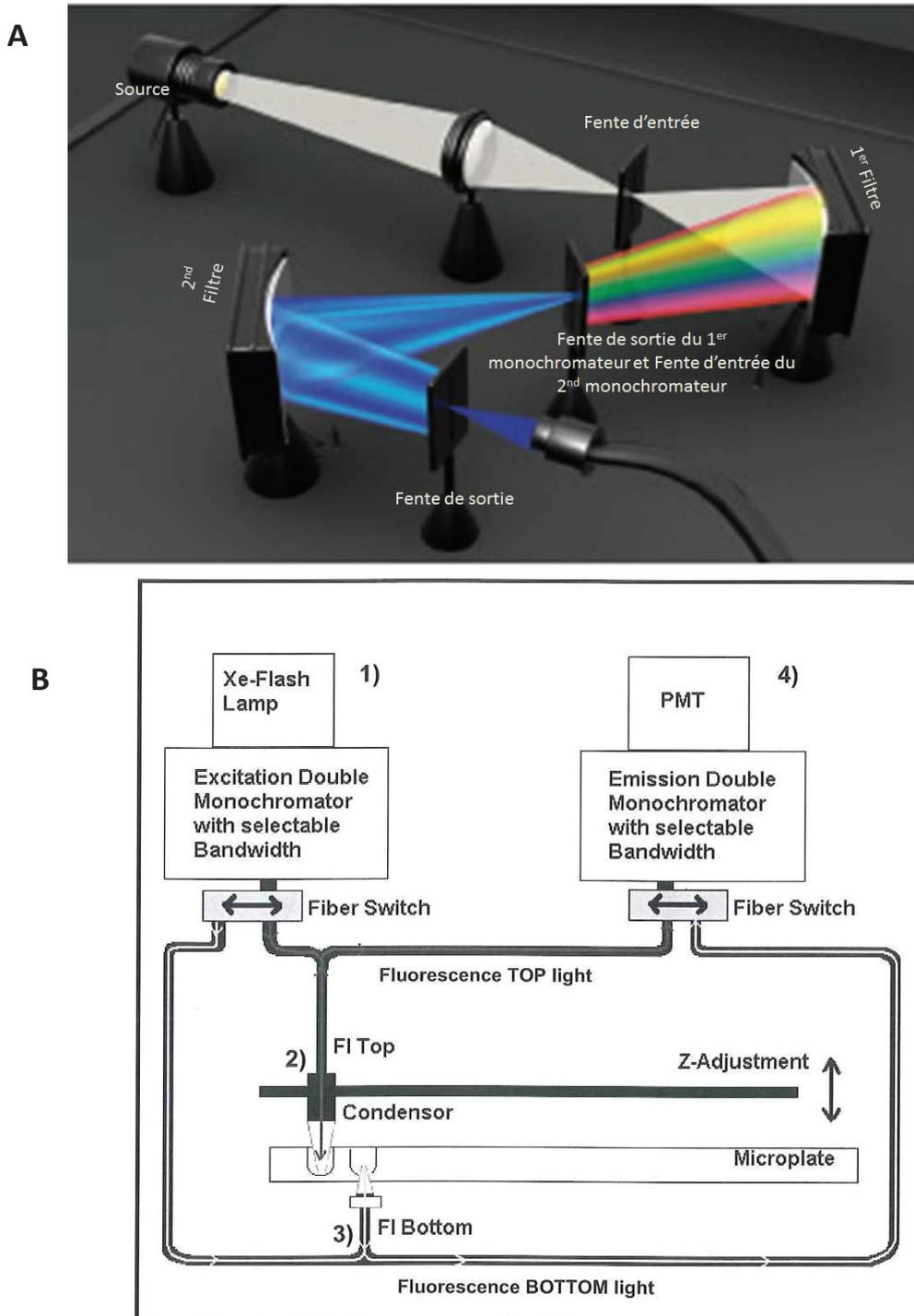
Les mesures d'absorbance et de fluorescence ont été réalisées sur un lecteur de microplaque Infinite® de la société Tecan. Plusieurs modèles ont été utilisés : M200, M200pro et M1000. Les résultats ont été essentiellement obtenus avec les lecteurs M200 et M1000 (Figure 23).

### VII.2.1. Système d'absorbance

L'absorbance correspond à la capacité d'un milieu d'absorber la lumière qui le traverse. L'absorbance est également appelée densité optique notée DO. L'absorbance est définie par le logarithme de base dix du rapport entre l'intensité lumineuse  $I_0$ , à une longueur d'onde  $\lambda$ , avant traversée du milieu, et l'intensité lumineuse transmise  $I$ .

L'absorbance diffère selon la nature de la substance étudiée, selon la longueur d'onde sous laquelle elle est analysée, et selon la concentration de cette substance dans le milieu traversé. Ce milieu peut être solide, liquide ou gazeux, pour autant qu'il soit homogène.

Les systèmes optiques des lecteurs Infinite®M200 et M1000 sont constitués d'un condensateur qui concentre la lumière au niveau du filtre d'excitation et ensuite par la fente d'entrée du monochromateur d'excitation. Ce dernier est appelé ainsi car il est également utilisé pour l'excitation lors des mesures de fluorescence. Un paquet de fibre guide alors la lumière du monochromateur d'excitation vers le système optique d'absorbance, qui concentre la lumière dans les puits. Le module de mesure est placé au-dessous du



**Figure 25 : Système optique de fluorescence des lecteurs de plaque Infinite® M1000 et M200.**

A) Double monochromateur. La lumière blanche passe à travers la fente d'entrée et arrive sur un 1<sup>er</sup> filtre par lequel elle est diffractée et oriente la longueur d'onde souhaitée vers la première fente de sortie qui est la fente d'entrée du second monochromateur (Tecan SA). B) Schéma du système optique des lecteurs de plaque Infinite® M1000 et M200. Ce système est constitué d'une source lumineuse au xénon (1), d'optiques vue du dessus de la plaque (2), d'optiques vue du dessous (3) et de l'unité de détection de la fluorescence (4) (Tecan SA). Ce système permet de choisir entre les mesures de fluorescence par le dessus des puits ou par le dessous des puits. (PMT = photomultiplicateur).

transporteur de plaque. Ce module mesure la lumière transmise à travers l'échantillon (Figure 24).

### VII.2.2. Système de fluorescence

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par le retour d'un état excité à un état de repos d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée. Les systèmes optiques des lecteurs Infinite®M200 et M1000 possèdent un double monochromateur pouvant balayer les longueurs d'ondes de 230 nm à 1000 nm (Figure 25A). Un monochromateur est constitué d'une fente d'entrée, d'un élément dispersif et d'une fente de sortie. L'élément dispersif diffracte la lumière dans son spectre optique et la projette sur la fente de sortie. La rotation de l'élément dispersif déplace le spectre à travers la fente de sortie pour choisir la longueur d'onde désirée. En principe, l'élément dispersif pourrait être réalisé en utilisant le verre ou des prismes de silice. Cependant, les monochromateurs de Tecan sont conçus avec des filtres holographiques concaves de pointe pour une meilleure efficacité (Tecan SA, Männedorf, Suisse).

La notion de gain est importante à intégrer lors de l'utilisation de ce type de lecteur pour des mesures de fluorescence. La notion de gain est liée à la présence d'un photomultiplicateur (PMT) (Figure 25B). Le gain est un facteur propre à chaque appareil permettant d'amplifier le signal. Une solution peut être très peu fluorescente mais avoir des valeurs élevées de RFU si le gain est important. Les résultats obtenus avec 2 appareils ne peuvent donc être comparés que de manière qualitative et non de manière quantitative. Dans le cadre de nos études, le lecteur M200 a été utilisé avec un gain de 70 et le lecteur M1000 avec un gain de 100. Le niveau de fluorescence va également dépendre de la puissance de la lampe et de la largeur de la fente d'excitation et d'émission.

### VII.2.3. Spectre d'absorbance

Les spectres d'absorbance sont faits selon la méthode suivante dans des plaques 96 demi-puits :

- balayage de la DO sur la gamme de longueur d'onde de 200 nm à 1000 nm avec une mesure de DO tous les nanomètres.
- une mesure est le résultat de 5 impulsions électriques dans le puits.



- un temps de repos de 5 ms est défini entre chaque mesure. Ce temps de repos est valable pour toutes les expériences en plaque 96 puits mais peut être augmenté à 500 ms pour les expériences en plaque 24 puits.

#### VII.2.4. Spectres de fluorescence

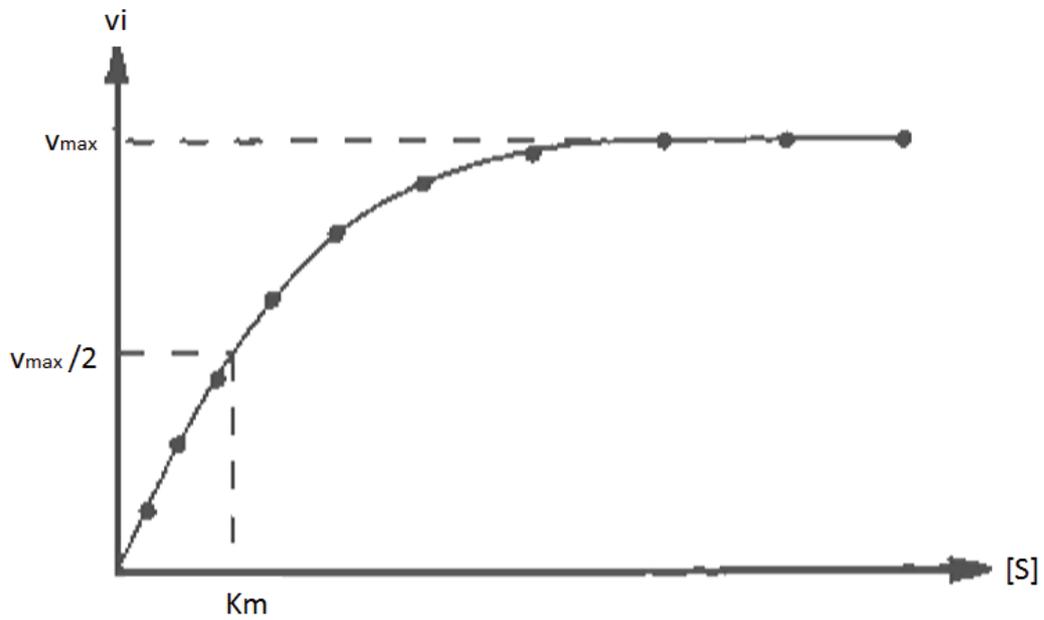
Afin de définir les propriétés de fluorescence d'un milieu il est nécessaire de déterminer les longueurs d'ondes maximales d'excitation et d'émission. La longueur d'onde d'excitation est inférieure (plus énergétique) à la longueur d'onde d'émission. Le premier scan d'émission est effectué en fixant la longueur d'onde d'excitation à la longueur d'onde maximale d'absorbance ( $\lambda_{\text{max abs}}$ ). Le scan d'émission est obtenu avec une mesure tous les nanomètres sur une gamme de longueur d'onde allant de  $\lambda_{\text{max abs}} + 30$  nm jusqu'à 1000 nm avec un gain calculé à partir du puits lui-même ou fixé manuellement.

Une fois le spectre d'émission obtenu, un spectre d'excitation est effectué en fixant la longueur d'onde d'émission à la longueur d'onde maximale obtenue sur le spectre d'émission obtenu précédemment.

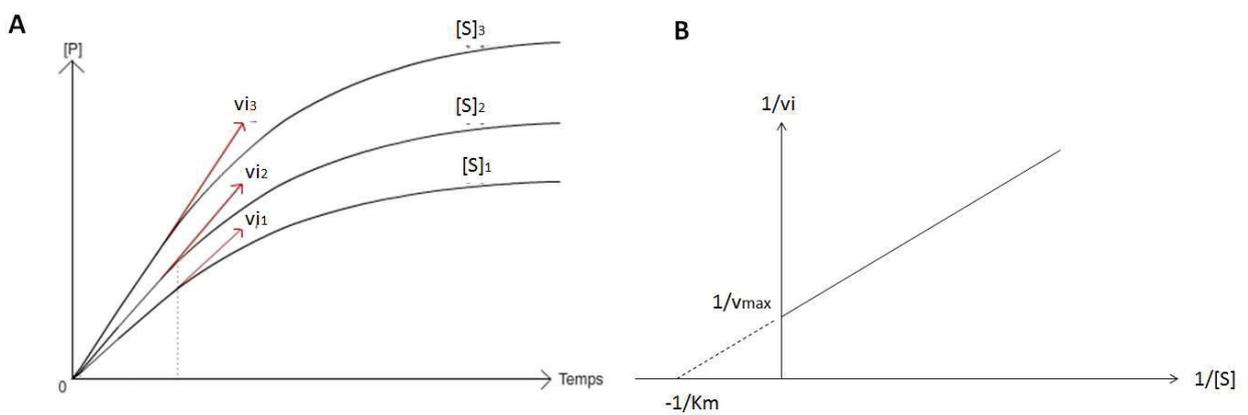
Les longueurs d'ondes d'excitation obtenues sont utilisées pour faire de nouveaux spectres d'émission. L'alternance entre spectre d'excitation et spectre d'émission se déroule jusqu'à l'obtention du couple de longueurs d'ondes d'excitation/émission optimal pour visualiser la meilleure intensité de fluorescence.

#### VII.2.5. Cinétique de réduction

Les études de réaction de réduction par les cellules en croissance et par les enzymes pures ont été réalisées sur les mêmes appareils que les spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission des différents substrats testés. Les réactions enzymatiques ont été suivies par cinétique à 35°C sur plusieurs heures avec des fréquences de mesure allant de 30 secondes à 1 h. La température de 35°C est la température d'incubation recommandée pour les échantillons contenant des germes mésophiles et analysés par les systèmes TEMPO® et Vitek®2. Dix mesures de fluorescence et/ou absorbance par lecture de puits peuvent être paramétrées au maximum pour une cinétique. Pour l'étude de réduction d'un substrat par des cellules en croissance, 3 mesures sont généralement paramétrées : la croissance par absorbance à 660 nm, la disparition (sous forme de décoloration par exemple) du substrat par absorbance à la longueur d'onde maximale d'absorbance déterminée par le spectre



**Figure 26 : Cinétique suivant l'équation de Michaelis-Menten.**  
 Représentation directe de la vitesse ( $v_i$ ) en fonction de la concentration en substrat  $[S]$ .



**Figure 27 : Représentation de la concentration de produit formé en fonction du Temps (A) pour la détermination des vitesses initiales ( $v_i$  = coefficient directeur des tangentes à  $t=0$ ) utilisées pour la représentation en double inverse (B)**

d'absorbance de la molécule et l'apparition d'un produit de réduction fluorescent aux longueurs d'ondes déterminées par les spectres d'excitation et d'émission. Si besoin, l'agitation orbitale est paramétrée durant des temps de 870 secondes (14,5 minutes) entrecoupés d'une pause de 30 s avec une amplitude de 6 mm et les mesures sont faites toutes les 15 minutes pour permettre d'avoir une agitation continue. Le paramètre agitation est utilisé avec les plaques 24 puits. Dans ces cas là, le temps de lecture entre deux puits doit être augmenté à 500 ms pour laisser le temps au milieu réactionnel de se stabiliser et permettre des mesures d'absorbance correctes. En plaque 96 demi-puits, ce temps de repos est défini à 5 ms (cf VII.2.3).

## VIII. Notions d'enzymologie

### VIII.1. Définitions

Les enzymes dites Michaëliennes sont caractérisées par différents paramètres que sont la constante d'affinité de Mickaëlis ( $K_m$ ) et la vitesse maximale que peut atteindre la réaction lorsque l'enzyme est saturée en substrat ( $v_{max}$ ). Ces paramètres peuvent être déterminés aisément dans les cas de cinétique suivant l'équation de Mickaëlis-Menten :

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S_0]}{[S_0] + K_m}$$

où  $v_0$  est la vitesse initiale de la réaction enzymatique et  $[S_0]$  est la concentration initiale en substrat (Figure 26).

### VIII.1. Méthode de Lineweaver et Burke

Expérimentalement, il n'est pas possible de déterminer le paramètre  $v_{max}$  précisément. Il existe différentes représentations graphiques permettant de déterminer les valeurs de  $K_m$  et  $v_{max}$  : représentations de Hanes et Woolf, Eadie et Hofstee, Schwarzenbach mais la plus connue et la plus couramment utilisée est la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk (Figure 27). Cette représentation permet d'obtenir la droite d'équation:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max} \cdot [S_0]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Cette représentation graphique est construite à partir de la détermination de la vitesse



initiale de réaction pour différentes concentrations initiales de substrat (Figure 27A). Tous les autres facteurs (pH 7, température 35°C, la quantité d'enzyme, le temps d'incubation) sont maintenus constants. Dans le cas où le niveau de fluorescence ou d'absorbance est proportionnel à la quantité de produit formée, les valeurs de fluorescence ou d'absorbance peuvent être reliées à la vitesse initiale de la réaction grâce à la relation :

$$v = - \frac{d([\text{substrat}])}{dt} = \frac{d([\text{produit}])}{dt}$$

A partir de là, l'inverse de la vitesse initiale ( $v_i$ ) peut être représenté en fonction de l'inverse de la concentration de substrat utilisée ( $[S]$ ) (Figure 27B) et les constantes enzymatiques  $K_m$  et  $v_{\max}$  peuvent être déterminées graphiquement.

La représentation en double inverse permet d'obtenir une droite d'équation  $y = ax+b$  (Figure 27B). L'abscisse d'ordonnée nulle ( $y=0$ ) est égale à l'opposé de l'inverse de la valeur de  $K_m$  (soit  $x = -1/K_m$ ) donc :

$$a(-1/K_m)+b = 0$$

$$-b = -a/K_m$$

$$K_m = a/b$$

L'ordonnée d'abscisse nulle ( $x=0$ ) est égale à l'inverse de  $v_{\max}$  (soit  $y = 1/v_{\max}$ ) donc :

$$b = 1/v_{\max}$$

$$v_{\max} = 1/b$$

Une fois la représentation en inverse obtenue, il suffit donc de déterminer l'équation de la droite obtenue pour déterminer les valeurs de  $K_m$  et  $v_{\max}$ .

## IX. Méthode d'analyse par UPLC

### IX.1. Réduction chimique du substrat 7NCCA

Le 7NCCA 2,5mM a été réduit par différentes concentrations de dithionite de sodium : 5, 10, 20 et 40 mM. Ces différentes solutions ont été reprises dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 pour obtenir des solutions à 100  $\mu$ M de 7NCCA réduit sous ses différentes formes théoriques (concentration théorique).

### IX.2. Réduction enzymatique

La réduction enzymatique a été réalisée dans un mélange réactionnel contenant



100  $\mu\text{M}$  de 7NCCA, 0,5 mM de NADH et une enzyme à 10 ng / $\mu\text{L}$ .

A  $t=0$ , deux prélèvements sont effectués : un pour obtenir un témoin sur UPLC, l'autre pour suivre la réaction sur Infinite M200 pendant la durée de l'expérience (29 h). Le mélange est ensuite placé en étuve à 35°C.

Des prélèvements dans le mélange réactionnel sont effectués à différents temps au cours de la réaction. Pour chaque échantillon prélevé, la fluorescence est mesurée. L'enzyme est éliminée du mélange par rétention sur une colonne contenant de la résine Ni-NTA. Le filtrat est récupéré. La fluorescence est mesurée. L'échantillon est analysé par UPLC.

Entre chaque échantillon, la résine Ni-NTA est lavée avec 200  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate de sodium pH 7.

### IX.3. Méthode UPLC

Une chaîne UPLC Aquity Waters a été utilisée avec une colonne UPLC BEH Waters thermostatée à 30°C qui contient une phase stationnaire constituée de particules de silice hybrides à pont éthane (BEH : Ethylene Bridged Hybrid) de 1,7  $\mu\text{M}$ . Son diamètre interne est de 2,1 mm et sa longueur de 50 mm. La détection des composés se fait par lecture d'absorbance à 339 nm.

Le débit utilisé est de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pour un volume injecté de 1  $\mu\text{L}$ . Le solvant organique utilisé est de l'acétonitrile. Un gradient d'acétonitrile est formé avec du tampon phosphate de potassium pH7 de la manière suivante :

Temps	Rapport des volumes Acétonitrile/Tampon phosphate de potassium en %
0 à 2 min	0/100
2 à 4 min	20/80
4 à 6min	50/50

Entre chaque injection, un rinçage est fait avec un mélange volume à volume d'acétonitrile et de tampon phosphate de potassium puis un re-équilibre sur 4 minutes.

## X. Méthode d'analyse par spectrométrie de masse

La recherche de flavine dans les échantillons protéiques a nécessité une analyse par spectrométrie de masse. Un spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes : une source, un analyseur et un détecteur. Les espèces ionisées amenées en phase gazeuse

<i>Espèce</i>	<i>Carte identification</i>	<i>Carte antibiogramme</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		AST-N123
<i>Cronobacter muytjensii/</i>		AST-N123
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Vitek®2 GN	
<i>Escherichia coli</i>		AST-N123
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		AST-N093
<i>Enterococcus faecalis</i>		AST-P606
<i>Kocuria rosea</i>		AST-P606
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vitek®2 GP	AST-P581
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		AST-P581
<i>Candida albicans</i>		
<i>Geotrichum candidum</i>	Vitek®2 YST	AST-YS

Tableau 25 : Cartes Vitek®2 utilisées pour l'identification et l'antibiogramme des souches de microorganismes testés.

au sein de la source sont séparées par l'analyseur suivant leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) avant d'atteindre le détecteur. Les protéines pures ont été analysées par spectrométrie de masse après avoir été digérées par la trypsine. Le protocole de digestion tryptique utilisé consiste en l'ajout de 70  $\mu\text{L}$  de DTT à 90 mM pour dénaturer 50  $\mu\text{g}$  d'échantillon de protéine ajusté à 400  $\mu\text{L}$  avec du tampon bicarbonate 50 mM pH 8. Après une incubation à 60°C pendant 30 minutes et une remise à température ambiante par un passage de 5 min à 4°C, 110  $\mu\text{L}$  de IAA à 150 mM sont ajoutés pour l'alkylation des protéines. Suite à 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité, 2,5  $\mu\text{g}$  de trypsine sont ajoutés au mélange. Une fois la trypsine ajoutée, la digestion se passe à 37°C pendant 2 h.

Les échantillons digérés sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide (HPLC) sur une chaîne chromatographique NanoLC-Ultra® System de chez Eksigent puis analysés par un appareil de spectrométrie de masse ESI-MS-Q-Trap (quadripole-piège ionique) (appareil AB SCIEX TripleTOF® 5600 System). Tout d'abord une analyse est faite en mode TOF puis en mode MS-MS en ciblant la flavine comme produit à fragmenter.

## **XI. Identification et antibiogrammes des souches de microorganismes par le système Vitek®2**

L'inoculum est ajusté entre 0,5 MF et 0,63 MF (McFarland) pour les souches bactériennes et entre 1,80 MF et 2,2 MF pour les souches de levures à l'aide d'un densichek®. Les cartes d'identification adaptées à chaque germe (Tableau 25) sont plongées dans les tubes contenant la suspension bactérienne. La carte d'antibiogramme adaptée est placée dans un tube vide à côté de la carte d'identification correspondante. Les cartes sont ensuite placées dans le Vitek®2. Les dilutions pour les antibiogrammes se font de manière automatisées par le Vitek®2 à partir des suspensions faites pour les cartes d'identification. L'identification des germes se fait par comparaison de l'ensemble des résultats des tests biochimiques de la carte avec la base de données Vitek®2. Les cartes d'antibiogrammes contiennent différents antibiotiques à différentes concentrations. Le système Vitek®2 permet de déterminer les CMI et les phénotypes de résistance en comparant les résultats obtenus avec sa banque de données.



# RESULTATS

Bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gram positif
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	<i>Staphylococcus aureus (S. aureus)</i>
<i>Cronobacter muytjensii (C. muytjensii)/Cronobacter sakazakii (C. sakazakii)</i>	<i>Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)</i>
<i>Acinetobacter baumannii (A. baumannii)</i>	<i>Enterococcus faecalis (E. faecalis)</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)</i>	<i>Kocuria rosea (K. rosea)</i>

Levures
<i>Geotrichum candidum (G. candidum)</i>
<i>Candida albicans (C. albicans)</i>

Figure 28 : Liste des espèces de microorganismes testées.

## I. Etude de la répartition des activités réductase au sein des microorganismes

Les activités réductases sont présentes chez un grand nombre de microorganismes. Dans un souci de développement de tests de diagnostic, il était important de commencer par évaluer l'homogénéité intra-spécifique et inter-spécifique des activités réductases chez des espèces microbiennes intéressantes d'un point de vue clinique et/ou industriel.

La réduction de 9 substrats par 10 espèces, chacune représentée par 10 souches, a donc été étudiée.

### I.1. Sélection des souches

Dix espèces ont été sélectionnées de façon à représenter les principales classes des microorganismes procaryotes (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif) et eucaryotes (levures/moisissures) d'intérêt (Figure 28). Pour chaque espèce, 10 souches ont été sélectionnées. La sélection des souches s'est faite de manière à avoir des origines variées que ce soit géographiquement ou chronologiquement. Toutefois, les souches multi-résistantes ont été évitées.

Afin de s'assurer de l'identification des souches sélectionnées, elles ont toutes été ré-identifiées par le système Vitek 2<sup>®</sup>. Dans le cas des souches du genre *Cronobacter*, la moitié des souches analysées par le Vitek 2<sup>®</sup> a été identifiée comme *C. muytjensii* et l'autre moitié des souches a été identifiée comme *C. sakazakii*. Ces deux espèces sont très proches génétiquement et difficilement discriminées par les tests d'identification biochimiques connus à l'époque où les souches ont été enregistrées dans le souchier général. En effet, initialement, toutes ces souches ont été enregistrées sous l'espèce *C. sakazakii* dans le souchier général. La recherche par ré-identification de 10 souches *C. sakazakii* aurait pris beaucoup de temps, c'est pourquoi un mélange des deux espèces a été gardé pour représenter le genre *Cronobacter*.

Un antibiogramme a été effectué par le système Vitek<sup>®</sup>2 pour s'assurer qu'aucune souche multi-résistante n'avait été incluse. Le cas échéant, les souches multi-résistantes ont été remplacées par un autre isolat. Dans le cas de l'espèce *A. baumannii*, beaucoup de souches multi-résistantes ont été détectées, il a finalement été conservé une souche multirésistante (MDR) : la souche PDB08.

Famille de substrat	Substrat	Code	$\lambda_{\max}$ absorbance (nm)		$\lambda_{\max}$ excitation (nm)		$\lambda_{\max}$ émission (nm)	
			Ox	Red	Ox	Red	Ox	Red
NITRO	Acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique	7NCCA	314	350	NA	365	NA	440
AZO	Acide 2,4-hydroxyphenylazo-benzoïque	HABA	355	NA	NA	250	NA	394
AZO	Methyl red, sel de sodium	MR	435	NA	NA	250	NA	395
AZO	Tartrazine	Tar	435	NA	NA	255	NA	336
AZO	Orange II	OrII	490	NA	NA	348	NA	446
AZO	Orange I	OrI	483	NA	NA	320	NA	473
AZO	3-(4'-carboxymethylphenylazo)indole	CMPAI	402	NA	NA	288	NA	350
AZO	Orange G	OrG	481	NA	NA	320	NA	470
CARBONYLE	p-(diméthylamino)-cinnamaldehyde	PDMAC	407	NA	NA	295	NA	363

Tableau 26 : Caractéristiques optiques des substrats testés.

Ces caractéristiques ont été obtenues par spectres d'absorbance, d'excitation et d'émission réalisés sur les formes oxydées et réduites de chaque molécule testée pour les familles « nitro » (vert), « azo » (rouge) et carbonyle (violet) avec un lecteur de plaque Infinite® M200. Les spectres d'excitation et d'émission ont été obtenus avec un gain de 70. NA (Non Applicable) signifie qu'aucune longueur d'onde maximale d'absorbance/excitation ou émission n'a pu être déterminée.

Substrat	Bactéries à Gram -				Substrat	Bactéries à Gram +			
	<i>E. coli</i>	<i>C. muytjensii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. rosea</i>
7NCCA	+++	+++	++	+++	7NCCA	+++	+++	++	+/-
HABA	+++	+++	+++	++	HABA	+++	+++	+++	+/-
MR	+++	+++	+++	+/-	MR	+++	+++	+++	+
Tar	2+++	1+/-	1+/-	1+/-	Tar	-	-	+	-
OrII	1+++	1+/-	1+/-	-	OrII	+/-	-	++	-
OrI	1+++	+/-	+/-	+/-	OrI	++	++	+++	1++
CMPAI	-	1+	1+	-	CMPAI	-	-	-	-
PDMAC	-	-	1+	-	PDMAC	-	-	-	-
OrG	-	-	-	-	OrG	-	-	-	-

Tableau 27 : Résultats des tests de réduction de 9 substrats par 10 espèces microbiennes, chacune représentée par 10 souches.

L'incubation est faite pendant 24 h à 35°C dans un lecteur de microplaque infinite®M200 (Tecan) avec un gain de 70 pour la fluorescence. Les souches microbiennes sont inoculées dans un bouillon trypticase soja (TSB) à 0,5 MF. La distinction entre les souches réduisant rapidement le substrat (réduction totale < 10 h) et celles réduisant plus lentement (réduction totale > 10 h), ou plus difficilement le substrat (début de réduction en 24 h) est faite selon le code suivant : ensemble des souches rapides (+++), ensemble des souches un peu moins rapides (++), ensemble des souches lentes (+), ensemble des souches réduisant difficilement le substrat (augmentation de fluorescence tardive) (+/-), enfin, l'ensemble des souches ne réduisant pas du tout le substrat (-). Un chiffre est ajouté lorsque seulement quelques souches sont capables de réduire le substrat contrairement à l'ensemble des souches testées. Les résultats de réduction du substrat « nitro » sont notés en vert, ceux des substrat « azo » en rouge et ceux du substrat carbonyle en violet.

Substrat	Levures	
	<i>C. albicans</i>	<i>G. candidum</i>
7NCCA	-	1+
HABA	1+	2++
MR	++	+ dont 1++
Tar	-	-
OrII	-	1+
OrI	-	3+
CMPAI	-	-
PDMAC	++	-
OrG	-	-

NB : La faible croissance des souches de *K. rosea* et *G. candidum* dans les conditions testées a pu impacter leur capacité à réduire les substrats. Généralement, les cas où une augmentation de fluorescence a pu être observée sont les cas où la croissance était meilleure.

Les graphes illustrant les résultats suivants sont disponibles en annexe pages 310 à 322.

## I.2. Sélection des substrats

Les substrats testés lors de cette étude appartiennent à différentes familles de molécules : « nitro », « azo » et carbonyle. Cette classification a été faite selon le groupement chimique réductible. De cette façon, les substrats ont été sélectionnés de façon à cibler différentes activités réductases spécifiques : azoréductase, nitroréductase et carbonyle réductase.

Les caractéristiques optiques de chaque substrat ont été déterminées pour les formes oxydées et réduites (Tableau 26). Les formes réduites ont été obtenues par réduction chimique à l'aide de dithionite de sodium. Ces molécules ont la particularité d'avoir des longueurs d'ondes d'absorbance, d'excitation et d'émission spécifiques de leur état oxydé ou réduit (Tableau 26). Grâce à ces propriétés, la réduction des molécules peut être suivie par absorbance et/ou fluorescence. Dans la plupart des cas, le substrat est considéré comme réduit lorsque l'absorbance à  $\lambda_{\max}$  de l'état oxydé diminue et que la fluorescence aux  $\lambda_{\max}$  d'excitation et d'émission de la forme réduite augmente. Dans le cas des composés « azo », la diminution d'absorbance est souvent synonyme de décoloration, phénomène qui peut donc s'observer également à l'œil nu.

## I.3. Répartition interspécifique

Les tests de réduction des 9 substrats par les 10 espèces ont mis en évidence des différences de capacité de réduction entre les espèces. Ainsi, les substrats 7NCCA, HABA et MR sont des molécules réduites par l'ensemble des espèces bactériennes, mais plus difficilement par les espèces de levures (Tableau 27). Par contre, la réduction des molécules Tar, OrII et OrI est plus spécifique. Une seule souche d'*E. coli* (7610041) a été capable de réduire ces 3 substrats, alors que toutes les souches d'*E. faecalis* ont réduit l'OrI, l'OrII, et le Tar, par ordre de préférence. Par ailleurs, il semble y avoir une spécificité du substrat OrI pour les bactéries à Gram positif. Tous les substrats testés (excepté 7NCCA et PDMAC) sont des composés ayant une fonction « azo » à réduire et peuvent donc être réduits par au moins une souche testée d'après les résultats obtenus.

Les substrats CMPAI, PDMAC ont été réduits par très peu de souches. Cependant, il est intéressant de noter que les souches de *C. albicans* testées n'ont réduit que les substrats

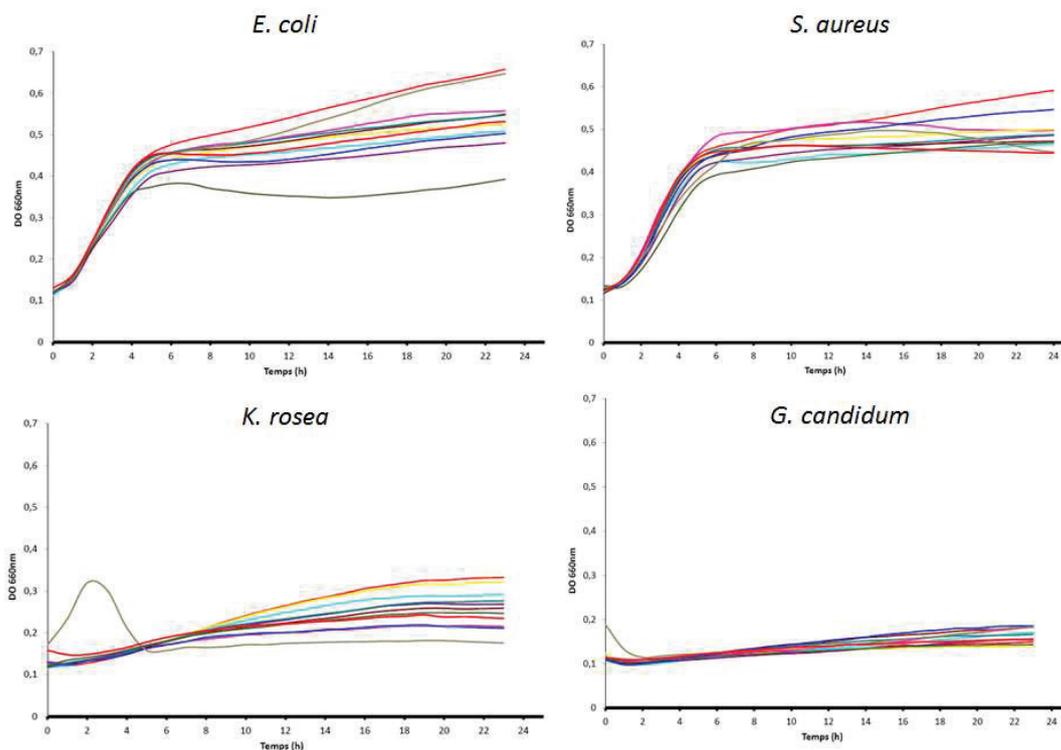


Figure 29 : Exemples de courbes de croissance d'une souche pour chaque espèce représentée en présence d'un substrat.

Chaque couleur représente un substrat différent. Les témoins de croissance des souches sans substrat sont au nombre de 2 par espèce et sont représentés en rouge.

Substrat	<i>E.coli</i>	<i>C. muytjensii</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
<b>7NCCA</b>	7610041	8001061 0501034	8308043	8006067	NA	7509009	7611007 9507074	8304015
<b>HABA</b>	NA	NA	0809002 0603011 8901033	8006067	NA	7509009	7611007	8304015
<b>MR</b>	NA	8001061 8107026	NA	NA	NA	7509009	NA	8304015
<b>Tar</b>	7610041 8501130	8107026	8308043 7302005	8008017	NA	NA	NA	8304015
<b>OrII</b>	7610041	8001061	8308043 7302005	NA	NA	NA	7611007	8304015
<b>OrI</b>	7610041	8001061 0501034	7302005	NA	NA	7509009 8503046	NA	8304015
<b>CMPAI</b>	NA	NA	8308043 7302005	NA	NA	NA	NA	8304015
<b>PDMAC</b>	NA	NA	8308043 7302005	NA	NA	8607202	NA	8304015

Tableau 28 : Récapitulatif des souches ayant un profil de réduction différent de la majorité des souches pour une même espèce.

En bleu sont mis en relief les souches ayant un profil atypique pour plusieurs substrats. NA signifie Non Applicable, c'est-à-dire que toutes les souches ont le même profil.

MR et PDMAC. C'est la seule espèce pour laquelle toutes les souches testées ont été capables de réduire le PDMAC (Tableau 27). *K. rosea* et *G. candidum* sont des espèces qui semblent réduire plus lentement les substrats testés si on s'en tient aux résultats de fluorescence. Malgré ces observations, il est difficile de conclure sur leur capacité de réduction car ce sont des espèces pour lesquelles la croissance était très lente (moins de 1 à 2 doublements en 24h). Le temps d'incubation (24h) et le milieu de culture (TSB) défini pour étudier la réduction des substrats n'était donc pas adapté à la culture de ces microorganismes (Figure 29).

#### I.4. Répartition intraspécifique

Au sein d'une même espèce, peu de variations d'activité réductase ont été observées pour un même substrat. Les activités réductases semblent donc assez homogènes au sein d'une même espèce (Tableau 27).

Toutefois une souche atypique a été observée pour quelques espèces. Le terme atypique est utilisé pour signifier une souche n'ayant pas le même profil de réduction que la majorité des souches testées pour l'espèce (Tableau 28).

Toutes les souches d'*E. coli* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA et MR mais aucune souche n'a été capable de réduire les substrats « azo » CMPAI, OrG et le substrat carbonyle PDMAC. Concernant les autres substrats « azo », seules 2 souches (7610041 et 8501130) ont été capables de réduire le Tar et une souche (7610041) capable de réduire les substrats OrI et OrII (Tableau 26 et Tableau 28).

Toutes les souches du genre *Cronobacter* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA et MR. Toutes ces souches ont également été capables de réduire le substrat « azo » OrI, mais plus lentement que les substrats HABA et MR. Par contre, aucune souche n'a été capable de réduire le substrat « azo » OrG et le substrat carbonyle PDMAC. Par ailleurs, la souche 8107026 a commencé à réduire le Tar sur 24 h, de même que la souche 8001061 avec les substrats OrII et CMPAI (Tableau 27 et Tableau 28).

Toutes les souches d'*A. baumannii* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA et MR. Toutes ces



souches ont également été capables de réduire le substrat « azo » OrI, mais plus lentement. Aucune souche d'*A. baumannii* n'a été capable de réduire le substrats « azo » OrG. Par contre, la souche 0809002 est la seule souche d'*A. baumannii* capable d'un début de réduction du Tar sur 24h, de même que la souche 7302005 sur les substrats « azo » OrII et CMPAI ainsi que la souche 8901033 sur le substrat carbonyle PDMAC (Tableau 26 et Tableau 28).

Toutes les souches de *P. aeruginosa* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et le substrat « azo » HABA et de réduire plus lentement les substrats MR et OrI. Par contre, aucune souche n'a été capable de réduire les substrats « azo » OrII, CMPAI et OrG. Une souche a été capable de réduire lentement le Tar (souche 800817) (Tableau 27 et Tableau 28).

Toutes les souches de *S. aureus* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA, MR et OrI et lentement le substrat OrII. Par contre, aucune souche n'a été capable de réduire les autres substrats (Tar, CMPAI, PDMAC et OrG). L'espèce *S. aureus* est l'espèce pour laquelle aucune souche atypique n'a été mis en évidence (Tableau 27 et Tableau 28).

Toutes les souches de *S. epidermidis* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA, MR et OrI. Aucune souche n'a été capable de réduire les autres substrats (Tar, OrII, CMPAI, PDMAC, OrG) (Tableau 26). La souche 7509009 a réduit plus lentement les substrats 7NCCA, HABA, MR et OrI que les autres souches de *S. epidermidis* (Tableau 28).

Toutes les souches de *E. faecalis* ont été capables de réduire rapidement et totalement le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA, MR, OrII et OrI et plus lentement le substrat Tar. Un profil particulier de réduction a pu être observé pour la souche 7611007 sur les substrats 7NCCA, HABA et OrII, ainsi que pour la souche 9507074 sur le substrat « nitro » 7NCCA (Tableau 27 et Tableau 28).

Toutes les souches de *K. rosea* ont été capables d'un début de réduction du substrat « nitro » 7NCCA et des substrats « azo » HABA et MR sur 24h et seule la souche 9604013 a été capable de réduire l'OrII. Concernant les autres substrats (Tar, OrII, CMPAI, PDMAC et OrG), aucune souche de *K. rosea* n'a été capable de les réduire. Mais ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné les difficultés croissance rencontrées avec ces souches



comme il cela été expliqué précédemment (Tableau 27 et Tableau 28).

Toutes les souches de *C. albicans* ont été capables de réduire le substrat « azo » MR et le substrat carbonyle PDMAC. La souche 8304015 a montré un début de réduction du substrat « azo » HABA. Cette souche a un profil différent de toutes les souches testées pour tous les substrats. En vérifiant les identifications des souches obtenues par le Vitek2, il est apparu qu'il s'agissait en fait d'une souche de *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*). Cette observation illustre les observations faites précédemment sur la répartition interspécifique. Ces deux espèces du genre *Candida*, malgré leur proximité phénotypique et génétique, n'ont pas du tout les mêmes profils d'activité réductase. Mais ceci reste à confirmer en testant d'autres souches de *C. dubliniensis* (Tableau 27 et Tableau 28)..

Toutes les souches de *G. candidum* ont montré un début de réduction du substrat « azo » MR en 24h. Une souche (9711001) est plus rapide que les autres pour réduire ce substrat. Cette souche 9711001 a également été capable de réduire le substrat « nitro » 7NCCA et les substrats « azo » HABA et OrI contrairement à l'ensemble des autres souches de *G. candidum*. Le substrat HABA a aussi été réduit par la souche 9605016. De même, le substrat « azo » OrI a été réduit par les deux autres souches 7612056 et 8406044. Le substrat « azo » OrII commençait seulement à être réduit en 24h par la souche 7612056. La réduction des substrats testés par les souches de *G. candidum* est hétérogène, très certainement du fait des difficultés de croissance rencontrées (Tableau 27 et Tableau 28).

### **I.5. Conclusion et choix des modèles d'études pour les activités azoréductases et nitroréductases**

Une diversité interspécifique a donc pu être mise en évidence lors de cette étude de répartition des activités réductases. D'un point de vue intraspécifique, les activités réductases semblent être plus homogènes malgré une souche par espèce ayant un profil atypique par rapport aux souches de la même espèce. N'ayant pas de forte activité sur le substrat carbonylé PDMAC, la suite de l'étude s'est portée uniquement sur les activités azoréductases et nitroréductases.

L'espèce *E. faecalis* semble avoir une activité azoréductase présentant un large spectre de substrat (Tableau 26). Néanmoins, une souche d'*E. coli* semble avoir le même spectre d'activité sur les substrats « azo » qu'*E. faecalis* (Tableau 26 et Tableau 28). Ces 2

Espèces	Souche typique	Souche atypique
<i>E. coli</i>	8703057 (ECO87)	7610041 (ECO76)
<i>E. faecalis</i>	9507074 (SFL95)	7611007 (SFL76)

Tableau 29 : Sélection des souches pour une étude approfondie des activités réductases

A

```
>[ref|NP_415421.1|] conserved protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]
[ref|YP_001729879.1|] hypothetical protein ECDH10B_0971 [Escherichia coli str. K-12
substr. DH10B]
[ref|YP_002925955.1|] hypothetical protein BWG_0753 [Escherichia coli BW2952]
▶ 7 more sequence titles
Length=196

GENE ID: 945520 ycaK | conserved protein
[Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (10 or fewer PubMed links)

Score = 40.4 bits (93), Expect = 4e-05, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 30/125 (24%), Positives = 53/125 (42%), Gaps = 3/125 (2%)

Query 79 ELIAELKAHDVIVIAAPMYNFNISTQLKNYFDLVARAGVTFRYTENGPEGLVTGKKAIVI 138
+L +EL HD +V+ P++ ++ LK Y D V G+ + P V A+V
Sbjct 72 QLYSELLEHDTLVVVFPLWVYSPFAMKGYIDRVWVWNGLAYGDGHKLPFNKVRW-VALVG 130

Query 139 TSRGGIHKDGPDTDLVTPYLSTFLGFIGI--IDVKFVFAEGIAYGPEMAAKAQSDAKAAID 196
+ + G ++ YL ++GI DV F+ + G E+ A + +
Sbjct 131 GDKESFVQMGWEKNISDYLNKNCVSYLGIEDADVTFLCNTVVFVDFGEELHASYYQSLLSQVR 190

Query 197 SIVSA 201
+V A
Sbjct 191 DMVDA 195
```

B

```
>[ref|NP_418169.1|] chromate reductase, Class I, flavoprotein [Escherichia coli str.
K-12 substr. MG1655]
[ref|YP_001732535.1|] chromate reductase, class I, flavoprotein [Escherichia coli str.
K-12 substr. DH10B]
[ref|YP_002928600.1|] chromate reductase, Class I, flavoprotein [Escherichia coli BW2952]
▶ 7 more sequence titles
Length=188

GENE ID: 948225 yieF | chromate reductase, Class I, flavoprotein
[Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (Over 10 PubMed links)

Score = 35.0 bits (79), Expect = 0.002, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 22/77 (29%), Positives = 39/77 (51%), Gaps = 11/77 (14%)

Query 69 RQQEALALSDELIAE-LKAHDVIVIAAPMYNFNISTQLKNYFDLVARAGVTFRYTENGPE 127
+Q+E + E +AE ++ D +VI P YN+++ LKN D ++R P+
Sbjct 54 QQEEGFPAITVEALAEQIRQADGVVIVTPEYNYVSPGGLKNAIDWLSRL-----PD 103

Query 128 GLVTGKKAIVITSRGGI 144
+ GK ++ IS G+
Sbjct 104 QPLAGKPVLIQTSSMGV 120
```

Figure 30 : Alignement des séquences protéiques de YcaK (A) et YieF (B) avec la séquence protéique de AzoR de la souche d'*E. coli* K12 MG1655.

L'alignement a été effectué avec l'outil BLASTp et la base de donnée du NCBI.

espèces ont également une très bonne activité sur le substrat « nitro » 7NCCA. De plus, les génomes entiers de ces espèces sont disponibles et *E. coli* est facilement manipulable génétiquement. C'est pourquoi ces 2 espèces, *E. coli* et *E. faecalis* ont été choisies comme modèles d'études. Pour chaque espèce et pour certaines expériences, seules 1 souche typique et 1 souche atypique ont été sélectionnées (Tableau 29).

Dans l'étude de la répartition des activités réductases, un seul substrat « nitro » a été testé. L'ensemble des espèces bactériennes testées a été capable de réduire plus ou moins rapidement le substrat « nitro » 7NCCA. De plus, ce substrat est actuellement utilisé dans des paramètres TEMPO® (YM et LAB). Les cibles métaboliques de ce substrat sont mal connues, ce substrat a donc été choisi comme substrat modèle pour l'étude de l'activité nitroréductase.

Dans le cadre de l'étude de l'activité azoréductase, 2 substrats sont intéressants puisque réductibles par un grand nombre d'espèce : HABA et MR (Methyl red). Le substrat HABA est fait à façon par des collaborateurs chimistes et non disponible dans le commerce, contrairement au Methyl red (MR). De plus, HABA est peu soluble dans l'eau. Pour ces raisons de disponibilité et de solubilité, le Methyl red (MR) a été sélectionné comme substrat modèle pour l'étude de l'activité azoréductase.

## II. Recherche des azoréductases et nitroréductases

### II.1. Modèle gram-négatif : *Escherichia coli*

#### II.1.1. Azoréductase AzoR

Une seule protéine chez *E. coli* a été décrite à ce jour comme ayant une activité enzymatique azoréductase: la protéine AzoR (numéro d'accèsion AAC74494) (annexe page 329). La séquence peptidique d'AzoR a été utilisée pour la recherche d'autres protéines homologues sur le génome séquencé de la souche d'*E. coli* K12 MG1655 par alignement de séquences (BLASTp). Deux protéines (YcaK et YieF) ont été identifiées ainsi, mais des pourcentages de recouvrement faibles (61% pour YcaK et 45% pour YieF) ainsi que des E-values (Expectations values) élevées ( $4.10^{-9}$  pour YcaK et  $2.10^{-7}$  pour YieF) indiquaient que l'alignement n'était pas significatif (Figure 30). La valeur de E-value correspond à la fréquence d'observation d'un motif dans une base de données. Plus la E-value est petite,

A >[ref|NP\\_415528.1](#) **G** malonic semialdehyde reductase [Escherichia coli str. K-12 MG1655]  
[ref|YP\\_001729987.1](#) **G** hypothetical protein ECDH10B\_1080 [Escherichia coli str. substr. DH10B]  
[ref|YP\\_002926064.1](#) **G** hypothetical protein BWG\_0862 [Escherichia coli BW2952]  
[▶ 9 more sequence titles](#)  
 Length=196

GENE ID: 946591 rutE | malonic semialdehyde reductase [Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (10 or fewer PubMed links)

Score = 38.5 bits (88), Expect = 2e-04, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 39/181 (22%), Positives = 66/181 (36%), Gaps = 25/181 (14%)

```

Query 25  EQAEQIKTLLQYSPSSSTNSQPWHFIVASTEEGKARVAKSAAGNYVFNERNKMLDASHVVVF 84
          E  +I  L+++ P+S N P  +  T EGK R+  + +  N +K L A  +
Sbjct 31  ETLREIYALMKWGPPTSANCSPARIVFTRTAEGKERLRPALSSG---NLQKILTAPVTAIV 87

Query 85  CAKTAMDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAKAANDKGRKFFADMHRKDLHDDAEWMAKQVY 144
          +  + L L+  DA  F +  A
Sbjct 88  AWDSEFYER-LPLLPFGDARSWFTSSPQLA-----EETAFRNSS 126

Query 145 LNVGNFLLGVAAALGLDAVPIEGFDAAILDAEFLKEKGYTSLVVVFPVGHHSVEDFNATLP 204
          +  ++  ALGLD P+ GFD  +D F  S +++ +G+  A LP
Sbjct 127 MQAAYLIVACRALGLDTGPMSEFDRQHVDDAF-FTGSTLKSNNLINIGYGDSSKLYARLP 185

Query 205  K 205
          +
Sbjct 186  R 186
    
```

B >[ref|NP\\_416279.1](#) **G** predicted oxidoreductase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]  
[ref|YP\\_001730742.1](#) **G** hypothetical protein ECDH10B\_1903 [Escherichia coli str. K-12 substr. DH10B]  
[ref|YP\\_002926775.1](#) **G** hypothetical protein BWG\_1578 [Escherichia coli BW2952]  
[▶ 9 more sequence titles](#)  
 Length=183

GENE ID: 945964 ydjA | predicted oxidoreductase [Escherichia coli str. K12 substr. MG1655] (Over 10 PubMed links)

Score = 30.0 bits (66), Expect = 0.11, Method: Compositional matrix adjust.  
 Identities = 19/59 (32%), Positives = 26/59 (44%), Gaps = 2/59 (3%)

```

Query 1  MDIISVALKRHSTKAFDASKKLTPEQAEQIKTLLQYSPSSSTNSQPWHFIVASTEEGKAR 59
          MD + + + R S  A  T EQ + I  +P  + QPWHF V  EG+ R
Sbjct 1  MDALELLINRRSASRL-AEPAPTGEQLQNILRAGMRAPDHKSMQPWHFFVIEG-EGRER 57
    
```

Figure 31 : Alignement des séquences protéiques de RutE (A) et YdjA (B) avec la séquence protéique de NfsB de la souche d’*E. coli* K12 MG1655.

L’alignement a été effectué avec l’outil BLASTp et la base de donnée du NCBI.

plus la probabilité que 2 séquences soient homologues est grande. Cette valeur augmente avec la taille de la banque de donnée.

La fonction de la protéine YcaK n'est pas connue et la protéine YieF a été identifiée comme une chromate réductase (1). L'espèce *E. coli* semble donc, *a priori*, n'avoir aucune autre protéine homologue à AzoR.

### II.1.2. Nitroréductases NfsA et NfsB

L'activité nitroréductase d'*E. coli* est connue comme étant liée principalement aux 2 protéines NfsA (numéro d'accèsion AAC73938) et NfsB (numéro d'accèsion AAC73679) (116,146,192). Un alignement de séquences peptidiques entre NfsA, NfsB (annexe page 329) et l'ensemble des protéines codées par le génome de la souche d'*E. coli* K12 MG1655 a été effectué (BLASTp). Aucune protéine homologue à NfsA n'a été trouvée. Par contre, deux protéines similaires à NfsB ont été identifiées avec des pourcentages de recouvrement ainsi que des E-values non significatifs (Figure 31). Il s'agit de RutE réductase (83% de recouvrement, 22% d'identité et une E-value de  $2.10^{-4}$ ), une malonic semialdehyde réductase, et de YdjA (27% de recouvrement, 32% d'identité et une E-value de 0,11), une nitroréductase putative (17).

## II.2. Modèle gram positif : *Enterococcus faecalis*

### II.2.1. Azoréductase AzoA

Une seule protéine décrite chez *E. faecalis* ayant comme activité enzymatique majeure l'activité azoréductase a été décrite: la protéine AzoA (numéro d'accèsion Q831B2) (32) (annexe page 330). La même procédure que pour l'espèce *E. coli* a été mise en œuvre pour rechercher *in silico* d'autres azoréductases potentielles d'*E. faecalis*. La recherche d'alignement de séquences protéique de AzoA sur le génome entier de la souche V583 de *E. faecalis* n'a pas permis de trouver d'autres protéines homologues à AzoA. L'étude a donc commencé avec AzoA comme seule protéine d'*E. faecalis* ayant une activité azoréductase.

### II.2.2. Nitroréductases

Aucune nitroréductase n'a encore été décrite chez *E. faecalis*. Cependant, 4 gènes ont été annotés sur le génome de la souche séquencée V583 d'*E. faecalis* comme gènes codants des nitroréductases putatives : EF0404 (numéro d'accèsion NP814193), EF0648 (numéro d'accèsion NP814402), EF0655 (numéro d'accèsion NP814407) et EF1181

A

```
>[ref|NP_814910.1] [G] nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
gb|AAO80980.1| [G] nitroreductase family protein [Enterococcus faecalis V583]
Length=244
GENE ID: 1200082 EF1181 | nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
(10 or fewer PubMed links)
Score = 182 bits (461), Expect = 5e-57, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 99/242 (41%), Positives = 137/242 (57%), Gaps = 5/242 (2%)
Query 1  MPTTIELICGHRHSIRHFTDEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIIRITDKALREEL 60
Sbjct 1  M TIE + HRS+RHF + +++ Q++ +I +A+A SSS+FLQ +II I D LR EL
MNQTIEQLLSHRSVRHFKKQALTDKQKQLITAAQAGSSSNFLQAYTIIIEIKDPELRREL 60
Query 61  VLTGGQKHVAQAAEFWVFCADFNRLQI-CPDAQ----LGLAEQLLGVVDTAMMAQNA 115
Sbjct 61  GRLANCEDYVVNTGVFVYFVADLYRHATILSKEGQSLEPLKTPESLLVAAVDITIAAQN 120
Query 116  LIAAESLGLGGVYIGGLRNNEAVTKLLKLPQHVLPLFLGCLGWPADNPDLPKRLPASIL 175
Sbjct 121  IAAES+ LG YIGG+RN+++ V K L LP+ +PLFGL +G P +KPR+P +
ATAAESMDLGCYIGGIRNDLDTAKRLSLPELTVPLFLGTLIGVPELNGVKRPFMFENI 180
Query 176  VHENSYQPLDKGALAQYDEQLAEYYLTRGSNNRRDTSWSDHIRRTIIEKSRPFFILDYLNK 235
Sbjct 181  LSEHYQSDKLTDMHTYDELLKDYASRSSNAQTADWSQKSLSYFSYNNRPEVKIFLQKQ 240
Query 236  GW 237
Sbjct 241  GF 242
```

B

```
>[ref|NP_814402.1] [G] nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
gb|AAO80473.1| [G] nitroreductase family protein [Enterococcus faecalis V583]
Length=205
GENE ID: 1199549 EF0648 | nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
(10 or fewer PubMed links)
Score = 36.2 bits (82), Expect = 8e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 38/173 (22%), Positives = 69/173 (40%), Gaps = 30/173 (17%)
Query 6  ELICGHRHSIRHFT-DEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIIRITDKALREELVILT 64
Sbjct 5  +++ RS+R F D I + + AII A +S+ L + +T+K +E L ++
DVVRSRRSVRDFMPDVEIPKEELMAIIEEAMFAPNSTNLNSWRFLIVTEKEQKEALYEVS 64
Query 65  GGQKHVAQAAEFWVFCADFNRLQICPD-----AQLGLAEQLLGLV----- 105
Sbjct 65  Q V AA + D + D AQ + E++ G+
MQQPAVKGAAAVIILLGDLTAYTVANADEISAKAVAQGITMTEIRQGINENVSYYVDVSE 124
Query 106  -----VDTAMMAQNALIAAESLGLGGVYIGGLRNNEAVTKLLKLPQHVL 150
Sbjct 125  +D ++A ++++ G V + G EAV KL + H++
EQKREWMLDQGLVAMQLMLSADKRGYDVTAMSGFET--EAVRKLFNIEDHLV 175
```

C

```
>[ref|NP_814193.1] [G] nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
gb|AAO80264.1| [G] nitroreductase family protein [Enterococcus faecalis V583]
Length=211
GENE ID: 1199322 EF0404 | nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
(10 or fewer PubMed links)
Score = 58.5 bits (140), Expect = 1e-11, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 52/206 (25%), Positives = 92/206 (45%), Gaps = 38/206 (18%)
Query 2  DIISVALKRHSKAFDASKKLTPEQAEQIKILLQ---YSPSSSTNSQPWHFIVASTEEGKA 58
Sbjct 8  D + R S + +D + K++ E++ T++Q +PSS N QPW F+V +E GK
DFSEIVFGRKSVRVYDETHKIS---HEEMLTMIQEATTAPSSVNMQPPWRVFFVVESEAGKE 64
Query 59  RVAKSAAAGNYVFNERKMLDASHVVVF----CAKTAMDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAK 114
Sbjct 65  ++ N NE + +++++F C + + + +Q A G+ +K
KPKPLIRFNTRQNE---TSSAMLLIFGDLNCHERGE---IYNQAYASGKM---PK 111
Query 115  AANDKGR----KFFADMHRKDLHD---DAEWMAKQVYLVNMGVFNLLGVAALGLDAVPIEG 166
Sbjct 112  D+ + + R+ ++D DA A Q F+L A G + PI G
EVRDQQLAAIIPHYESLSREQNDIVKIDASLAAMQ-----FMLVARAHGYETNPICG 164
Query 167  FDAAILDAEFGLKEKGYTSLVVVPG 192
Sbjct 165  F+A L FGL ++ Y +++ VG
FEAEKLAETFGLDQERYVPMILSVG 190
```

D

```
>[ref|NP_814402.1] [G] nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
gb|AAO80473.1| [G] nitroreductase family protein [Enterococcus faecalis V583]
Length=205
GENE ID: 1199549 EF0648 | nitroreductase [Enterococcus faecalis V583]
(10 or fewer PubMed links)
Score = 32.7 bits (73), Expect = 0.009, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 39/200 (20%), Positives = 75/200 (38%), Gaps = 21/200 (11%)
Query 6  VALKRHSKAFDASKKLTPEQAEQIKILLQYSPSSSTNSQPWHFIVASTEEGKARVAKSAA 65
Sbjct 6  V R S + F ++ E+ I ++P+STN W E++ +E K A
VVRSRRSVRDFMPDVEIPKEELMAIIEEAMFAPNSTNLNSWRFLIVTEKE----QKEAL 60
Query 66  GNYVFNERKMLDASHVVVFCAKTA-----MDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAKAANDK 119
Sbjct 61  + + A+ V++ D++ K V A G T E + ++
YEVSMQQPAVKGAAAVIILLGDLTAYTVANADEISAKAV----AQGTM-TEEIRQGINE 114
Query 120  GRKFFADMHRKDLHDDEAWMAKQVYLVNMGVFNLLGVAALGLDAVPIEGFDAAILDAEFGLK 179
Sbjct 115  ++ D+ + EW+ L +L G D V + GF+ + F ++
NVSWYVDVSEEQKR---EWMLDQGLVAMQLMLSADKRGYDVTAMSGFETSAVRKLFNIE 171
Query 180  ERGYISLVVVVPGHHSVEDF 199
Sbjct 172  + L ++P+G F
DHLVNGL-IIPIGKAQTPGF 190
```

Figure 32 : Alignement des séquences protéiques de EF1181 (A) et EF0648 (B) avec la séquence protéique de NfsA et de EF0404 (C) et EF0648 (D) avec la séquence protéique de NfsB de la souche d'*E. coli* K12 MG1655. L'alignement a été effectué avec l'outil BLASTp et la base de donnée du NCBI.

(numéro d'accèsion NP8148910) (annexe page 330).

Par ailleurs, une recherche de protéines homologues à NfsA ou NfsB a été effectuée sur le génome transcrit de la souche V583 d'*E. faecalis* à l'aide du logiciel BLAST fourni par le NCBI (BLASTp). Une protéine homologue à NfsA a été identifiée ( NC\_004668.1) avec une E.value de  $5.10^{-57}$  correspondant à EF1181 et une autre protéine a été identifiée avec une E.value beaucoup plus élevée ( $8.10^{-04}$ ) correspondant à EF0648 (Figure 32, A et B). Une protéine homologue à NfsB avec une E. value de  $1.10^{-11}$  correspondant à EF0404 a pu être identifiée ainsi qu'une autre protéine une E.value beaucoup plus élevée (0,009) correspondant à EF0648 (Figure 32, C et D).

### II.3. Etude phylogénétique des protéines.

A partir des séquences protéiques des différentes protéines sélectionnées pour l'étude, des arbres phylogénétiques ont été réalisés à l'aide du logiciel SeaView (Figure 33). Trois méthodes ont été utilisées pour réaliser ces arbres : la méthode par parcimonie, la méthode des distances et la méthode des maximum de vraisemblance. Les 3 méthodes relient AzoA et AzoR par un même ancêtre commun. Les méthodes par parcimonie et distances séparent le groupe des azoréductases connues AzoA, AzoR, du groupe des nitroréductases connues NfsA, NfsB et putatives EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181. Au sein des nitroréductases, plusieurs sous-groupes peuvent être distingués. Les 2 premières méthodes (parcimonie et méthode des distances) séparent EF1181 du reste des nitroréductases alors que la méthode des maximums de vraisemblance réunit NfsA et EF1181 au sein d'un groupe qui serait plus apparenté aux azoréductases qu'aux autres nitroréductases étudiées. En regardant plus en détail, les 2 premières méthodes indiquent l'existence d'un ancêtre commun à NfsB et EF0655, non commun avec les autres protéines alors que la méthode des maximums de vraisemblance révèle un dernier ancêtre commun à NfsB, EF0404 et EF0648 et non commun à EF0655.

### II.4. Conclusion

Ces recherches n'ont pas mis en évidence l'existence de protéines à activité azoréductase autre que AzoR et AzoA pour *E. coli* et *E. faecalis* respectivement. Par la suite, l'étude des activités azoréductases d'*E. coli* et d'*E. faecalis* s'est donc portée essentiellement sur les protéines AzoR et AzoA respectivement.

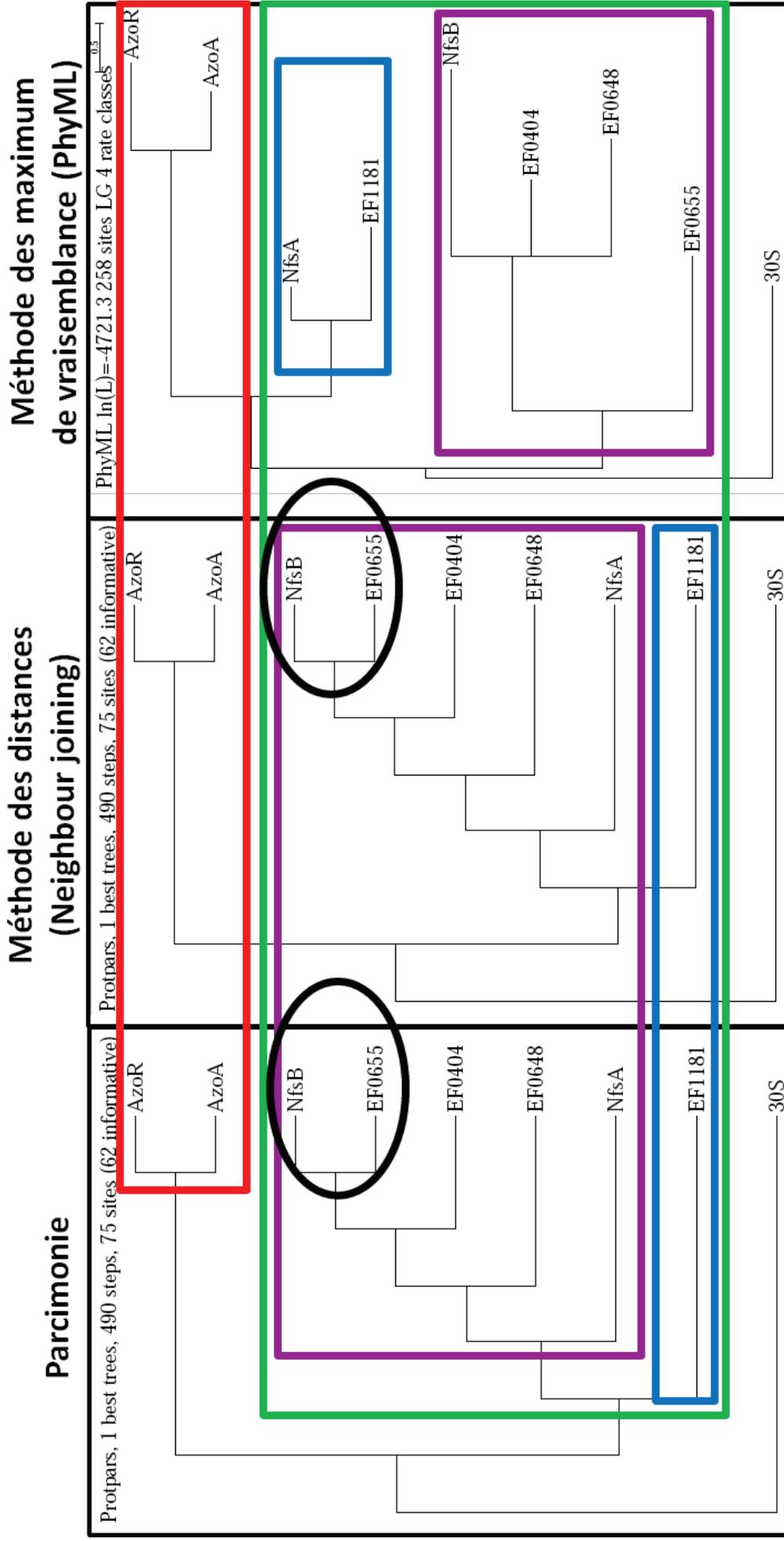
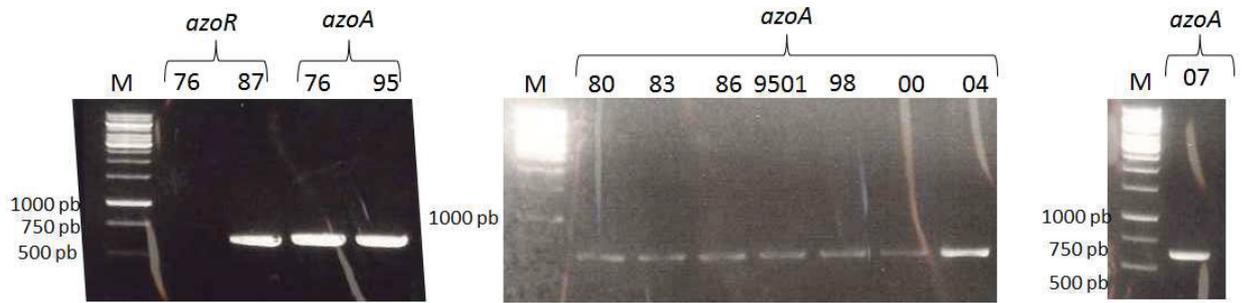


Figure 33 : Arbres phylogénétiques obtenus à partir de 3 méthodes à l'aide du logiciel SeaView : méthode par parcimonie, méthode des distances et méthode des maximums de vraisemblance.

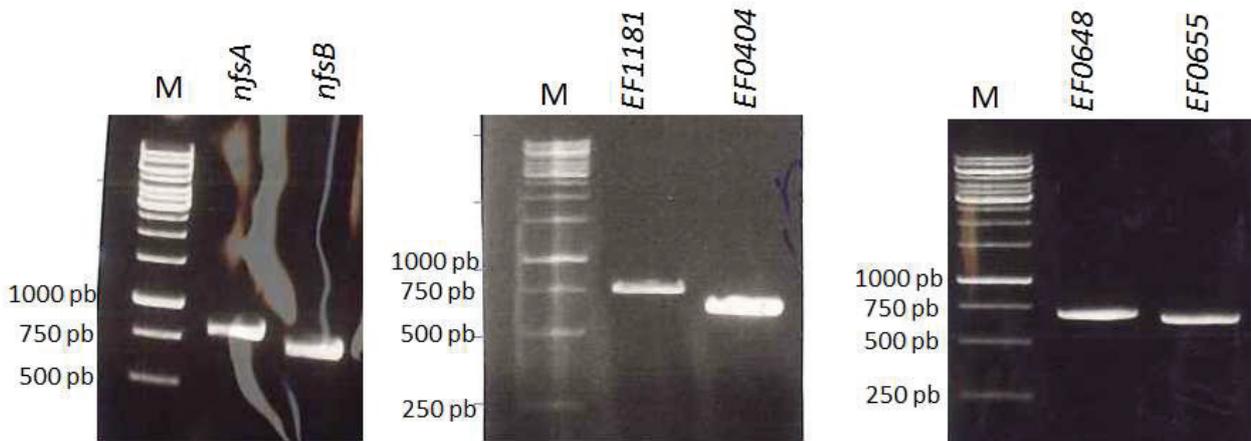
La protéine 30S d'*E. coli* a été intégrée à la construction de l'arbre afin de pouvoir l'enraciner. Le groupe des azoréductases connues est encadré en rouge, le groupe des nitroréductases connues et putatives est encadré en vert. Au sein du groupe des nitroréductases, 3 groupes sont distingués : bleu, violet et noir.

La recherche de protéines apparentées à NfsA et NfsB chez *E. coli* n'a pas mis en évidence d'autres protéines. Par contre, la recherche de protéines homologues à NfsA et NfsB sur le génome transcrit d'*E. faecalis* a pu mettre en évidence les protéines EF0404 comme protéine homologue à NfsB et EF1181 comme protéine homologue à NfsA. Une faible homologie entre EF0648 et NfsA et NfsB a également été mise en évidence. L'étude phylogénétique a permis de mettre en évidence une séparation entre le groupe des azoréductases et nitroréductases. De même, cette étude a pu mettre en évidence l'existence d'un ancêtre commun entre NfsB, EF0404, EF0648 et EF0655. Par la suite, l'étude des nitroréductases s'est donc portée sur NfsA et NfsB chez *E. coli* et EF0404, EF1181, EF0648 et EF0655 chez *E. faecalis*.



**Figure 34 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des amplifications par PCR des gènes codants les protéines azoréductases.**

Les numéros correspondent aux souches à partir desquelles le chromosome a été extrait et l'amplification effectuée (ECO76, ECO87, SFL76, SFL95, SFL80, SFL83, SFL86, SFL9501, SFL98, SFL00, SFL04 et SFL07). Le marqueur de poids moléculaire est le marqueur Gene Ruler 1 Kb Fermentas (M).



**Figure 35 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des amplifications par PCR des gènes codants les protéines nitroréductases.**

Les gènes *nfsA* et *nfsB* ont été amplifiés à partir de la souche d'*E. coli* ECO87. Les gènes *EF1181*, *EF0404*, *EF0648* et *EF0655* ont été amplifiés à partir du chromosome de la souche SFL95 d'*E. faecalis*. Le marqueur de poids moléculaire est le marqueur Gene Ruler 1 Kb Fermentas (M).



**Figure 36 : Design d'amorces internes (flèches rouges) et externes (flèches vertes) au gène *azoR* (bleu).**

CS indique le codon stop.

### III. Caractérisation biochimique des azoréductases et nitroréductases chez *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*

#### III.1. Clonage des gènes codants les protéines d'intérêt

Tous les gènes codant les protéines d'intérêt pour l'étude ont été clonés dans le vecteur d'expression pQE30. Les gènes d'intérêt ont été amplifiés par PCR à partir du chromosome d'au moins 1 des 2 souches sélectionnées pour chacune des espèces *E. coli* et *E. faecalis* (Figure 34 et Figure 35) puis clonés dans le vecteur d'expression pQE30 pour permettre la synthèse de protéines étiquetées 6-His à leur domaine N-terminal. Tous les clonages dans le vecteur pQE30 ont été vérifiés par séquençage (GATC Biotech, Konstanz, Germany) (Annexe page 331).

##### III.1.1. Clonage du gène *azoA*

Le gène codant la protéine AzoA a été amplifié à partir des 2 souches d'*E. faecalis* sélectionnées précédemment (SFL95 et SFL76) (Figure 34). Afin de faire une étude plus étendue sur la protéine AzoA d'*E. faecalis*, le gène *azoA* a été cloné à partir de toutes les souches de *E. faecalis* testées lors de l'étude de répartition des activités réductases (Figure 34).

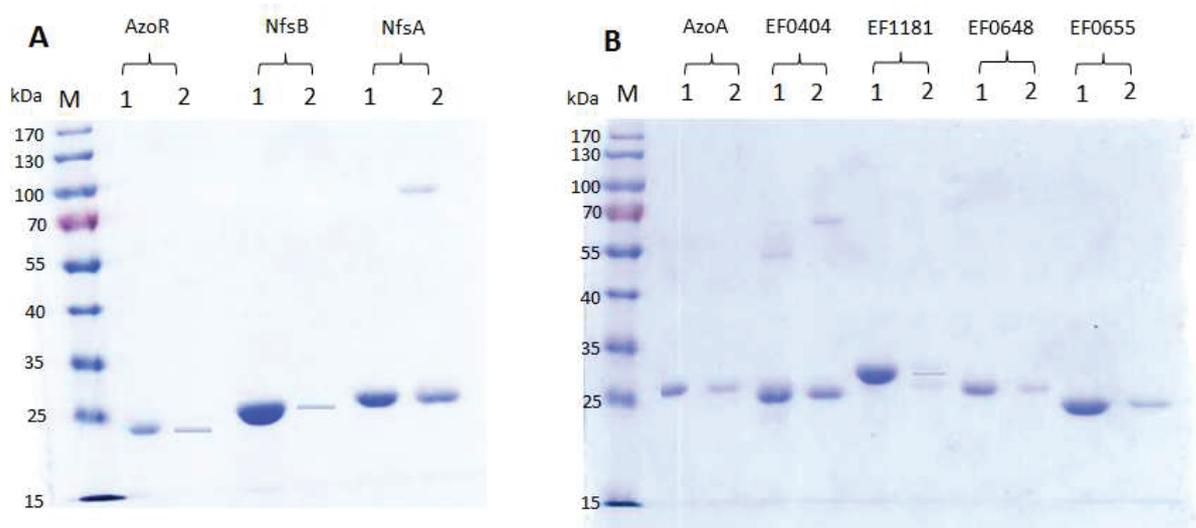
##### III.1.2. Clonage du gène *azoR*

Le gène *azoR* n'a pas pu être amplifié qu'à partir de la souche ECO87 d'*E. coli* (Figure 34). Des stratégies ont été mises en œuvre pour rechercher le gène *azoR* sur le génome de la souche d'*E. coli* ECO76 par recherche du gène à l'aide d'amorces internes au gène et par amorces externes aux gènes en supposant que ce sont des régions conservées au sein de l'espèce (Figure 36). Aucune amplification n'a pu être obtenue par ces méthodes. La souche de ECO76 a alors été retirée de l'étude suite à ces résultats. Une autre stratégie devra être mise en œuvre pour identifier la ou les protéines impliquées dans l'activité azoréductase de cette souche atypique d'*E. coli*.



**Figure 37 : Résine Ni-NTA lors de la purification.**

A) Enzyme fixée sur la résine Ni-NtA en conditions natives, le groupe prosthétique FMN est lié à l'enzyme. B) Enzyme fixée sur la résine Ni-NtA en conditions dénaturantes, le groupe prosthétique FMN ne semble plus lié à l'enzyme.



**Figure 38 : SDS-PAGE 12% de toutes les protéines purifiées lors de cette étude d' *E. coli* (A) et d'*E. faecalis* (B).**

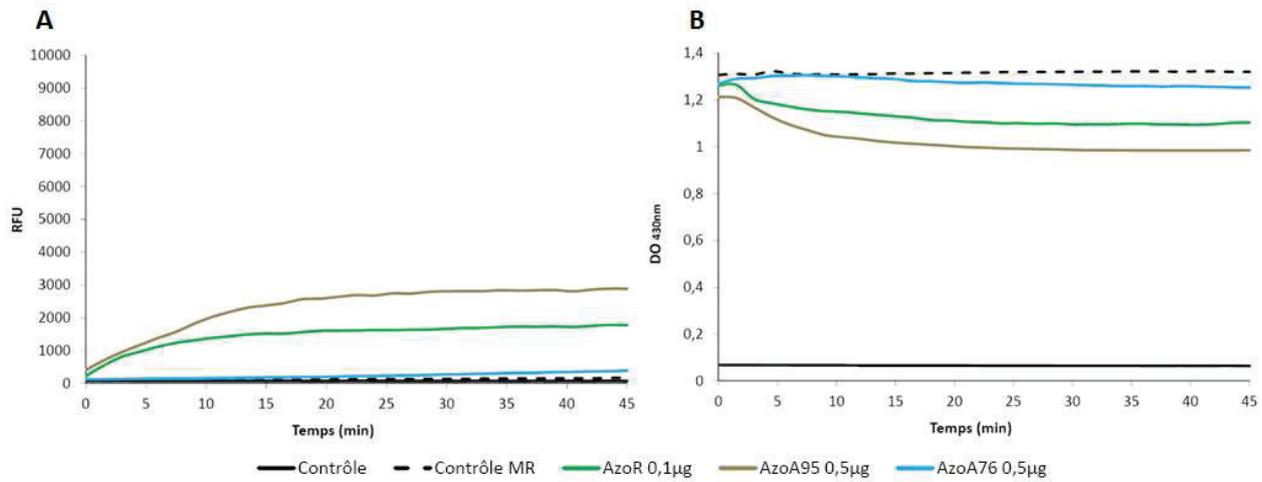
Le chiffre 1 indique la forme purifiée en condition native et le chiffre 2 la forme purifiée en condition dénaturante suivie de la renaturation.

### III.1.3. Clonages des gènes *nfsA*, *nfsB*, *EF0404*, *EF0648*, *EF0655* et *EF1181*.

Les clonages des gènes codants les nitroréductases ont été effectués à partir du chromosome de la souche typique pour chaque espèce : ECO87 et SFL95 (Figure 35).

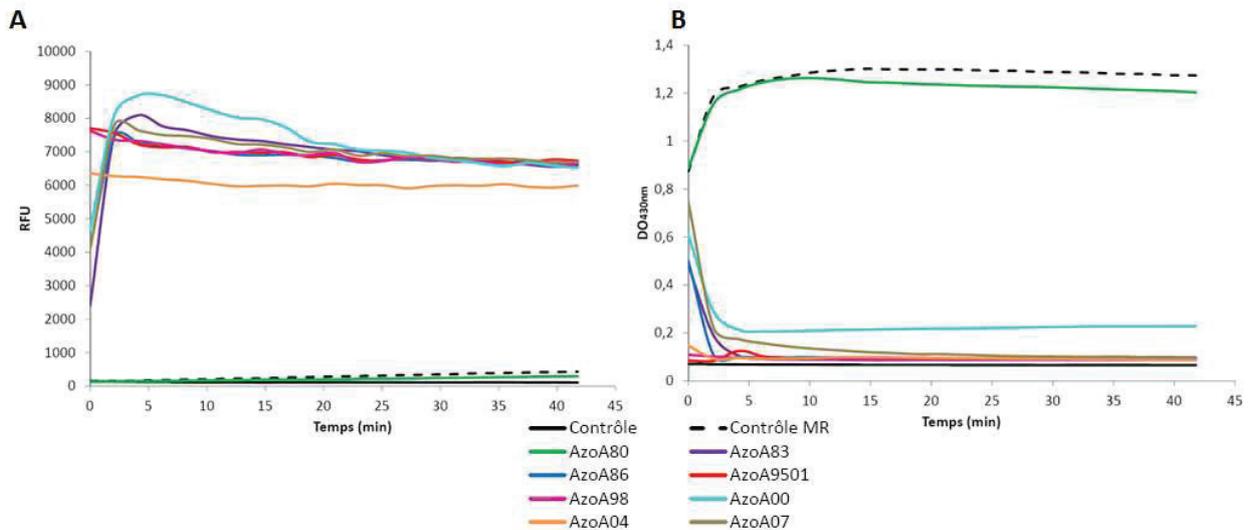
### III.2. Surproduction et purification

Les protéines recombinantes ont été surproduites suite à une induction par IPTG à partir des souches *E. coli* XL1 blue porteuses des plasmides recombinants pQE30-gène d'intérêt (Cf. Tableau 12). Les protéines ont d'abord été purifiées en conditions natives par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. Ces conditions ont permis d'observer une coloration jaune plus ou moins intense pour chaque protéine (Figure 37A). Cette coloration jaune, persistante à la dialyse, était certainement due au groupe prosthétique FMN lié à la protéine comme décrit dans différentes publications (23,32,199,201). Ce cofacteur est difficilement dosable lorsqu'il est lié à la protéine ce qui rendait impossible à ce stade de contrôler ce paramètre. Afin de purifier les protéines sans leur groupe prosthétique, une méthode de purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA en conditions dénaturantes suivie d'une renaturation a été mise au point telle qu'elle est expliquée dans le chapitre V.4 du matériels et méthodes. L'avantage de cette méthode est l'obtention d'une protéine pure sans son groupement prosthétique FMN (apoenzyme). La perte de FMN est visible à l'œil nu du fait de l'absence de coloration jaune lors de la purification (Figure 37B). Cependant, cette technique permet de recouvrer une quantité moindre de protéine pure après élution par rapport à la méthode en conditions natives (Figure 38). De plus, l'efficacité de la renaturation ne peut pas être contrôlée à ce stade. Les gels dénaturants SDS-PAGE nous indiquent que les sous-unités des différentes enzymes ont environ la même taille, autour de 25 kDa, ce qui correspond aux tailles attendues (Cf. Tableau 24).



**Figure 39 : Détection de l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA95 et d'AzoA76.**

100 µL de milieu réactionnel contient 0.1mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH7, 0,1 à 0,5 µg d'enzyme en fonction de l'enzyme et 100 µM de Methyl red (MR). Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/ émission de 250 nm/395 nm (A) et par absorbance à 435 nm (B).



**Figure 40 : Détection de l'activité azoréductase de plusieurs protéines AzoA purifiées à partir du clonage du gène *azoA* de différentes souches d'*E. faecalis*.**

Le nombre associée à la protéine correspond à la souche dont est issue la protéine AzoA80 provient de la souche SFL80, AzoA83 de la souche SFL83, AzoA86 de la souche SFL86, AzoA9501 de la souche SFL9501, AzoA98 de la souche SFL98, AzoA00 de la souche SFL00, AzoA04 de la souche SFL04 et AzoA07 de la souche SFL07. 100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 0,5 µg d'enzyme et 100 µM de MR. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (A) et par absorbance à 435 nm (B).

### III.3. Activités Azoréductase

#### III.3.1. Les protéines AzoA, AzoR et EF0404 ont une activité azoréductase

##### III.3.1.1. AzoA et AzoR

L'activité azoréductase de toutes les protéines pures a été testée sur le Methyl Red (MR). L'activité enzymatique a d'abord été testée avec les protéines purifiées en conditions natives en présence de NADH décrit antérieurement comme un cofacteur des azoréductases (58,59). Une décoloration du MR et une augmentation de fluorescence a été observée avec les enzymes AzoR87 (AzoR de la souche ECO87) et AzoA95 (AzoA de la souche SFL95) avec 1 à 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'enzyme (Figure 39). Une dégradation du MR a aussi été observée avec AzoA76, mais dans ce cas la quantité d'enzyme nécessaire utilisée lors de la réaction a dû être augmentée à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

##### III.3.1.2. Les protéines AzoA des différentes souches d'*E. faecalis*

La protéine AzoA76 est issue de la souche dite atypique de *E. faecalis*. Cette protéine a une activité beaucoup plus faible que celle de la souche typique SFL95. Afin d'avoir une vue plus globale sur l'activité azoréductase de la protéine AzoA de l'espèce *E. faecalis*, le gène *azoA* a été cloné pour toutes les souches testées lors de l'étude de répartition des activités réductases. L'activité azoréductase de toutes les protéines surproduites et purifiées a été testée sur le MR. Toutes les protéines AzoA ont présenté une activité azoréductase excepté celle provenant de la souche SFL80 (Figure 40).

Tous les clonages ont été vérifiés par séquençage. Le séquençage du gène *azoA* de la souche SFL80 cloné dans le vecteur pQE30 a révélé la présence d'un codon stop au milieu de la protéine expliquant l'absence d'activité (Figure 41). Tous les autres gènes *azoA* ont été correctement clonés. Les données de séquençage ont permis d'effectuer un alignement des séquences peptidiques des enzymes testées (Figure 41). Les trois protéines AzoA83, AzoA9501 et AzoA86 présentent un acide glutamique en position 173 alors que les autres protéines présentent un acide aspartique à cet endroit. Cette différence est due à une substitution d'une cytosine par une thymine au niveau de la séquence nucléique (annexe page 332).

Cette analyse des séquences peptidiques n'explique pas pourquoi la souche d'*E. faecalis* SFL76 a un profil de réduction des substrats différent des autres souches

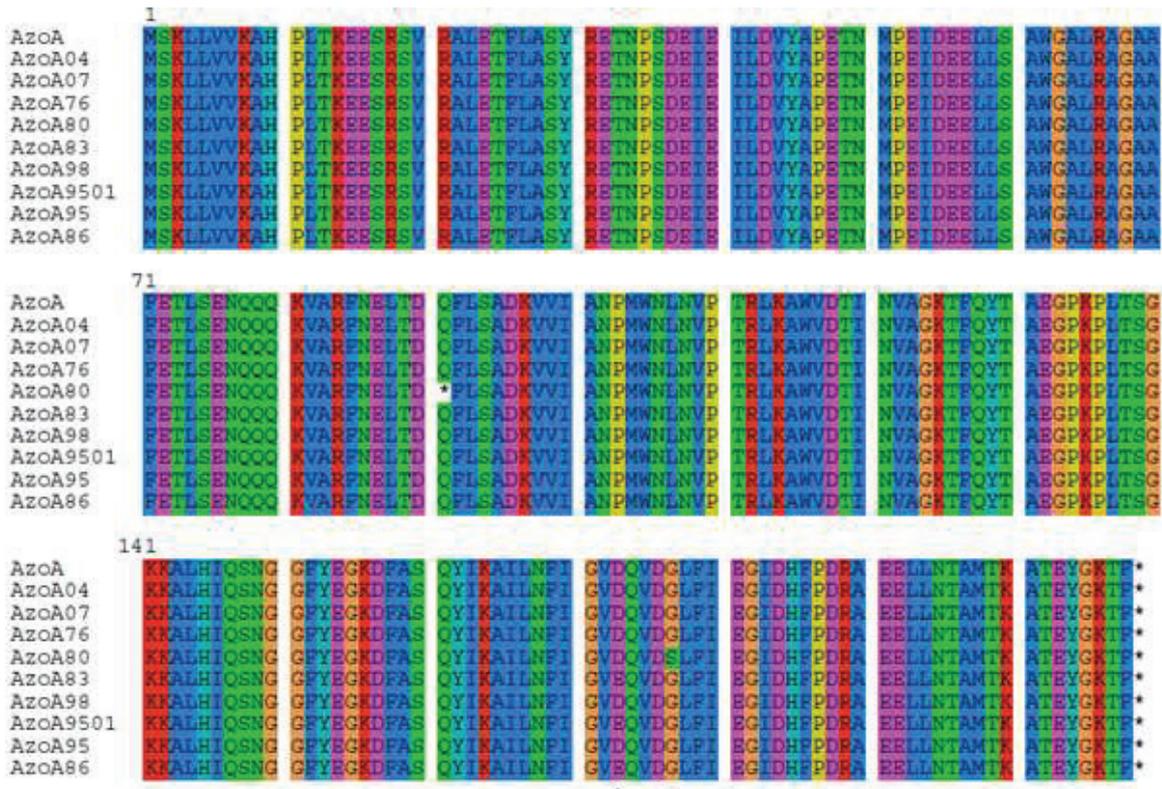


Figure 41 : Alignement des protéines AzoA de toutes les souches d'*E. faecalis* dont gènes *azoA* ont été clonés. Les codons stop sont symbolisés par \* et les acides aminés différents par ●.

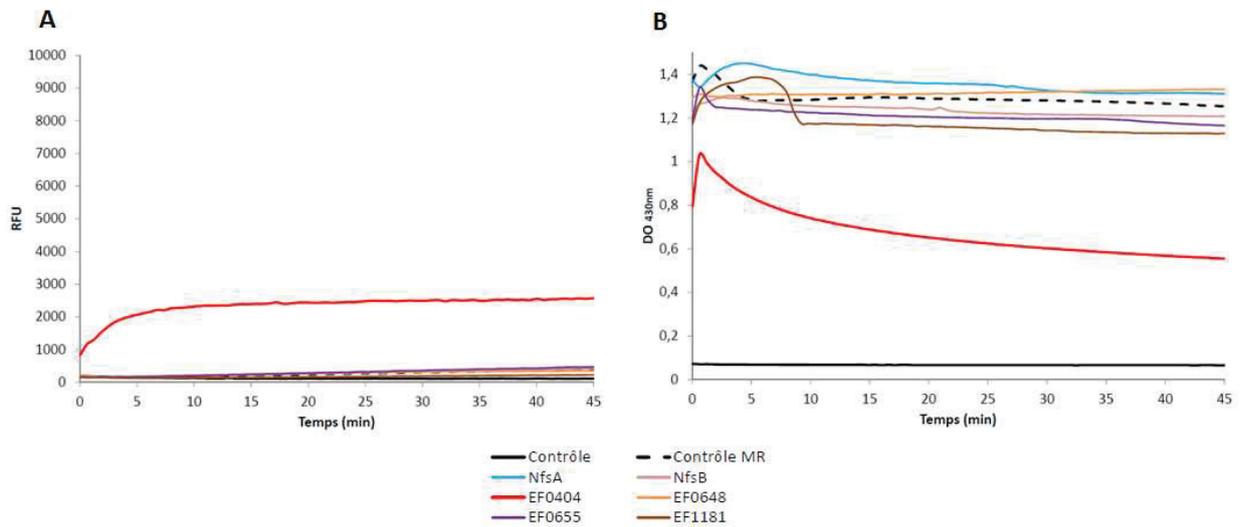


Figure 42 : Détection de l'activité azoréductase de NfsA, NfsB, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181 sur MR.

100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 0,5 µg d'enzyme et 100 µM de MR. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes excitation/émission 250 nm/395 nm (A) et par absorbance à 435 nm (B).

d'*E. faecalis* testées. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Vitek® MS) des souches d'*E. faecalis* testées ainsi qu'une sélection de 38 autres souches d'*E. faecalis* a été effectuée. Le dendrogramme obtenu (annexe page 341) ne permet pas de distinguer plusieurs groupes dans l'espèce *E. faecalis*. Nous ne pouvons donc pas expliquer pourquoi cette souche SFL76 a un profil de réduction différent des autres souches d'*E. faecalis*.

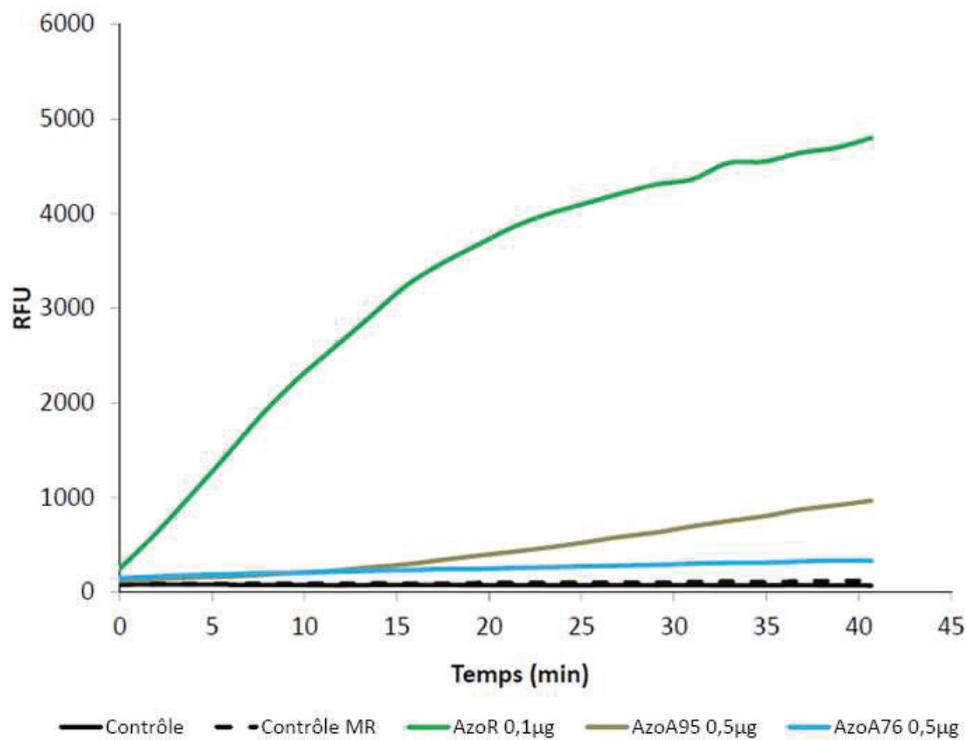
Les intensités maximales de fluorescence observées en figure 39 sont supérieures aux intensités obtenues dans la Figure 39. De plus, les mesures d'absorbance observées dans la figure 39 indiquent que la totalité du MR a dû être consommée, car le niveau final d'absorbance a rejoint le niveau d'absorbance de la courbe contrôle sans MR. La différence majeure entre les 2 figures est la quantité de NADH mais ce point sera abordé plus en détail ultérieurement. Pour la suite de l'étude, AzoA95 a été considérée comme protéine représentative des protéines AzoA.

#### III.3.1.3. EF0404

Toutes les protéines autres que AzoA et AzoR (NfsA, NfsB, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181), associées en théorie à une activité nitroréductase ont été testées sur le MR. Une augmentation de fluorescence et une diminution d'absorbance a été observée uniquement en présence de la protéine EF0404. Ainsi, parmi les enzymes classées parmi les nitroréductases au début de l'étude, seule EF0404 semble avoir une activité azoréductase sur le MR (Figure 42).

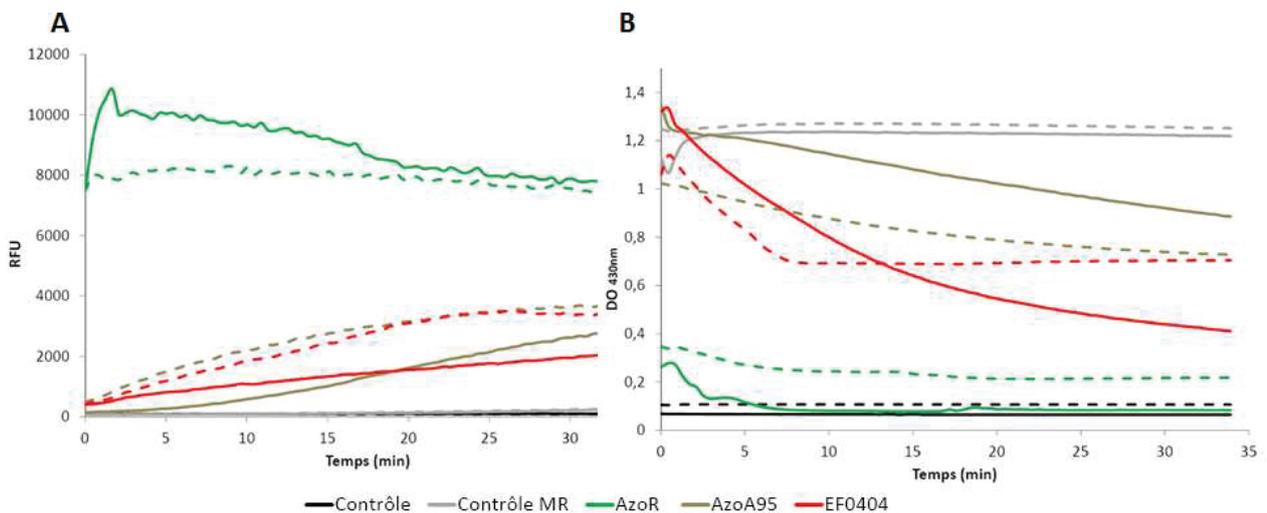
#### III.3.2. Autres substrats « azo »

Les enzymes AzoR87, AzoA95 et AzoA76 ont été testées sur d'autres substrats « azo » : acide 3-(4-phenylazo)benzoïque (HABA), Orange I (Ori), Orange II (OrII), Orange G (OrG) et Tartrazine (Tar) dans les mêmes conditions que le Methyl Red (MR). Une dégradation de l'HABA par augmentation de fluorescence aux longueurs d'onde d'émission/excitation de 250nm/394nm (Figure 43) et diminution d'absorbance à 355nm par AzoR87 et AzoA95 a pu être observée, mais aucun signe d'activité azoréductase n'a pu être mis en évidence pour les autres substrats. Dans ces conditions, AzoR87 avait une faible activité azoréductase sur HABA par rapport à AzoA95. Mais il faut noter qu'il y avait cinq fois plus de protéine AzoA95 que de protéine AzoR87 comme dans les expériences précédentes avec le MR.



**Figure 43 : Détection de l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA95 et d'AzoA76 sur HABA.**

100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 0,1 µg ou 0,5 µg d'enzyme et 100 µM de HABA. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/ émission de 250 nm/394 nm.



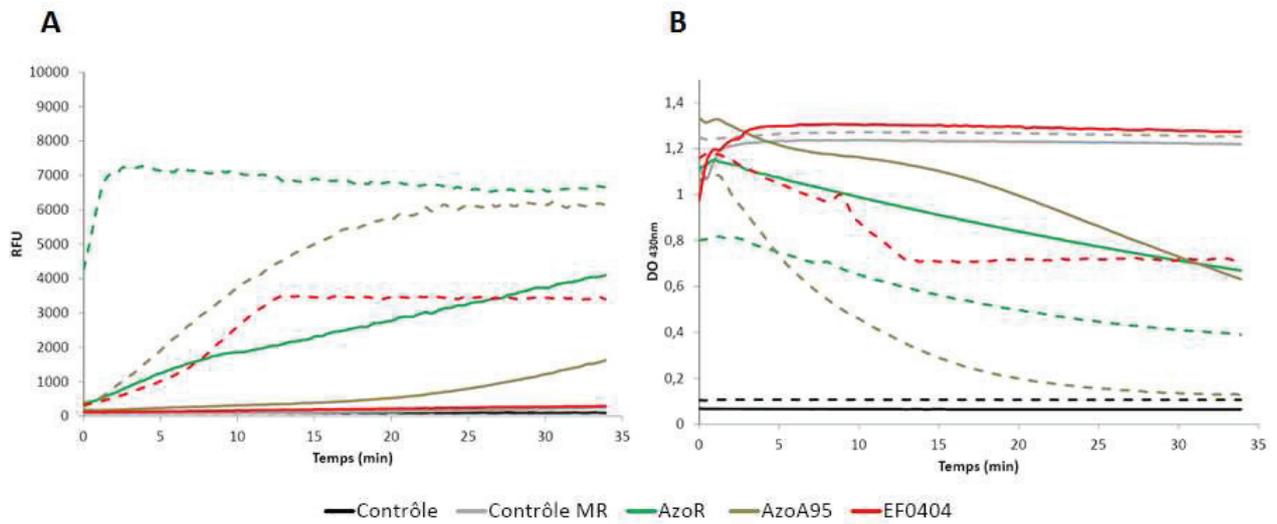
**Figure 44 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité azoréductase d'AzoR, d'AzoA et d'EF0404 purifiées en conditions natives.**

100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH avec (— —) ou sans (—) 5 µM de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1 µg d'enzyme et 100 µM de MR. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (A) et par absorbance à 435 nm (B).

### III.3.3. AzoA, AzoR et EF0404 sont dépendantes de la flavine pour leur activité azoréductase

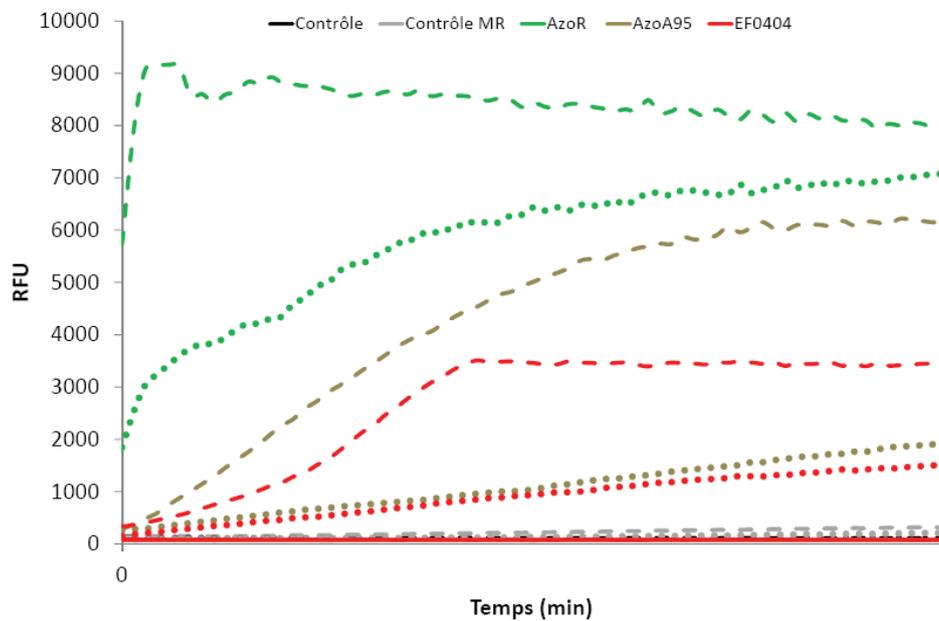
L'activité de AzoA, AzoR et EF0404 purifiées en conditions natives est accélérée en présence de FMN (Figure 44). La couleur jaune des enzymes purifiées en conditions natives indiquait la présence de flavine dans l'échantillon (Figure 37A). Aussi, peu de techniques avaient été recherchées jusqu'alors pour évaluer la quantité de flavine récupérée lors de la purification ou pour éliminer cette FMN de l'enzyme purifiée (32,201). A ce jour, les auteurs s'étaient contentés de montrer que la couleur jaune des étapes de purification était due à la présence de FMN et d'en conclure à la dépendance de toutes ces réductases vis-à-vis de la FMN. Ce paramètre posait un problème pour la reproductibilité des études d'enzymologie car la quantité de FMN apportée par l'enzyme dans le milieu réactionnel n'était pas comparable d'un lot d'enzyme à un autre. Pour pallier à ce problème, une méthode de purification en conditions dénaturantes suivie d'une renaturation a été mise au point pour purifier les enzymes sous leur forme apoenzyme (96).

L'activité azoréductase des apoenzymes était inexistante pour l'enzyme EF0404 et faible pour l'enzyme AzoR en présence de NADH seul (Figure 45). Une augmentation de fluorescence a débuté en fin d'incubation et une diminution d'absorbance a été également observée avec l'apoenzyme AzoA en présence de NADH seul. Il n'est donc pas possible de dire que l'activité azoréductase de l'apoenzyme AzoA est inexistante en absence de FMN mais celle-ci est très faible. L'ajout de FMN a provoqué une accélération de la réduction du MR par ces enzymes. Les deux enzymes AzoA et EF0404 sont donc dépendantes de la flavine pour leur activité azoréductase (Figure 45). Cependant, pour l'enzyme AzoR, une augmentation de fluorescence a pu être observée malgré l'absence de FMN ajoutée de manière contrôlée dans le milieu réactionnel. Selon ces résultats, l'activité azoréductase de l'enzyme AzoR ne semble donc pas strictement dépendante à la flavine.



**Figure 45 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité azoréductase des apoenzymes AzoR, AzoA et EF0404.**

100  $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH avec (— —) ou sans (—) 5  $\mu$ M de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de MR. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (A) et par absorbance à 435 nm (B).



**Figure 46 : Effet du NAD(P)H sur l'activité azoréductase des apoenzymes AzoR, AzoA95 et EF0404.**

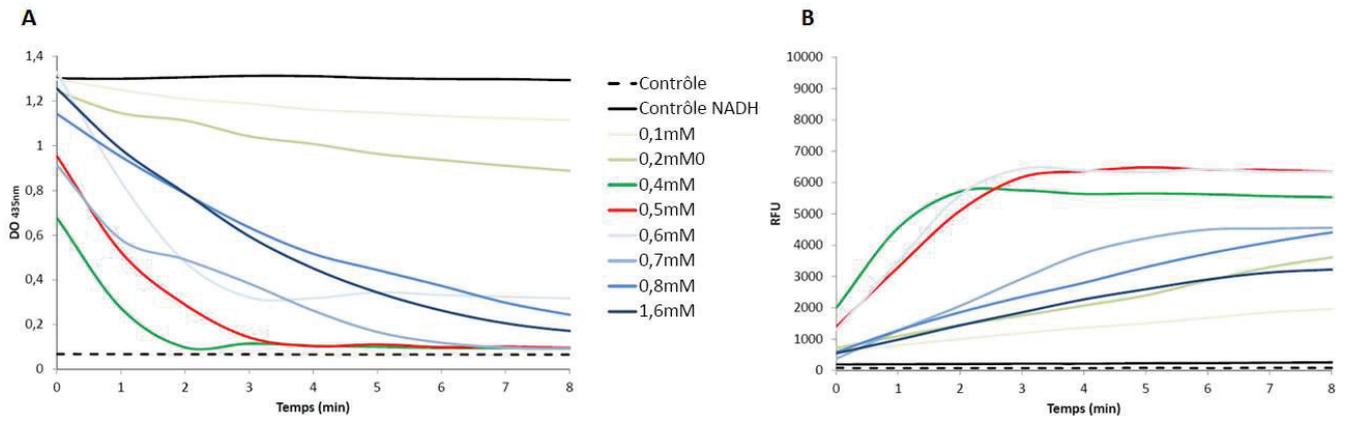
100 $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH (— —) ou NADPH (•••) avec 5  $\mu$ M de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de MR. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel tampon phosphate de sodium avec FMN sans enzyme avec ou sans MR. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm.

### **III.3.4. AzoR, AzoA et EF0404 ont une préférence pour le NADH pour leur activité azoréductase**

Jusqu'alors, les résultats montrés ont été obtenus dans un milieu réactionnel contenant du NADH comme donneur d'électron. En effet, ces enzymes ont été incapables de réduire leur substrat sans un cofacteur donneur d'électron (Figure 46). Cependant, le NADH n'est pas le seul cofacteur possible pour ce type d'enzyme. Une comparaison entre NADH et NADPH comme cofacteur a donc été entreprise. L'enzyme AzoR est apparue capable d'utiliser le NADH et le NADPH comme donneur d'électron. Toutefois, la réaction était plus rapide avec le NADH comme cofacteur. L'activité azoréductase des enzymes AzoA et EF0404 était très faible en utilisant le cofacteur NADPH en comparaison du NADH (Figure 46). Les autres enzymes ont également été testées en présence du NADPH pour l'activité azoréductase mais aucune de ces enzymes n'a révélé une activité azoréductase strictement NADPH dépendante. Toutes les enzymes testées ayant une activité azoréductase semblent donc avoir une préférence pour le NADH. Mais cette analyse reste qualitative et non quantitative., les notions de préférence restent à démontrer par la détermination des constantes d'affinité ( $K_m$ ). Ce point sera abordé ultérieurement.

### **III.3.5. La quantité de NADH influence la vitesse de réaction**

Le cofacteur NADH est nécessaire à l'activité azoréductase des enzymes testées. Différentes concentrations en NADH ont été testées pour évaluer l'influence de ce paramètre sur la réaction. L'augmentation de la concentration en NADH jusqu'à 0,4 mM a permis d'augmenter la vitesse de réaction (Figure 47). Au-delà de 0,4 mM, une diminution de la vitesse de réaction a été observée. A partir de 0,4 mM, une décoloration totale du substrat a été constatée entre 2 et 8 minutes d'incubation, le niveau d'absorbance à 435 nm atteint avec ces concentrations était équivalent à l'absorbance du tampon phosphate de sodium seul (sauf pour 0,6 mM, concentration pour laquelle le niveau d'absorbance final était plus élevé que l'absorbance du tampon phosphate de sodium seul sans explication) (Figure 47A). Cette décoloration totale pouvait indiquer une consommation de la totalité du MR présent dans le milieu réactionnel. En cas de consommation de la totalité du MR, la concentration maximale de produit fluorescent devrait être atteinte et donc le niveau de fluorescence devrait être maximal. Or, les niveaux de fluorescence les plus élevés ont été obtenus avec 0,4, 0,5 et 0,6 mM de NADH. Pour les concentrations supérieures à 0,6mM, les



**Figure 47 : Influence de la quantité en NADH sur l'activité azoréductase de AzoA95 purifiée en conditions natives.**

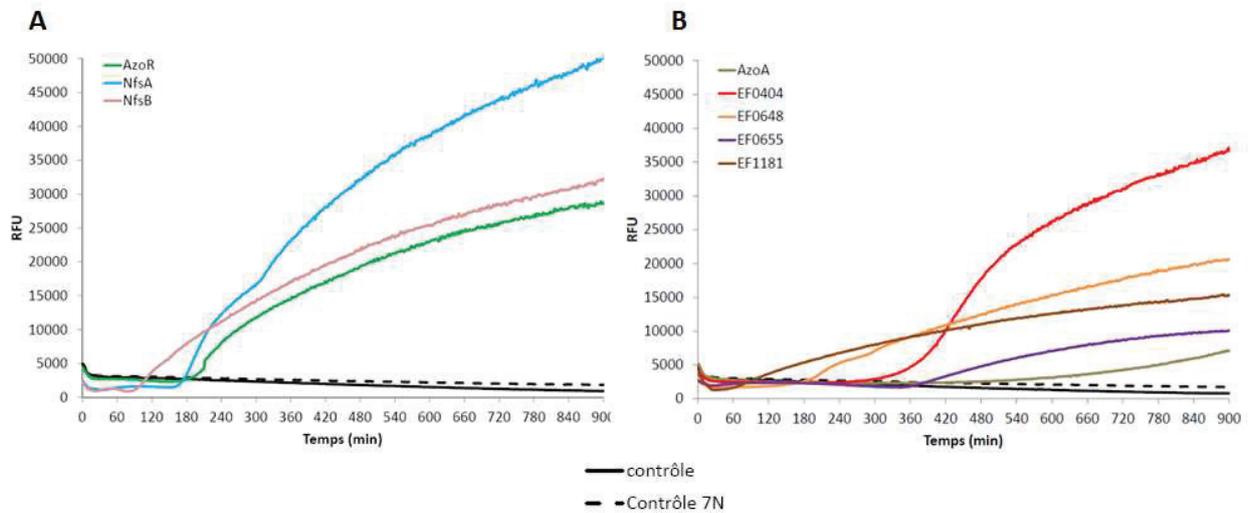
100 µL de milieu réactionnel contient 0,1 à 1,6 mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH7, 0.1 µg d'enzyme et 100 µM de MR. Le puits contrôle NADH est constitué du milieu réactionnel sans enzyme avec NADH 1,6 mM. Le puits contrôle ne contient que du tampon phosphate de sodium. La réduction du substrat est suivie par lecture de l'absorbance à 435 nm (A) et de la fluorescence aux longueurs d'ondes maximales d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (B).

paliers de fluorescence atteints ont diminué (Figure 47B).

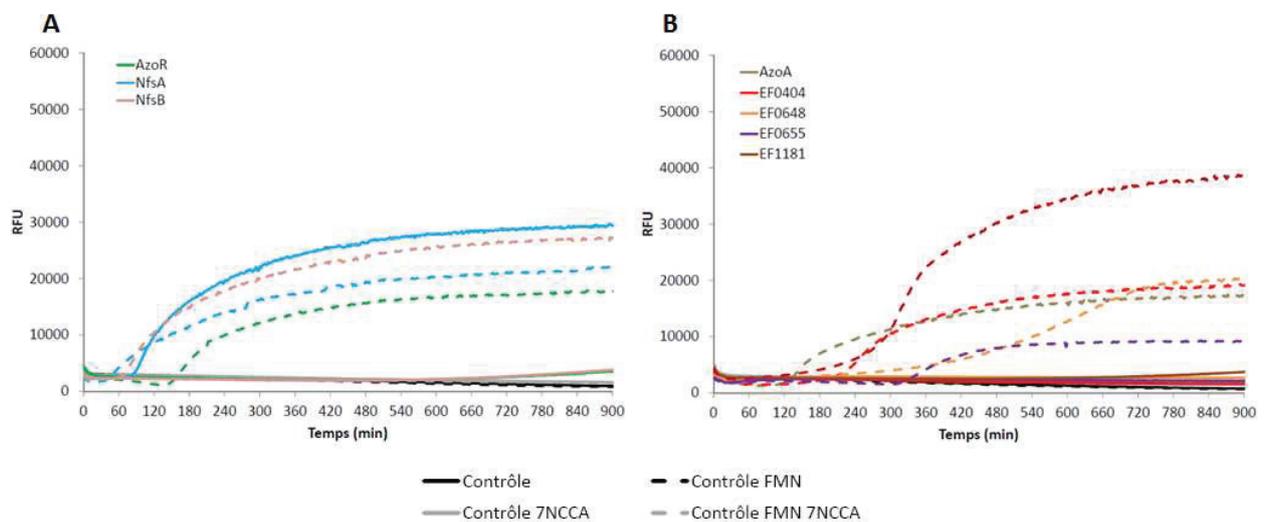
Ainsi, il est nécessaire d'avoir une concentration de NADH 4 fois supérieure à celle du substrat « azo » dans le milieu réactionnel pour une dégradation de la totalité du substrat « azo ». Par contre, au-dessus de cette concentration, la vitesse de réaction diminue. L'ajout d'une quantité excessive de NADH semble avoir un effet inhibiteur sur la réaction de réduction du MR. De même que précédemment, cette analyse reste qualitative et non quantitative.

### III.3.6. Conclusion sur les activités azoréductases

Parmi toutes les protéines purifiées, seules 3 ont une activité azoréductase : Azor chez *E. coli* ainsi que AzoA et EF0404 chez *E. faecalis*. Les enzymes sont dépendantes de la flavine pour leur activité azoréductase chez *E. faecalis*, ce qui reste à vérifier pour Azor chez *E. coli*. Toutes ces enzymes semblent avoir une préférence pour le NADH comme donneur d'électron mais cela reste à prouver quantitativement. Néanmoins, le cofacteur NADH peut avoir un effet inhibiteur dès que le ratio NADH/substrat est supérieur à 4.



**Figure 48 : Détection de l'activité nitroréductase de toutes les protéines purifiées en conditions natives d'*E. coli* (A) et d'*E. faecalis* (B).** 100  $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADPH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de 7NCCA. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec ou sans 7NCCA. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes maximales d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.



**Figure 49 : Effet de la flavine sous forme FMN sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes d'*E. coli* (A) et d'*E. faecalis* (B).** 100  $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADPH avec (— —) ou sans (—) 5  $\mu$ M de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de 7NCCA. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel sans enzyme avec (gris) ou sans (noir) 7NCCA. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.

### III.4. Activité Nitroréductase

#### III.4.1. Toutes les protéines purifiées ont une activité nitroréductase

La réduction du 7NCCA a été testée dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 avec le NADPH comme cofacteur pour les 8 protéines purifiées en conditions natives. Le cofacteur NADPH a été privilégié au cofacteur NADH en raison des enzymes déjà décrites comme étant NADPH-dépendantes (par exemple NfsA). Toutes ces protéines ont été capables de réduire le 7NCCA (Figure 48). Cependant, la réaction était étonnamment longue pour une réaction enzymatique avec des enzymes pures. Contrairement à la réaction de réduction du MR, il fallait attendre 1 à 2 heures, avec les enzymes les plus rapides, avant d'observer une augmentation de fluorescence signifiant l'apparition du produit final de réduction. Cette observation était inattendue car l'activité nitroréductase par les cellules en croissance dans du TSB sur ce substrat était l'une des activités réductases la plus rapide (Annexe page 310).

#### III.4.2. Vérification de l'activité nitroréductase *in vitro* AzoR.

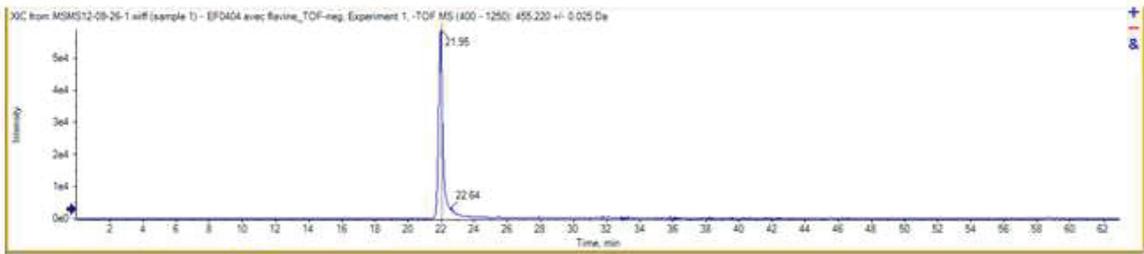
Les cellules du triple mutant *ECOΔazoR-nfsA-nfsB* ont été transformées avec le plasmide pQE-*azoR* pouvant surexprimer *azoR*. En surexprimant la protéine AzoR dans cette souche, la purification pouvait être faite sans risque de contaminer l'échantillon avec les protéines nitroréductase NfsA ou NfsB. La protéine AzoR a été surproduite et purifiée à partir de ces cellules. La protéine a été testée avec le 7NCCA et une réduction du substrat équivalente aux tests effectués avec l'enzyme AzoR purifiée à partir de la souche *ECO/pazoR87* a pu être observée. Ces données nous ont permis de confirmer l'activité nitroréductase de AzoR.

#### III.4.3. La dépendance à la flavine est spécifique de l'enzyme

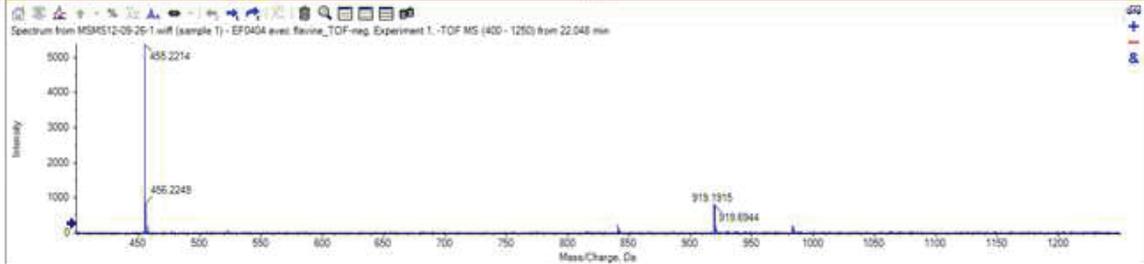
Les nitroréductases sont décrites comme flavoprotéines. Comme pour les azoréductases décrites précédemment, les échantillons de nitroréductases purifiées en conditions natives étaient jaunes. Le même procédé de purification en conditions dénaturantes a donc été mis en œuvre. L'activité nitroréductase a ensuite été testée avec 0,5 mM de NADPH et 5 μM de FMN.

EF0404

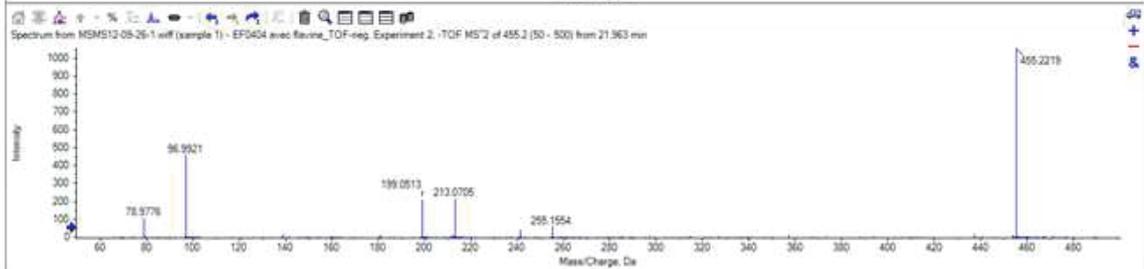
A1



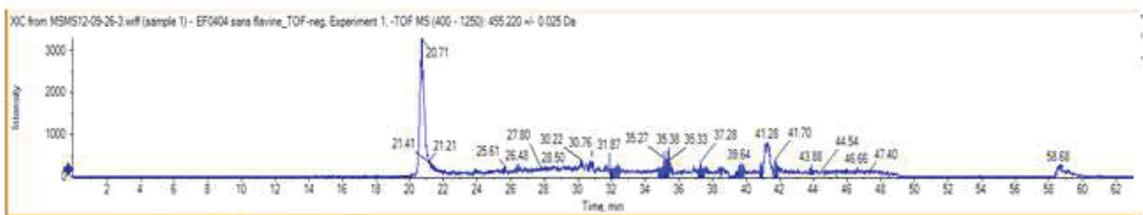
A2



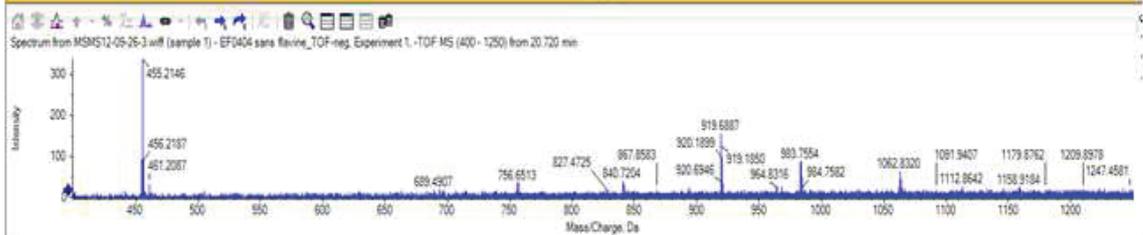
A3



B1



B2



B3

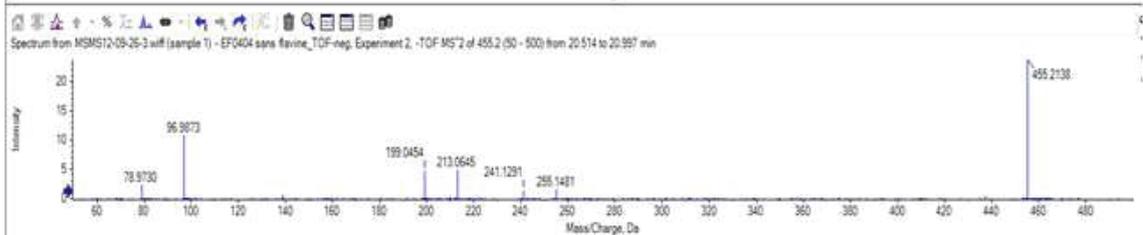


Figure 50 : Spectres d'analyse LC-ESI-MS des échantillons de protéine EF0404.

A) Echantillon de protéine EF0404 purifiée en conditions natives. B) Echantillon de protéine EF0404 purifiée en conditions dénaturantes. 1) chromatogramme en phase liquide, 2) Spectre MS en mode négatif, 3) spectre MS-MS.

#### III.4.3.1. Enzymes d'*E. coli*

Une augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit a été observée uniquement en présence de FMN pour les enzymes AzoR et NfsB purifiées en conditions dénaturantes (Figure 49A). Par contre, pour l'enzyme NfsA purifiée en conditions dénaturantes, une augmentation de fluorescence a été observée en présence et en absence de FMN (Figure 49A). La vitesse d'augmentation de fluorescence pour l'enzyme NfsA était plus rapide en présence de FMN, mais cette augmentation de fluorescence a commencé plus tard que dans le milieu réactionnel de NfsA sans FMN. D'après ces données, toutes les enzymes chez *E. coli* ne semblent pas avoir la même dépendance à la flavine. Les enzymes AzoR et NfsB semblent strictement dépendantes de la flavine pour leur activité nitroréductase contrairement à l'enzyme NfsA.

#### III.4.3.2. Enzymes d'*E. faecalis*

Une augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit a été observée uniquement en présence de FMN pour toutes les enzymes d'*E. faecalis* (AzoA, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181) purifiées en conditions dénaturantes (Figure 49B). Ces enzymes semblent donc strictement dépendantes de la flavine.

#### III.4.3.3. Dosage de la flavine dans les échantillons de protéines pures

La méthode de purification en conditions dénaturantes a été mise au point afin de purifier les protéines sans leur cofacteur FMN. La disparition de la coloration jaune tend à montrer qu'une grande partie de la flavine présente dans l'échantillon de protéine a été éliminée. Cependant, l'observation d'une activité enzymatique sans ajout de flavine pour les protéines AzoR (dans le cadre de son activité azoréductase) et NfsA (dans le cadre de son activité nitroréductase) pose des questions sur l'élimination de la totalité de la flavine. Pour vérifier cela, les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en électrospray (LC-ESI-MS). En théorie, la flavine a une masse de 456,3 Da. La flavine a été détectée par chromatographie en phase liquide avec un pic de rétention situé entre 20 minutes et 24 minutes (le pic de rétention a tendance à se décaler vers la droite sur l'échelle du temps au fur et à mesure des échantillons injectés) (chromatogramme). La flavine a été détectée par le spectromètre de masse en mode négatif à 455,2 Da (spectre MS). Afin de confirmer la présence de la flavine, l'ion à 455,2 Da a été

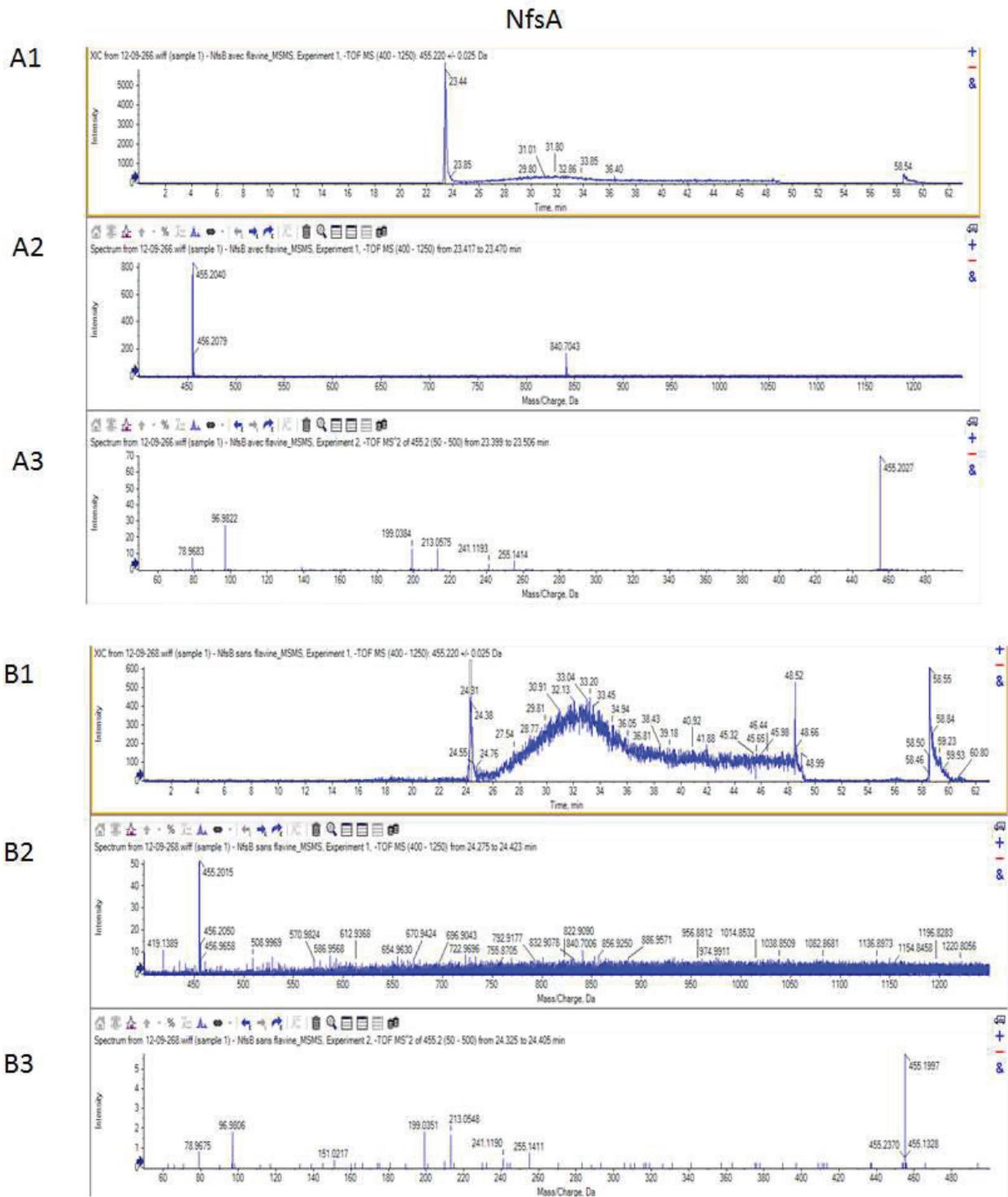


Figure 51 : Spectres d'analyse LC-ESI-MS des échantillons de protéine NfsA..

A) Echantillon de protéine NfsA purifiée en conditions natives. B) Echantillon de protéine NfsA purifiée en conditions dénaturantes. 1) chromatogramme en phase liquide, 2) Spectre MS en mode négatif, 3) spectre MS-MS.

fragmenté en sachant que la fragmentation de la flavine pure donnait des fragments à 78,9 Da, 96,9 Da, 199,05 Da, 213,07 Da et 255,16 Da (spectre MS-MS). Les différents pics de la flavine cités ci-dessus ont été retrouvés dans tous les échantillons de protéines analysés par cette méthode (Figure 50, Figure 51 et annexe page 343). Ces données indiquent donc qu'il restait de la flavine dans les échantillons de protéines purifiées en conditions natives mais aussi dans les échantillons purifiés en conditions dénaturantes. Cependant, les quantités de flavine étaient plus faibles dans les échantillons purifiés en conditions dénaturantes que dans les échantillons purifiés en conditions natives. En effet, en comparant les concentrations de flavine pour les deux méthodes de purification (intensité des pics de rétention obtenu par chromatographie en phase liquide), nous avons pu remarquer qu'il y avait environ 90% à 99% de flavine en moins dans les échantillons de protéines purifiées en conditions dénaturantes par rapport aux échantillons de protéines purifiées en condition natives.

Par exemple, les échantillons de la protéine EF0404 ont été injectés à une concentration de  $86 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Le pic de rétention de la flavine de l'échantillon de protéine EF0404 purifiée en conditions natives avait une intensité d'environ  $5 \cdot 10^5$  alors que le pic de rétention de la flavine de l'échantillon de protéine EF0404 purifiée en conditions dénaturantes avait une intensité de 3500 (Figure 50). En faisant le rapport des deux intensités ( $3500/5 \cdot 10^5$ ) on a obtenu une valeur de 0,007 que l'on a pu interpréter comme un pourcentage de flavine éliminé de  $100 \cdot (1 - 0,007) = 99,3 \%$  pour la protéine EF0404 purifiée en conditions dénaturantes.

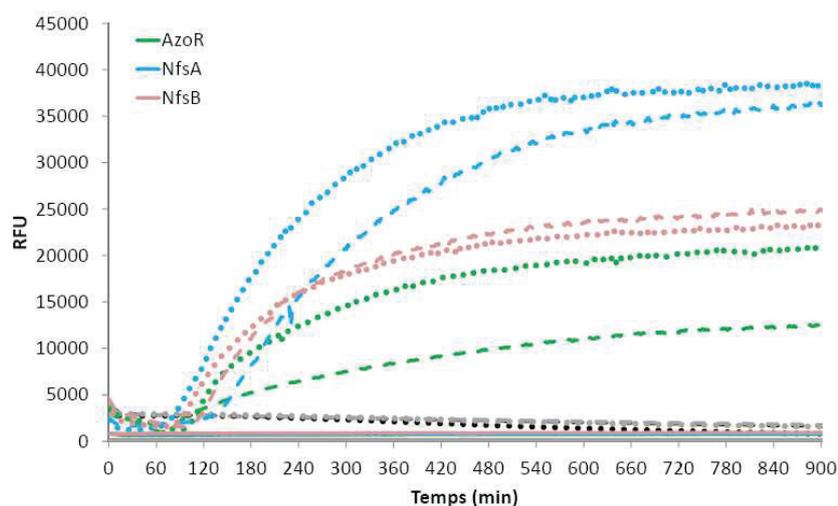
Le même calcul a pu être fait pour les échantillons de la protéine NfsA. Les échantillons de la protéine NfsA ont été injectés à une concentration de  $86 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Le pic de rétention de la flavine de l'échantillon de protéine NfsA purifiée en conditions natives avait une intensité d'environ 5500 alors que le pic de rétention de la flavine de l'échantillon de protéine NfsA purifiée en conditions dénaturantes avait une intensité d'environ 450 (Figure 51). Le rapport des deux intensités ( $450/5500$ ) a donné 0,08. Cette donnée a pu être interprétée de la même façon que pour la protéine EF0404 comme un pourcentage de flavine éliminée soit  $100 \cdot (1 - 0,08) = 92 \%$ .

Tous les échantillons de protéines n'ont pas pu être analysés par cette méthode. Parmi les échantillons de protéines analysés, il y a AzoR, NfsB, AzoA (Annexes pages 343 à 347). Les pourcentages de flavines perdus entre la méthode de purification en conditions

Espèce bactérienne	Echantillon protéique	Concentration injectée en ng.µL <sup>-1</sup>	Intensité du pic de rétention	Pourcentage de flavine éliminée
<i>E. faecalis</i>	EF0404 conditions natives	86	5.10 <sup>5</sup>	100*(1-(3500/5.10 <sup>5</sup> )) = 99,3%
	EF0404 conditions dénaturantes	86	3500	
	AzoA conditions natives	44	2000	100*(1-(400/2000*1,9)) = 89,5%
	AzoA conditions dénaturantes	86	400	
<i>E. coli</i>	NfsA conditions natives	86	5500	100*(1-(450/5500)) = 92%
	NfsA conditions dénaturantes	86	450	
	AzoR conditions natives	103	5.10 <sup>4</sup>	100*(1-(2000*2,3/5.10 <sup>4</sup> )) = 90,8%
	AzoR conditions dénaturantes	44	2000	
	NfsB conditions natives	86	4.10 <sup>4</sup>	100*(1-(3500/4.10 <sup>4</sup> )) = 91,25%
	NfsB conditions dénaturantes	86	3500	

**Tableau 30 : Pourcentage de flavine éliminée par la méthode de purification en conditions dénaturantes.**

Les échantillons de protéines purifiées en conditions natives sont en bleu et les échantillons de protéines purifiées en conditions dénaturantes sont en rouge.



**Figure 52 : Effet du NAD(P)H sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes purifiées *E. coli*.**

100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH (— —) ou NADPH (●●) avec 5 µM de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1 µg d'enzyme et 100 µM de 7NCCA. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel tampon phosphate de sodium sans enzyme avec (gris) ou sans (noir) 7NCCA. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.

natives et celle en conditions dénaturantes sont de 90,8% pour AzoR, 91,25% pour NfsB et de 89,5% pour AzoA (Tableau 30)

#### III.4.4. Dépendance au NAD(P)H

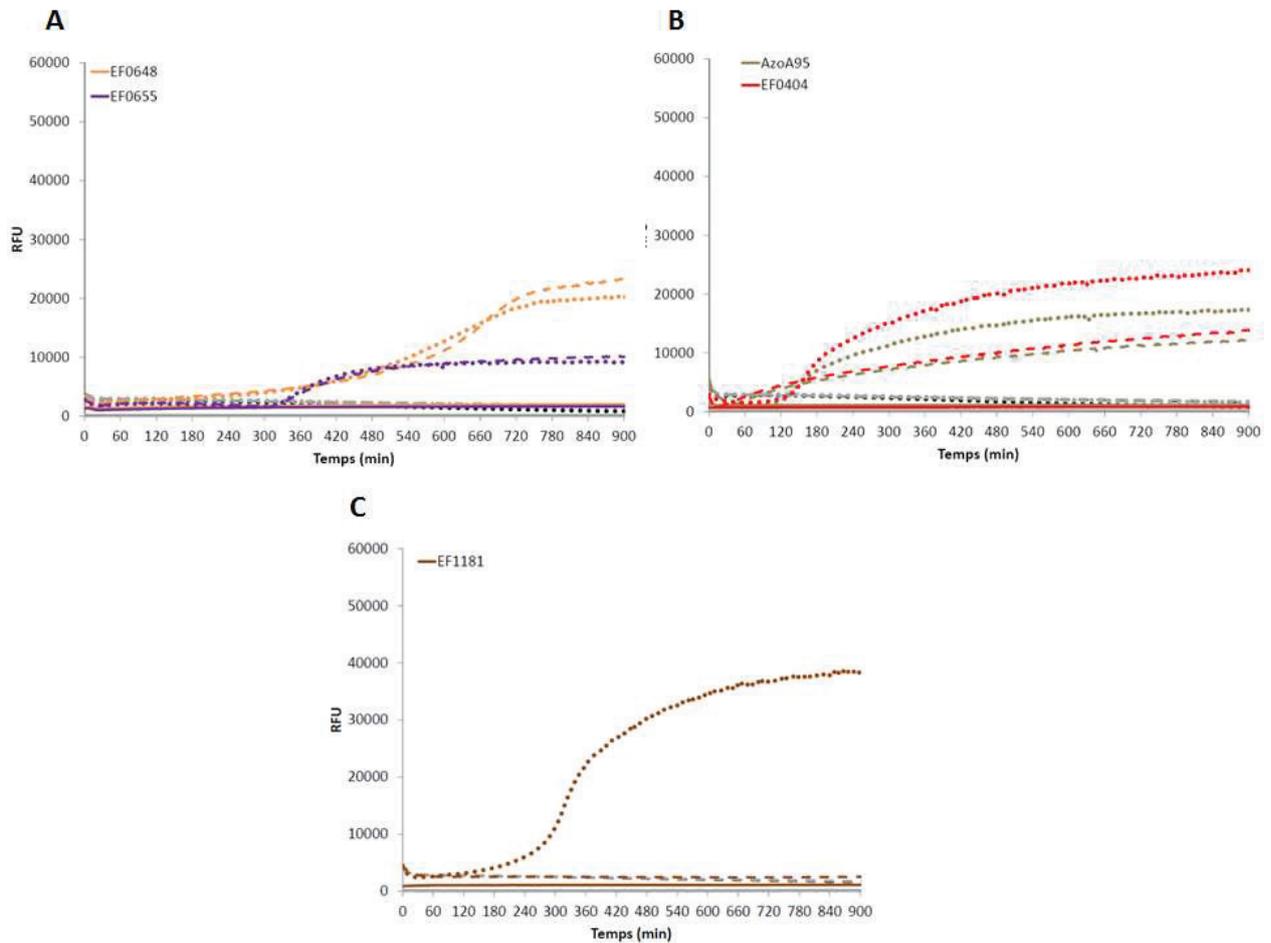
La dépendance au cofacteur NAD(P)H est un paramètre important pour l'activité enzymatique des nitroréductases insensibles à l'oxygène. La préférence de l'enzyme vis-à-vis d'un cofacteur permet de classer les nitroréductases dans les groupes A ou B des nitroréductases insensibles à l'oxygène. La réduction du 7NCCA a donc été testée en utilisant le cofacteur NADH ou NADPH.

##### III.4.4.1. Enzymes d'*E. coli*

Une augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit a été observée avec les 2 types de cofacteurs pour les 3 protéines d'*E. coli* (AzoR, NfsA et NfsB) (Figure 52). Cependant, cette augmentation de fluorescence était plus rapide avec le cofacteur NADPH qu'avec le cofacteur NADH pour les enzymes AzoR et NfsA. La préférence de l'enzyme NfsA pour le cofacteur NADPH n'a pas été une surprise étant donné que cette enzyme a déjà été classée dans le groupe A, le groupe des nitroréductases dépendantes du NADPH. L'enzyme NfsB semblait avoir la même activité sur le substrat 7NCCA avec l'un ou l'autre des cofacteurs, ce qui est cohérent avec les propriétés du groupe B des nitroréductases insensibles à l'oxygène (Figure 52).

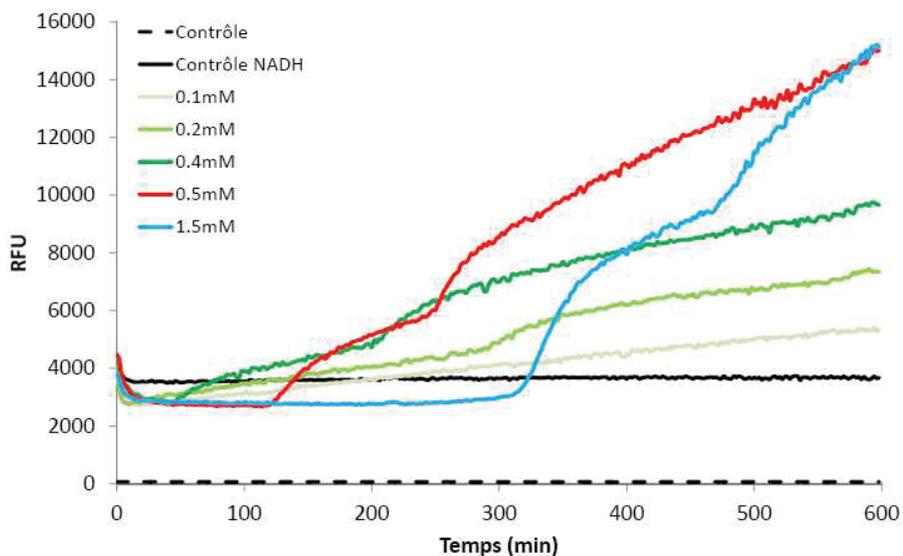
##### III.4.4.2. Enzymes d'*E. faecalis*.

Parmi les protéines chez *E. faecalis*, il a été possible de distinguer 3 groupes. L'augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit était équivalente entre le cofacteur NADH et le cofacteur NADPH pour les enzymes EF0648 et EF0655 (Figure 53A) contrairement aux enzymes EF0404 et AzoA avec lesquelles l'augmentation de fluorescence était légèrement plus rapide avec le cofacteur NADPH par rapport au cofacteur NADH (Figure 53B). Par contre, l'augmentation de fluorescence n'était visible qu'en présence du cofacteur NADPH pour l'enzyme EF1181. Cette enzyme, incapable d'utiliser le NADH comme donneur d'électron peut donc être classée dans le groupe A des nitroréductases insensibles à l'oxygène (Figure 53C).



**Figure 53 : Effet du NAD(P)H sur l'activité nitroréductase de toutes les apoenzymes purifiées *E. faecalis*.**

100  $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH (— —) ou NADPH (●) avec 5  $\mu$ M de FMN, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 1  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de 7NCCA. Les puits contrôles sont constitués du milieu réactionnel tampon phosphate de sodium sans enzyme avec (gris) ou sans (noir) 7NCCA. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.



**Figure 54 : Influence de la quantité en NADH sur l'activité nitroréductase de EF0404 purifiée en conditions natives.**

100  $\mu$ L de milieu réactionnel contient 0,1 à 1,5 mM de NADH, 50 mM tampon phosphate de sodium pH 7, 0,5  $\mu$ g d'enzyme et 100  $\mu$ M de 7NCCA. Le puits contrôle NADH est constitué du milieu réactionnel sans enzyme avec NADH 1,5 mM. Le puits contrôle ne contient que du tampon phosphate de sodium. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.

#### III.4.4.3. Influence de la concentration en NADH sur l'activité nitroréductase

Précédemment, l'influence de la concentration en NADH sur l'activité azoréductase a été testée sur l'activité azoréductase de l'enzyme pure EF0404. L'influence de la concentration en NADH sur l'activité nitroréductase a également été testée sur l'activité nitroréductase de cette même enzyme pure EF0404. Lors de nos essais, nous avons pu constater que la courbe d'augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit pouvait avoir une forme atypique pour une réaction enzymatique avec enzymes pures et présenter 4 phases. La première phase correspond à une diminution de fluorescence, suivie par une seconde phase d'absence de variation de fluorescence (phase plateau). Puis, deux phases d'augmentation de fluorescence se succèdent. Nous avons remarqué qu'en augmentant la quantité de NADH, la durée de la phase plateau augmentait (Figure 54). Par ailleurs, l'augmentation de la quantité de cofacteur NADH a permis d'atteindre des niveaux de fluorescence plus élevés indiquant ainsi que la quantité de substrat réduit augmentait à mesure que la quantité de cofacteur NADH augmentait (Figure 54). Toutefois, il était difficile d'évaluer la quantité de substrat consommé car le produit final obtenu n'est pas connu contrairement au MR pour lequel on connaît le produit de réduction fluorescent. De plus, l'indication supplémentaire apportée par la décoloration du MR permettait d'évaluer visuellement la quantité de substrat restant, ce qui n'est pas possible ici.

La courbe atypique en plusieurs phases fait suggérer un lien avec les différents intermédiaires de réaction qu'il est possible d'obtenir au cours d'une réaction de réduction d'un composé « nitro », mais ceci sera traité ultérieurement en point IV.

#### III.4.5. Amélioration du milieu réactionnel des nitroréductases

##### III.4.5.1. Les peptones.

La réduction du 7NCCA par les protéines pures EF0404 et EF1181 a été testée dans différents tampons ainsi que dans le milieu TSB utilisé pour la croissance des microorganismes lors des essais de réduction des différents substrats par cellules entières. Les enzymes EF0404 et EF1181 ont été choisies pour représenter les enzymes capables d'utiliser les cofacteurs NADH et NADPH (cas de EF0404) et les enzymes capables d'utiliser uniquement le cofacteur NADPH comme donneur d'électron (cas de EF1181). Le cofacteur NADH a été utilisé pour le milieu réactionnel de l'enzyme EF0404 tandis que c'est le

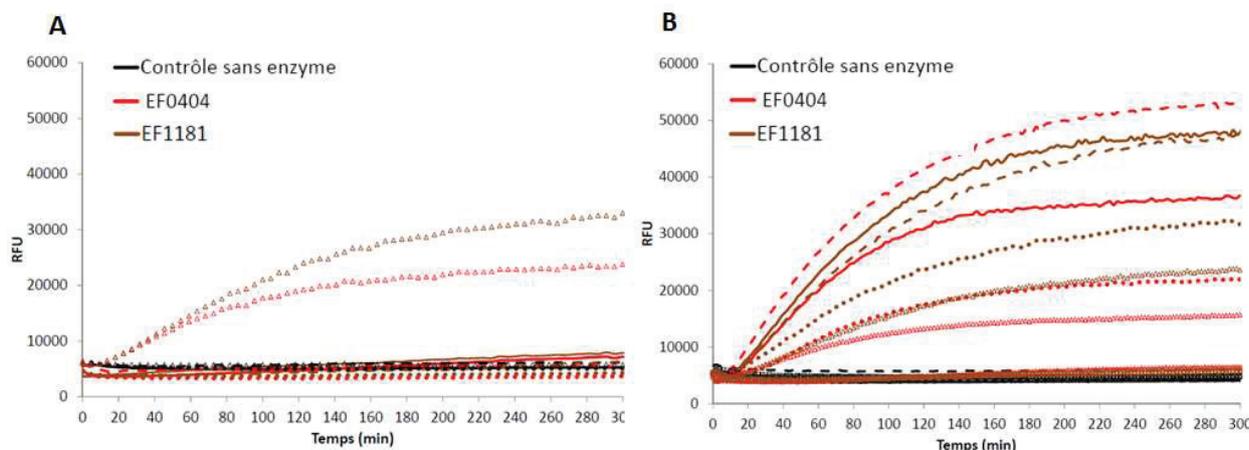


Figure 55 : Effet de différents milieux sur l'activité nitroréductase des enzymes EF0404 et EF1181 purifiées en conditions natives.

A) Effet de différents tampon et du TSB sur la réduction de 7NCCA. Les différents milieux testés des tampons à 50 mM pH 7 (MOPS (—), phosphate de sodium (— —), HEPES (●), du TSB commercial (Δ). B) Effet des différents composants du TSB. Le TSB (—) est composé de peptones de caséine à 17 g.L<sup>-1</sup> (— —), peptones de soja à 3 g/L (●), D-glucose à 1,5 g.L<sup>-1</sup> (□), chlorure de sodium à 2,5 g.L<sup>-1</sup> (+) et du tampon phosphate de potassium à 2,5 g.L<sup>-1</sup> (o). Le TSB commercial (Δ) est laissé comme témoin interne. L'activité de EF0404 a été testée avec NADH alors que celle de EF1181 a été testée avec NADPH. 100 μL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NAD(P)H, 0,5 μg d'enzyme et 100 μM de 7NCCA. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm.

Enzymes	EF0404		EF0655	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Cofacteurs				
Peptone de soja	+	+	+	+
Peptone de caséine	+	+	+	+
Phe-Phe	inhibition	inhibition	inhibition	inhibition
Ala-Ala	-	+	-	-
Gly-Gly	-	-	-	-
Leu-Gly-Gly	-	-	-	-
Pro-Gly-Gly	-	-	-	-
Ala-Ala/Gly-Gly/Leu-Gly-Gly	-	-	-	-
Ala-Ala/Gly-Gly Pro-Gly-Gly	-	-	-	-
Ala-Ala/Gly-Gly/Leu-Gly-Gly/Pro-Gly-Gly	-	-	-	-
Phe-Phe/Ala-Ala/Gly-Gly/Leu-Gly-Gly/Pro-Gly-Gly	-	-	-	-

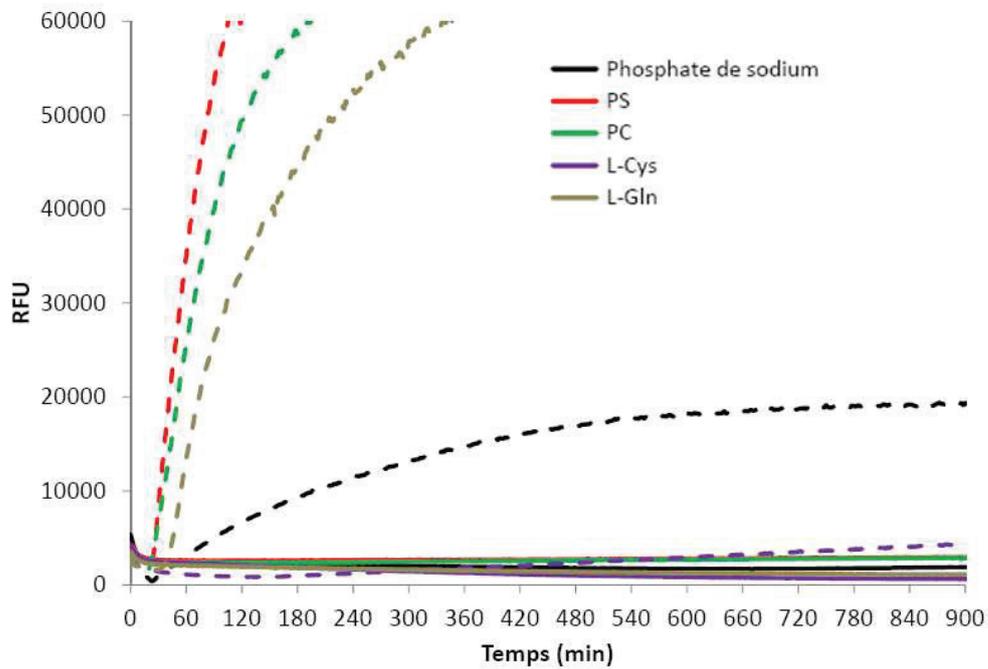
Tableau 31 : Influence de peptides sur la réduction du substrat 7NCCA par les enzymes EF0404 et EF0655 purifiées en conditions dénaturantes.

100 μL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH, 5 μM FMN, 1 μg d'enzyme et 100 μM de 7NCCA dans 50 mM de solution d'acides aminés ou peptone. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm. Une amélioration de la vitesse de réaction est notée +, une diminution de la vitesse de réaction est notée - et une inhibition de la réaction est notée lorsqu'il n'y a aucune augmentation de fluorescence observée durant le temps d'incubation de 20 h

cofacteur NADPH qui a été utilisé pour le milieu réactionnel de l'enzyme EF1181. Il s'est avéré que la réaction était nettement plus rapide dans le milieu TSB en observant un début d'augmentation de fluorescence dès 10 minutes de réaction (Figure 55A). Le TSB est composé de peptone de caséine (17 g.L<sup>-1</sup>), peptone de soja (3 g.L<sup>-1</sup>), D-glucose (1,5 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,5 g.L<sup>-1</sup>). Dans le but d'identifier le ou les composant(s) du TSB responsable(s) de cette amélioration, la réaction a été testée en présence de chaque composé individuellement avec les enzymes EF0404 et EF1181. Une augmentation de la vitesse de réaction a été observée uniquement en présence de peptone (Figure 55B).

#### III.4.5.2. La glutamine.

Les peptones sont des composés complexes issus de digestion enzymatique ou chimique de protéines d'origine animale ou végétale. Il est donc difficile d'identifier le ou les composé(s) précis impliqué(s) dans l'amélioration de l'activité nitroréductase. Les peptones contiennent des acides aminés sous forme d'acides aminés seuls, de dipeptides, de tripeptides, etc. Différents dipeptides (Phe-Phe, Ala-Ala, Gly-gly, Glu-Glu) ou tripeptides (Leu-Gly-Gly, Pro-Gly-Gly) ont été testés pour étudier leur influence sur l'activité nitroréductase de toutes les enzymes purifiées au cours de l'étude. Le but étant d'identifier un ou des composé(s) permettant d'améliorer la vitesse de réaction de réduction du substrat « nitro » 7NCCA par toutes les enzymes purifiées au cours de l'étude, les deux enzymes EF0404 et EF0655 ont été prises comme modèle pour tester ces peptides. Aucune amélioration de la vitesse de réaction n'a pu être mise en évidence avec les peptides testés individuellement ou en association les uns avec les autres (Tableau 31). Au contraire, la réaction était plus lente en présence de ces peptides par rapport au tampon phosphate seul. Le dipeptide Phe-Phe semble même avoir un effet inhibiteur sur la réaction puisqu'aucune augmentation de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du substrat 7NCCA réduit n'a pu être observée en 20h d'incubation (Tableau 31). Les acides aminés L-glutamine (Gln) et L-cystéine (Cys) ont été testés sur l'activité nitroréductase de NfsB. Comme précédemment, le choix de l'enzyme n'avait pas d'importance étant donné le but d'identifier un ou des composé(s) permettant d'améliorer la vitesse de réaction de réduction du substrat « nitro » 7NCCA par toutes les enzymes purifiées lors de l'étude. Le choix des acides aminés s'est fait en fonction des acides aminés disponibles au laboratoire. La cystéine est l'un des acides aminés les plus réducteurs parmi les 22 acides aminés connus. Cependant,



**Figure 56 : Effet de la cystéine (L-Cys) et de la glutamine (Gln) sur la réduction du 7NCCA par la forme apoenzyme de NfsB.**  
 100 µL de milieu réactionnel contient 0,5 mM de NADH, 5 µM FMN, 1 µg d'enzyme NfsB et 100 µM de 7NCCA dans 50 mM de solution d'acides aminés à pH 7). Les contrôles sans enzyme sont représentés par un trait plein et les résultats avec enzyme par des pointillés. Les peptones de soja (PS) et de caséine (PC) ont été laissés comme témoins internes. La réduction du substrat est suivie par lecture de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm

les résultats montrent un effet inhibiteur de cet acide aminé sur la réduction du substrat 7NCCA (Figure 56). Par contre, une amélioration de l'activité nitroréductase a été mise en évidence avec l'acide aminé L-glutamine (Gln) avec l'enzyme NfsB (Figure 56). La glutamine a été testée avec les autres enzymes pures et il s'est avéré qu'elle avait le même effet activateur sur l'activité nitroréductase de toutes les enzymes testées (Annexe page 349).

#### III.4.6. Conclusion sur les activités nitroréductases

Grâce aux données génétiques obtenues à partir des génomes séquencés d'*E. coli* et d'*E. faecalis*, nous avons montré que toutes les protéines identifiées comme azo- ou nitroréductases potentielles présentent une activité biochimique de nitroréduction. Toutes les protéines testées ont une activité nitroréductase plus ou moins dépendante de la flavine comme l'ont montré les résultats de l'enzyme NfsA purifiée en conditions dénaturantes qui est capable de réduire le substrat « nitro » 7NCCA sans apport extérieur de flavine malgré la perte de près de 90% de la flavine dans l'échantillon par rapport à l'enzyme purifiée en conditions natives. La dépendance au cofacteur NAD(P)H est plus variée.

La réaction de réduction du substrat 7NCCA par les enzymes étudiées est particulièrement longue par rapport à la réaction de réduction du MR. L'ajout de glutamine dans le milieu réactionnel permet d'accélérer cette réaction de réduction du 7NCCA.

**A**

Espèces	Enzymes	Réduction 7NCCA	FMN- dépendance	NADH- dépendance	NADPH dépendance
<i>E. coli</i>	AzoR	x	x	+	++
	NfsA	x	?	+	++
	NfsB	x	x	++	++
<i>E. faecalis</i>	AzoA	x	x	+	++
	EF0404	x	x	+	++
	EF0648	x	x	++	++
	EF0655	x	x	++	++
	EF1181	x	x	-	++

**B**

Espèces	Enzymes	Réduction MR	FMN- dépendance	NADH- dépendance	NADPH dépendance
<i>E. coli</i>	AzoR	x	?	++	+
	NfsA	-	NA	NA	NA
	NfsB	-	NA	NA	NA
<i>E. faecalis</i>	AzoA	x	x	++	+
	EF0404	x	x	++	+
	EF0648	-	NA	NA	NA
	EF0655	-	NA	NA	NA
	EF1181	-	NA	NA	NA

Tableau 32: Synthèse des caractéristiques biochimiques déterminées qualitativement des enzymes purifiées au cours de l'étude.

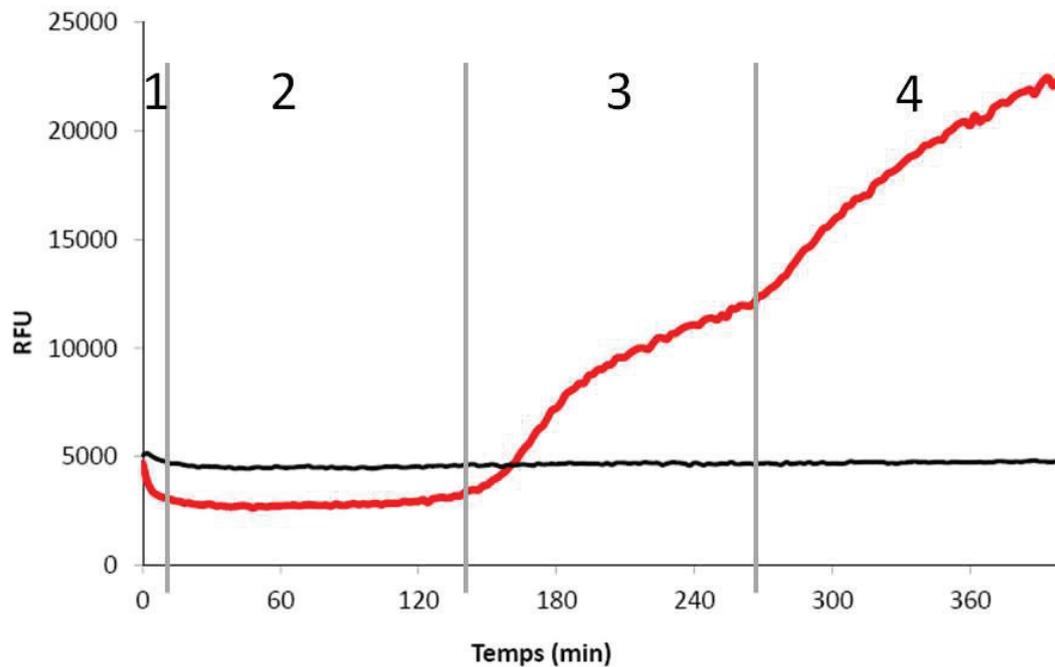
A) Activité nitroréductase sur le substrat « nitro » 7NCCA. B) Activité azoréductase sur le substrat « azo » Methyl Red (MR). L'enzyme capable de réduire le substrat est notée d'une croix (x). Dans le cas d'absence de réduction du substrat par l'enzyme, le signe (-) est indiqué et de ce fait les dépendance en cofacteur ne sont Non Applicable (NA). L'enzyme dont l'activité réductase en question est dépendante de FMN est également notée d'une croix (x). Dans le cas où la dépendance à la flavine n'a pas été montrée, l'enzyme est notée (?). L'utilisation des cofacteurs NADH et NADPH est hiérarchisée en fonction de la préférence d'un cofacteur (++) par rapport à un autre (+). Dans le cas où l'enzyme n'est pas capable d'utiliser un cofacteur comme donneur d'électron pour réduire le substrat le signe (-) est utilisé. Les enzymes ayant les même profil vis-à-vis de leur préférence en cofacteurs NAD(P)H sont regroupés sous la même couleur.

### III.5. Conclusion de la caractérisation qualitative

Suite à ces études de caractérisation enzymatique de chaque protéine incluse dans l'étude, les conclusions sont les suivantes :

- ✓ Toutes les protéines testées ont une activité nitroréductase (Tableau 32A).
- ✓ Parmi les enzymes étudiées, les 3 enzymes AzoA, AzoR et EF0404 ont également une activité azoréductase (Tableau 32B).
- ✓ Les enzymes AzoA et EF0404 sont dépendantes de FMN pour leur activité enzymatique azoréductase (Tableau 32B).
- ✓ Les enzymes AzoR, NfsB, AzoA, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181 sont strictement dépendantes de FMN pour leur activité enzymatique nitroréductase (Tableau 32A).
- ✓ La dépendance à la flavine de AzoR pour son activité azoréductase et de NfsA pour son activité nitroréductase reste à confirmer car les résultats obtenus ne permettent pas de tirer des conclusions (Tableau 32).
- ✓ La dépendance aux cofacteurs NAD(P)H est plus variée. Globalement, les azoréductases ont une préférence pour le cofacteur NADH. Concernant leur activité nitroréductase les enzymes AzoR, NfsB, EF0648, EF0655 peuvent utiliser indifféremment les cofacteurs NADH et NADPH. Les enzymes NfsA, AzoA et EF0404 semblent avoir une préférence pour le cofacteur NADPH, mais sont néanmoins capables d'utiliser le cofacteur NADH comme donneur d'électron. Seule l'enzyme EF1181 est strictement dépendante du cofacteur NADPH car aucune activité n'a pu être détectée avec le cofacteur NADH (Tableau 32).
- ✓ L'activité nitroréductase des enzymes testées peut être accrue par ajout de facteurs peptidiques tel que la peptone ou l'acide aminé glutamine.

Toute cette étude a permis de caractériser de manière qualitative les activités azoréductases et nitroréductases des enzymes purifiées. Toutefois, les notions de préférence vis-à-vis des cofacteurs restent à démontrer quantitativement en déterminant les constantes enzymatiques de chaque enzyme pour chaque substrat et cofacteur.



**Figure 57 : Les différentes phases de réduction de 7NCCA par EF0404.**

Ces phases ont été déterminée sur la courbe avec NADH 0,5 mM de la Figure 55. La phase 1 indique une rapide diminution de fluorescence au début de la réaction. La phase 2 indique la phase d'absence de variation de fluorescence. Les phases 3 et 4 indiquent les 2 phases successives d'augmentation de fluorescence.

## IV. Etude de la réaction de réduction du 7NCCA

### IV.1. La réduction de 7NCCA se déroule en 4 étapes

Les tests de réduction du 7NCCA par les enzymes pures, NfsA (cf. Figure 48A), EF1181 (cf. Figure 49B) ou encore EF0404 (cf. Figure 53) ont montré des courbes atypiques pour une activité enzymatique avec des enzymes pures. Cette allure de courbe a été rencontrée aussi bien avec le cofacteur NADH qu'avec le cofacteur NADPH. Quatre phases ont pu être distinguées : une première phase rapide de diminution de fluorescence suivie d'une phase de latence sans variation de fluorescence, puis 2 phases successives d'augmentation de fluorescence (Figure 57).

#### IV.1.1. La reproduction de la courbe

Au cours des expériences, des difficultés pour reproduire ce type de courbe ont été rencontrées. A la place d'observer les phases 3 et 4, une seule phase était observée. Ces essais se déroulaient avec un nouveau lot d'enzyme EF0404 fraîchement purifiée en conditions natives. Malgré des essais en diminuant la quantité d'enzyme pure dans le milieu réactionnel ou en faisant varier la quantité de cofacteur NAD(P)H, il n'a pas été possible d'obtenir la même allure de courbe. De ce fait, il a été conclu que ce type de courbe ne pouvait s'observer qu'avec des enzymes dont la purification effectuée en conditions natives datait de plusieurs semaines. Cette allure de courbe n'a jamais été reproduite avec les enzymes purifiées en conditions dénaturantes. C'est pourquoi les courbes présentées précédemment ne montrent pas toutes ce type de réaction, car elles ont été obtenues soit avec des protéines fraîchement purifiées en conditions natives, soit avec des enzymes purifiées en conditions dénaturantes.

### IV.2. Recherche des intermédiaires par UPLC

La réduction d'un composé « nitro » passe par différents états intermédiaires incluant la formation des composés nitroso et hydroxylamino (21). La première hypothèse pouvant expliquer ces différentes phases est la formation de ces différents intermédiaires en associant à la phase 2 l'apparition d'un premier intermédiaire non fluorescent puis en associant à la phase 3 un deuxième intermédiaire qui est fluorescent. Enfin la dernière phase pourrait être associée à l'apparition du produit final également fluorescent. Pour cela, une étude UPLC sur des échantillons prélevés à différents temps d'incubation a été entreprise.

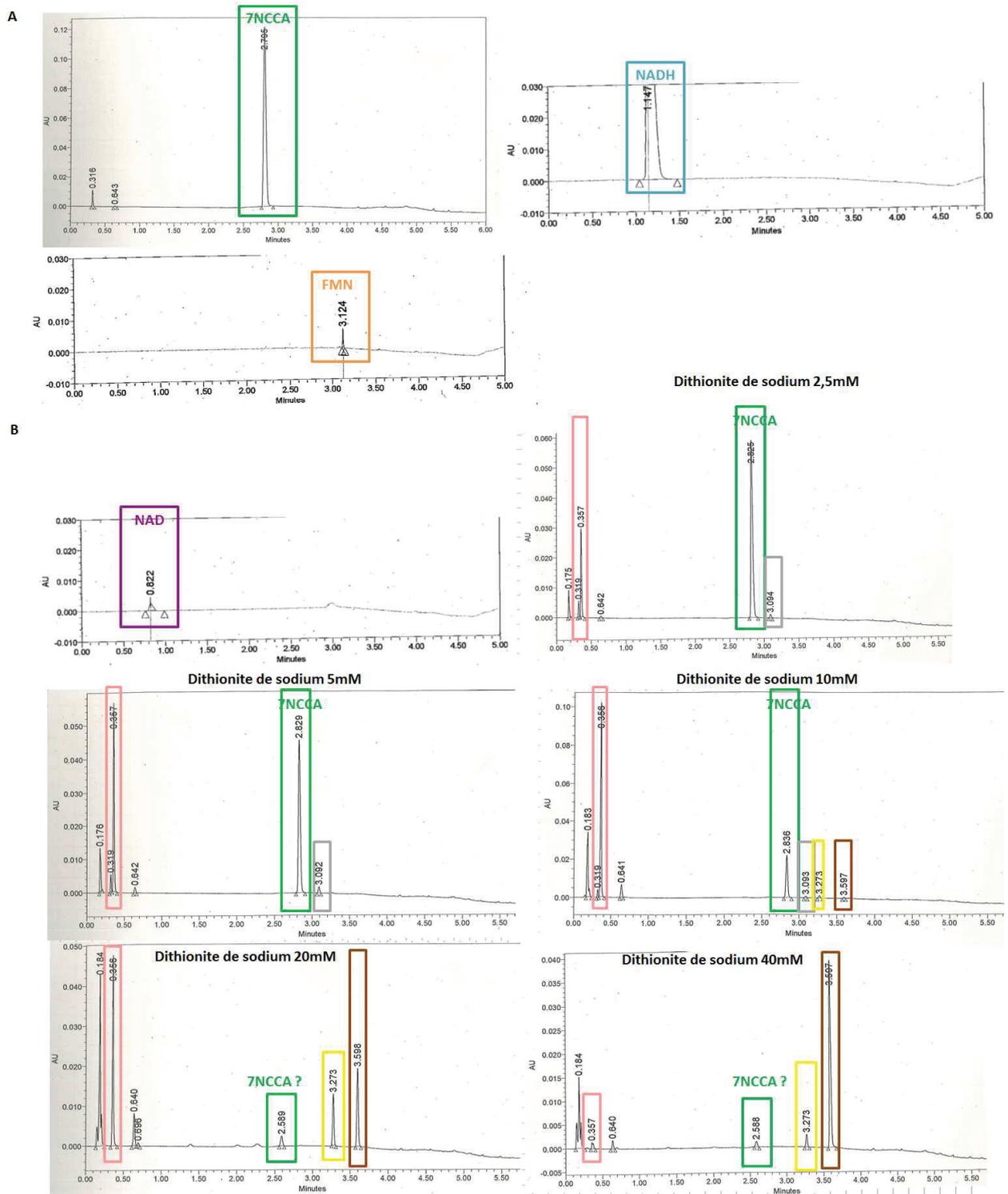


Figure 58 : Spectres UPLC des composés présents dans le milieu réactionnel de départ (A) et final (B).

Le 7NCCA oxydé (100  $\mu$ M) est représenté en vert à 2,79 min, le NADH(0,5 mM) en bleu à 1,14 min, FMN (5  $\mu$ M) en orange à 3.12min, le NAD en violet à 0,82 min. Différents produits de réduction du 7NCCA sont observés et représentés comme suivant : en rose à 0,35 min, en gris à 3,094 min, en jaune à 3,27 min et en marron à 3,59 min.

## IV.2.1. Analyse UPLC des composés connus constituant le milieu réactionnel de départ et final

### IV.2.1.1. Milieu réactionnel de départ

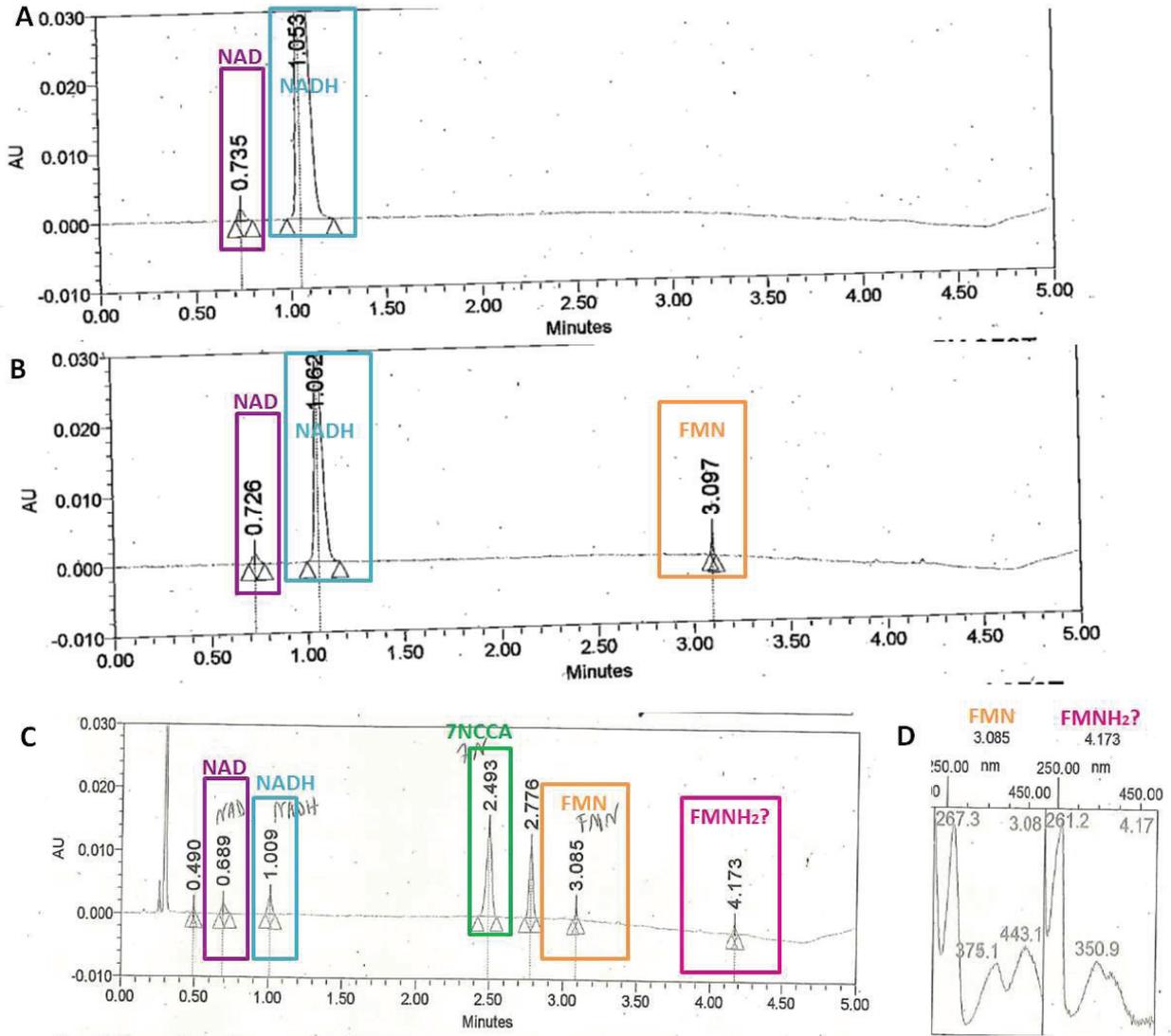
Le milieu réactionnel de départ contient du NADH (0,5 mM), de la FMN (5  $\mu$ M) et du 7NCCA (100  $\mu$ M) dans du tampon phosphate de sodium. Chacun de ces composés a donc été analysé sur une colonne UPLC afin de pouvoir identifier par la suite ces composés dans les analyses du milieu réactionnel complexe. La détection des différents composés s'est faite par absorbance à 339 nm. La détection n'a pas pu se faire par fluorescence car la chaîne UPLC utilisée n'était pas équipée pour détecter de la fluorescence. D'après les résultats obtenus, le pic de rétention du NADH se trouve à 1,14 minutes, le pic de rétention du FMN se trouve à 3,12 minutes et le pic de rétention du substrat 7NCCA se trouve à 2,79 minutes (Figure 58A).

### IV.2.1.2. Milieu réactionnel final attendu

D'un point de vue théorique, le milieu réactionnel en fin de réaction doit contenir du NAD, FMN et du 7NCCA réduit dans du tampon phosphate de sodium. Selon les données précédentes obtenues lors de l'étude du milieu réactionnel de départ (point IV.2.1.1), le FMN, le seul composé en commun entre le milieu réactionnel de départ et le milieu réactionnel final attendu, a un pic de rétention à 3,12 minutes (Figure 58A). Les autres composants du milieu réactionnel final ont donc également été analysés sur la colonne UPLC. La réduction enzymatique du 7NCCA (100  $\mu$ M) a été mimée par réduction chimique à l'aide de différentes concentrations de dithionite de sodium afin d'obtenir le composé 7NCCA sous ses formes partiellement réduites et totalement réduites. Selon la méthode de chromatographie utilisée, qui est la même que celle utilisée pour l'analyse du milieu réactionnel de départ en IV.2.1.1, le pic de rétention du NAD se trouve à 0,82 minutes (Figure 58B).

En présence de 2,5 mM de dithionite de sodium, un pic majeur demeure à 2,82 minutes, dont le spectre UV correspond à celui du substrat 7NCCA, alors qu'un autre pic est apparu à 3,094 minutes ainsi qu'un pic à 0,357 minutes (Figure 58B).

En présence de 5 mM de dithionite de sodium, le pic du substrat 7NCCA à 2,82 minutes diminue en intensité et ceux des produits à 3,092 et 0,357 minutes ont augmenté (Figure 58B).



**Figure 59 : Spectres UPLC de différents milieux réactionnels.**

A) NADH (0,25 mM) + NAD (0,25 mM). B) NADH (0,5 mM) + FMN (5 µM). C) 7NCCA (100 µM) + NADH (0,5 mM) + FMN (5 µM). D) Spectres d'absorbance des composés ayant les temps de rétention de 3,085 min et 4,173 min du milieu réactionnel C).

En présence de 10 mM de dithionite de sodium, le pic du substrat 7NCCA à 2,83 minutes a encore diminué en intensité. Cependant, le pic à 3,093 minutes (correspondant au même produit que celui ayant un pic à 3,092 précédemment aux vues du spectre UV) a diminué aussi en intensité alors que celui à 0,356 minute (correspondant au même produit que le pic à 0,357 vu précédemment) a encore augmenté en intensité. De plus, deux autres pics sont apparus, les pics de rétention à 3,273 et 3,597 minutes (Figure 58B).

En augmentant la quantité de dithionite de sodium à 20 mM, le pic du substrat 7NCCA à 2,82 minutes n'est plus visible mais il se peut qu'il se soit décalé à 2,58 minutes au vu du spectre UV. Dans ce cas, le substrat 7NCCA n'a pas complètement disparu, mais l'intensité du pic de rétention, qui a encore diminué par rapport à l'essai avec 10 mM de dithionite de sodium, indique que la quantité de substrat 7NCCA a encore diminué. De même, le pic à 3,093 minutes a disparu. L'intensité du pic à 0,356 minutes a diminué indiquant que ce produit a commencé à disparaître. Par contre, les intensités des pics de rétention à 3,273 et 3,598 minutes ont augmenté indiquant que la quantité de ces produits a augmenté (Figure 58B).

L'augmentation de la concentration en dithionite de sodium à 40 mM a permis d'observer à nouveau une diminution du pic de rétention à 0,357 minutes ainsi qu'une diminution du pic de rétention à 3,273 minutes tandis que l'intensité du pic à 3,597 minutes a augmenté indiquant une augmentation de la quantité de ce produit dans le milieu (Figure 58B).

Des mélanges ont également été testés pour vérifier la séparation de chaque composé les uns par rapport aux autres. Les différents composés du milieu réactionnel sont facilement séparés du fait de leur temps de rétention différents. Cependant, ces analyses nous ont permis de mettre en évidence l'apparition de NAD dans une solution ne contenant au départ que du NADH et du FMN (Figure 59, A et B). Ainsi, il y a oxydation du NADH en NAD en présence de FMN. Théoriquement, il devrait y avoir un pic correspondant au FMNH<sub>2</sub>. Un pic a parfois été observé au temps de rétention de 4,17 minutes dans des milieux réactionnels contenant du NADH et du FMN (Figure 59C). La molécule correspondant à ce pic de rétention avait un spectre d'absorbance pouvant correspondre au FMNH<sub>2</sub> (Figure 59D et annexe page 343). Ce pic est certainement difficile à observer du fait de la faible concentration en FMN/FMNH<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel.

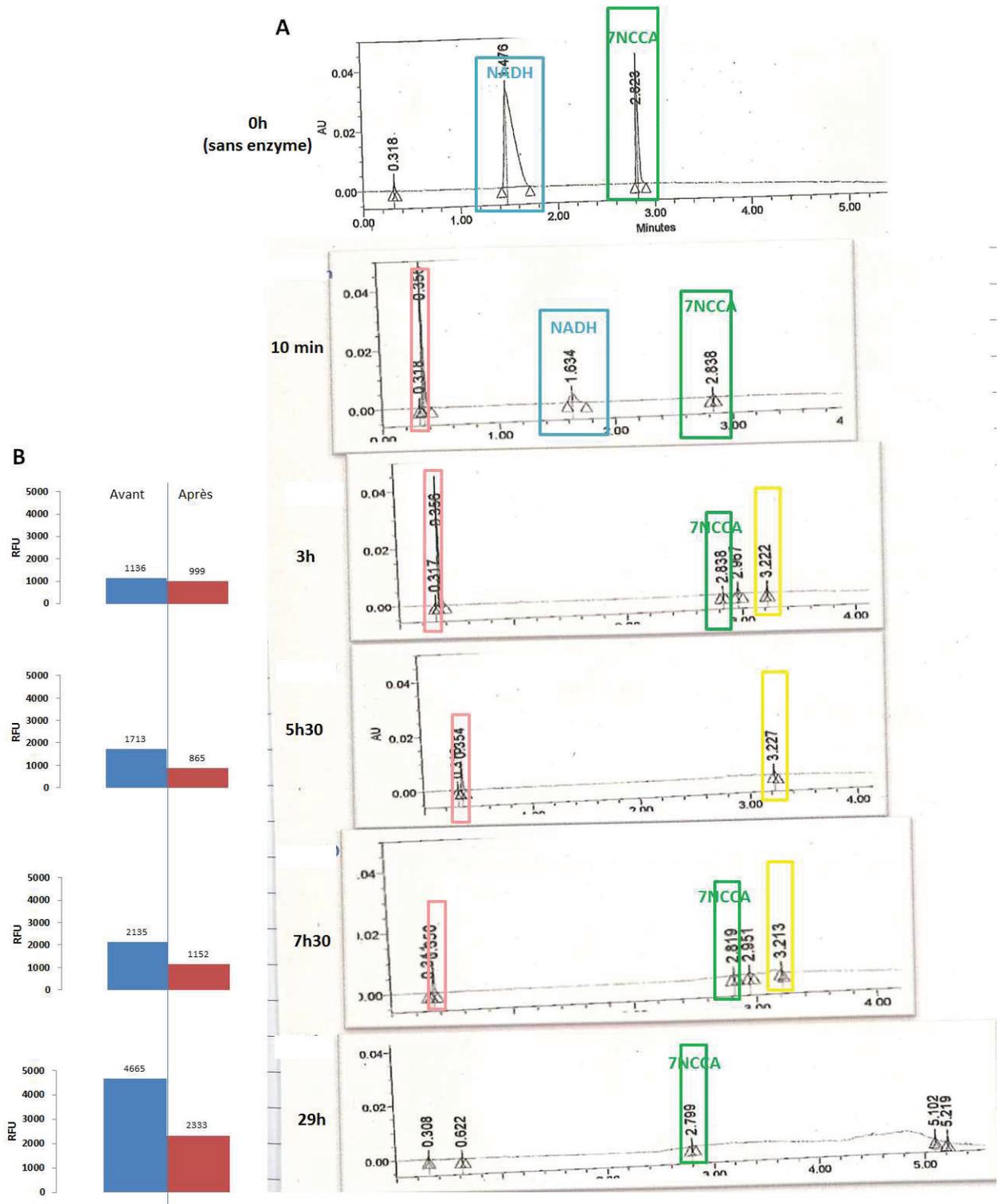


Figure 60 : Analyse par UPLC de la réduction enzymatique du substrat 7NCCA par l'enzyme EF0404 purifiée en conditions natives.

A) Spectres UPLC du mélange réactionnel au cours de la réaction enzymatique. Les temps d'incubation des échantillons analysés sont précisés à gauche des spectres. B) Mesure de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit (365 nm/440 nm) avant et après passage sur la résine Ni-NTA utilisée pour enlever l'enzyme de l'échantillon avant d'analyser l'échantillon par UPLC. Les valeurs brutes d'intensité de fluorescence sont indiquées sur les bâtons de l'histogramme.

#### IV.2.2. Milieu réactionnel en cours de réaction

La réaction enzymatique a été initiée par l'ajout de NADH 0,5 mM dans le milieu réactionnel de départ composé de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7, de substrat 7NCCA 100  $\mu$ M, de FMN 5  $\mu$ M et de 0,01  $\mu$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup> d'enzyme EF0404 purifiée en conditions natives. Des prélèvements ont été effectués à différents temps. La réaction enzymatique dans les prélèvements a été stoppée par passage de l'échantillon sur de la résine Ni-NTA qui peut retenir l'enzyme qui possède toujours son étiquette 6-Histidines lui permettant de se fixer aux ions Nickel de la résine.

Au cours de la réaction enzymatique, la disparition du cofacteur NADH et du substrat 7NCCA a été observée (Figure 60A).

Un composé avec un temps de rétention de 0,356 minute est apparu dès 10 minutes d'incubation (Figure 60A). Un deuxième composé avec un temps de rétention de 3,222 minutes est apparu dès 3h d'incubation (Figure 60A). Ces 2 composés avaient environ les mêmes temps de rétention que des composés apparus lors de la réduction chimique aux temps de rétention 3,273 minutes et 0,356 minute (Figure 58B). Il semblerait que le produit à 0,356 minute ait commencé à apparaître rapidement puis ait disparu au profit d'un autre produit (celui à 3.2 minutes ou un autre non visible par cette méthode ?). Par contre, les autres produits observés en réduction chimique à 3,094 minutes et 3,597 minutes n'ont pas été observés lors de la réduction enzymatique (Figure 58B et Figure 60A).

A l'issue de 29h d'incubation, selon les données obtenues en UPLC, il ne restait que des traces du substrat 7NCCA (Figure 60A). Il n'y avait aucune trace d'un autre produit alors que les mesures en fluorescence indiquaient la présence d'un produit fluorescent. L'hypothèse d'une perte de produit fluorescent final due au passage de l'échantillon sur la résine Ni-NTA pour enlever l'enzyme de l'échantillon s'est posée. L'intensité de fluorescence des produits obtenus en réduction chimique et enzymatique a été mesurée avant et après passage sur la résine Ni-NTA. L'intensité de fluorescence des produits obtenus par réduction chimique n'a pas été perturbée par la résine. Par contre, l'intensité de fluorescence des échantillons prélevés après 3h d'incubation a diminué après passage sur la résine Ni-NTA (Figure 60B). A l'issue de 29h d'incubation, l'échantillon passé sur la résine Ni-NTA avait perdu 50% de son intensité de fluorescence. Il est possible qu'une partie du (des) produit(s) fluorescent(s) reste lié à l'enzyme et donc reste sur la colonne une fois l'enzyme fixée sur la



résine.

### IV.3. Conclusion de l'étude de la réaction de réduction du 7NCCA

Ces études préliminaires de la réaction de réduction du 7NCCA ont permis de mettre en évidence un possible premier produit de réduction qui apparaîtrait, puis disparaîtrait au cours de la réaction en laissant la place à un ou deux autres produits de réduction ou deux. Cependant, la méthode nécessite d'être optimisée pour permettre une meilleure reproductibilité et une meilleure détection du produit final. De plus, d'autres approches telles que la spectrométrie de masse ou la RMN sont à envisager pour l'identification de ces produits de réduction. Il faut noter qu'à ce jour, la structure précise des intermédiaires de réaction pendant la réduction du substrat 7NCCA n'a jamais été caractérisée.

## V. Détermination des constantes enzymatiques de chaque enzyme

La détermination des constantes enzymatiques a fait l'objet d'un stage de fin d'étude d'une étudiante de l'INSA (Institut National des Sciences Appliquées) de Lyon que j'ai encadré. Cette étude a nécessité une mise au point pour chaque activité enzymatique (azoréductase et nitroréductase). Pour chaque substrat, la réduction a été suivie par mesure de la fluorescence et de l'absorbance. Les constantes enzymatiques ont été déterminées par la méthode de Lineweaver et Burke et la représentation en double inverse de la vitesse initiale en fonction de la concentration.

Le substrat principal des enzymes est le Methyl Red (MR) pour l'activité azoréductase ou le 7NCCA pour l'activité nitroréductase. Cependant, les cofacteurs NADH et NADPH peuvent être également considéré comme des substrats de l'enzyme. Il est donc théoriquement possible de déterminer des constantes enzymatiques par rapport au MR ou 7NCCA mais aussi par rapport au NAD(P)H. Par contre, déterminer les constantes enzymatiques par rapport au FMN n'est pas possible car ce coenzyme est sans cesse régénéré au cours de la réaction (Cf. Figure 8).

Pour déterminer ces valeurs, une gamme de concentrations en substrat a été mise au point pour pallier aux problèmes de « quenching » qui peuvent être observés dans le cas de concentration en MR, 7NCCA ou NAD(P)H trop élevées. Le « quenching » est un phénomène observé lorsque l'émission d'une molécule est masquée par d'autres molécules absorbant aux mêmes longueurs d'ondes. Les gammes de concentrations ont été testées en triplicats.



Une moyenne des triplicats a été faite et représentée graphiquement pour déterminer la vitesse initiale de la réaction pour chaque concentration. Les constantes n'ont pu être déterminées que pour quelques enzymes : AzoR, EF0404, EF1181 et NfsA.

## V.1. Azoréductases

Afin de comparer différentes méthodes de détermination des constantes enzymatiques, les constantes enzymatiques ont été déterminées en suivant la décoloration du substrat MR par absorbance à 435 nm, en suivant l'oxydation du NADH ou du NADPH par absorbance à 340 nm et en suivant l'apparition du produit de réduction du MR en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm. La gamme de concentration de MR utilisée se situe entre 5 et 30  $\mu\text{M}$  avec 25  $\mu\text{M}$  de NAD(P)H et 5  $\mu\text{M}$  de FMN en présence de 20 ng de protéine AzoR ou de 300 ng de protéine EF0404.

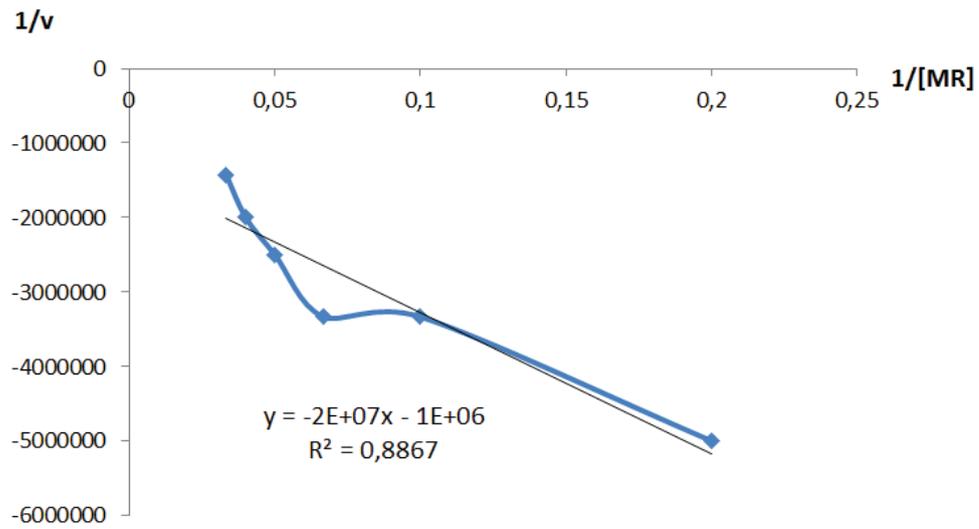
### V.1.1. $K_m$ et $V_{max}$ vis-à-vis du substrat MR par absorbance à 435 nm et à 340 nm

La détermination des constantes enzymatiques s'est faite en suivant la décoloration du MR par absorbance à 435 nm. Le coefficient d'extinction molaire connu pour le MR a été défini pour des mesures d'absorbance à 430 nm (132). Nos mesures d'absorbance ont été effectuées à 435 nm, cette longueur d'onde étant la longueur d'onde maximale d'absorption du MR déterminée sur le spectre d'absorbance obtenu lors de nos études (annexe page 308). Les constantes enzymatiques ont également été déterminées à partir des données obtenues en mesurant l'absorbance à 340 nm.

Le coefficient d'extinction molaire du MR à 430 nm ( $\epsilon_{430 \text{ nm}}$ ) connu dans la littérature est de  $23360 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (132). A l'aide du spectre d'absorbance du MR obtenu lors de nos études, il est possible de déterminer expérimentalement ce coefficient d'extinction molaire en suivant la loi de Beer Lambert :

$$A_{xxx \text{ nm}} = \epsilon_{xxx \text{ nm}} \cdot l \cdot C$$

Où  $A_{xxx \text{ nm}}$  désignent les valeurs d'absorbance sans unité mesurées aux longueurs d'ondes xxx nm,  $l$  désigne en centimètre (cm) la longueur du trajet optique parcouru par le faisceau lumineux dans la solution absorbante (0,5 cm) et  $C$  désigne la concentration en molaire (M) en produit absorbant à xxx nm. Le trajet optique correspond à la hauteur de liquide dans un puits de plaque 96 demi-puits. Cette hauteur de liquide correspond à la hauteur  $h$  du cylindre formé par un volume  $V = 0,1 \text{ cm}^3$  (100  $\mu\text{L}$ ) de liquide dans un puits de plaque 96 demi-puits, sachant que le diamètre  $d$  d'un puits vaut 0,5 cm soit :



**Figure 61: Exemple de représentation en double inverse des vitesses initiales en fonction de la concentration en MR ([MR]) pour l'enzyme AzoR en présence du cofacteur NADH.**

$R^2$  correspond au coefficient de corrélation de la régression linéaire. Ce coefficient détermine à quel point l'équation de régression est adaptée pour décrire la distribution des points. Quand les points sont parfaitement alignés,  $R^2=1$ .

$$h = (4V/\pi d^2) = (4 \times 0,1 / \pi \times 0,5^2) = 0,5 \text{ cm}$$

Selon nos données, les coefficients d'extinction molaire correspondent donc à:

$$\epsilon_{430 \text{ nm}} = 1,3977 / (0,5 \times 100 \cdot 10^{-6})$$

$$\epsilon_{430 \text{ nm}} = 27954 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

et

$$\epsilon_{435 \text{ nm}} = 1,3989 / (0,5 \times 100 \cdot 10^{-6})$$

$$\epsilon_{435 \text{ nm}} = 27978 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

La différence entre les 2 coefficients d'extinction molaire obtenus à 430 nm et 435 nm n'est pas significative, il est donc possible d'assimiler le coefficient d'extinction molaire du MR à  $\epsilon_{430 \text{ nm}}$  à celui de  $\epsilon_{435 \text{ nm}}$ . Afin de pouvoir comparer, si possible, les valeurs de constantes enzymatiques obtenus lors de nos études avec les constantes enzymatiques disponibles dans la littérature, le coefficient d'extinction molaire  $23360 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  est utilisé dans les calculs.

Le coefficient d'extinction molaire du NAD(P)H à 340 nm est également connu ( $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (132) il est donc également possible de convertir les données d'absorbance en  $\mu\text{M}$  par la loi de Beer Lambert

$$A_{340 \text{ nm}} = \epsilon_{340 \text{ nm}} \times l \times [\text{NADH}]$$

Où [NADH] désigne la concentration en molaire (M) en NADH.

Les vitesses initiales sont calculées sur l'intervalle de temps 0-2 minutes. Les vitesses initiales correspondent au coefficient directeur de la droite de régression linéaire de la courbe d'absorbance sur cet intervalle de temps. La représentation en inverse de de Lineweaver et Burk consiste à représenter l'inverse des vitesses initiales ( $1/v$ ) en fonction de l'inverse de la concentration en substrat initiale ( $1/[S]$ ) (Figure 61). Une droite d'équation  $y = ax+b$  représentée est alors obtenue. Pour notre étude, on considère que l'alignement des points est correct jusqu'à  $R^2 = 0,9$ . En dessous de 0,9, on considère qu'il est difficile d'interpréter correctement les données.

Une fois que la représentation en inverse a été obtenue, les constantes enzymatiques  $K_m$  et  $V_{\max}$  ont pu être calculées après avoir déterminé l'équation de la droite de régression linéaire de la courbe obtenue ( $K_m = a/b$  et  $v_{\max} = 1/b$ ) (cf. VIII.1 du Matériels et Méthodes).

Selon cette méthode, l'enzyme AzoR d'*E. coli* a une affinité plus grande pour le MR que l'enzyme EF0404 d'*E. faecalis* que ce soit avec le cofacteur NADH qu'avec le cofacteur

Espèce	Enzymes	Constantes	Absorbance à 435 nm	Absorbance à 340 nm
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	8,9 $\mu\text{M}^*$	92,6 $\mu\text{M}$
		$v_{\text{max}}$	$15.10^4 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1*}$	$24.10^5 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	20 $\mu\text{M}^*$	ND
		$v_{\text{max}}$	$3.10^3 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1*}$	ND

**Tableau 33 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données d'absorbance mesurée à 435 nm et 340 nm. Lorsque le coefficient de corrélation  $R^2$  est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

Espèce	Enzymes	Constantes	Absorbance à 435 nm	Absorbance à 340 nm
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	1 $\mu\text{M}^*$	ND
		$v_{\text{max}}$	$0,03 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1*}$	ND
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	350 $\mu\text{M}^*$	ND
		$v_{\text{max}}$	$0,02 \mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1*}$	ND

**Tableau 34 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADPH.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données d'absorbance mesurée à 435 nm et 340 nm. Lorsque le coefficient de corrélation  $R^2$  est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

NADPH (Tableau 33 et Tableau 34). De plus, la valeur de la vitesse maximale (vitesse maximale que peut atteindre la réaction lorsque l'enzyme est saturée de substrat) est plus importante pour l'enzyme AzoR que pour l'enzyme EF0404 en présence du cofacteur NADH (Tableau 33). Les données obtenues avec le cofacteur NADPH ne sont pas significativement représentatives de l'affinité et de la  $v_{\max}$  des enzymes vis-à-vis du substrat MR, car les droites de régressions linéaires obtenues à partir des courbes de représentation en inverse ont un coefficient de corrélation trop faible ( $< 0,8$ ).

Les valeurs obtenues à partir des données d'absorbance mesurées à 340 nm sont très différentes de celles obtenues à partir des données d'absorbance mesurées à 435 nm (Tableau 33). Pour l'enzyme AzoR en présence du cofacteur NADH, il y a plus d'un facteur 10 entre le  $K_m$  obtenu à partir des données d'absorbance mesurées à 340 nm et celui obtenu à partir des données d'absorbance mesurées à 435 nm. De même, entre les valeurs de  $v_{\max}$  obtenue pour cette enzyme avec le cofacteur NADH il y a un facteur 16 de différence. Le coefficient de corrélation de ces représentations est compris entre 0,8 et 0,9. Il est donc délicat de comparer les données obtenues avec les 2 méthodes.

### **V.1.2. $K_m$ et $V_{\max}$ vis-à-vis du substrat MR par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm**

Le paramètre  $v_{\max}$  s'exprime généralement en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  d'enzyme. Les valeurs de fluorescence sont des valeurs relatives au gain et à l'appareil utilisé. Il n'existe pas de relation mathématique entre les valeurs de fluorescence et la concentration en produit comme la relation mathématique de Beer Lambert reliant des valeurs d'absorbance à la concentration de substrat. Il a donc été nécessaire de réaliser des gammes étalons pour déterminer l'existence d'une relation entre les valeurs de fluorescence et la concentration en acide anthranilique qui est le produit fluorescent connu de la réduction du MR (31). Pour cela, il a fallu également prendre en compte l'effet de « quenching » du MR encore présent dans le milieu réactionnel sur l'acide anthranilique libérée après réduction du MR. La variation du « quenching » en fonction de la concentration d'acide anthranilique produit par réduction du MR a été mimée en diminuant progressivement la quantité de MR remplacée par de l'acide anthranilique en considérant l'hypothèse que la production d'une mole d'acide anthranilique est équivalent à la réduction totale d'une mole de MR ( Figure 62). A partir des équations exprimant la relation linéaire entre les valeurs de fluorescence et la

A

Evolution de la gamme- Avancement théorique de la réaction							
Quantité de MR dégradé en acide anthranilique	0%	10%	20%	40%	60%	80%	100%
Quantité de MR restant	100%	90%	80%	60%	40%	20%	0%

B

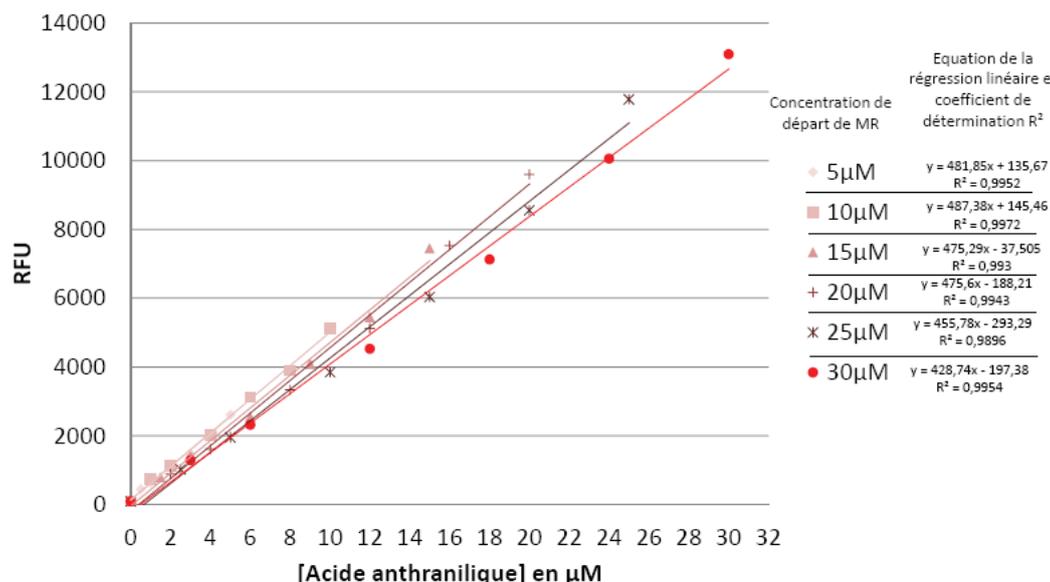


Figure 62 :Fluorescence du milieu réactionnel en fonction de la quantité d'acide anthranilique issue de la réduction du MR en prenant en compte la quantité de MR non dégradé.

A) Le tableau répertorie les pourcentages de MR restant en fonction du pourcentage de MR dégradé.B) Les mesures ont été réalisées aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm gain 70 dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 à 35°C et répétées 36 fois sur le même puits. Les valeurs de fluorescence reportées sur le graphique correspondent à des moyennes faites sur les 36 mesures pour chaque mélange. La concentration de départ de MR correspond à la concentration en MR (non réduit) à T = 0 min dans le milieu réactionnel. L'abscisse du graphique correspond à la concentration de MR réduit et donc à la concentration d'acide anthranilique libérée.

Espèce	Enzymes	Constantes	NADH	NADPH
<i>E. coli</i>	Azor	Km	16,5 µM	ND
		V <sub>max</sub>	16.10 <sup>4</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	ND
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	8,2 µM *	25 µM
		V <sub>max</sub>	922 RFU.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *	17.10 <sup>3</sup> RFU.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>

Tableau 35 : Constantes enzymatiques des enzymes Azor et EF0404 pour leur activité azoréductase vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH ou du cofacteur NADPH.

Ces constantes ont été obtenues à partir des données de fluorescence mesurée au longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm. Lorsque le coefficient de corrélation R<sup>2</sup> est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

quantité d'acide anthranilique libérée après réduction du MR, les valeurs de fluorescence obtenues lors des réactions enzymatiques ont été converties en  $\mu\text{M}$ . Ainsi les constantes  $K_m$  et  $v_{\text{max}}$  ont pu être déterminées toujours pas la méthode de représentation en inverse de Lineweaver et Burke.

Les valeurs obtenues nous ont indiqué que l'enzyme EF0404 était l'enzyme qui avait le  $K_m$  le plus faible (Tableau 35). Cette enzyme EF0404 serait donc plus affine pour le MR avec le cofacteur NADH que l'enzyme AzoR. Ces résultats sont contradictoires par rapports aux données obtenues avec les mesures d'absorbance qui donnait l'enzyme AzoR comme étant plus affine vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH que l'enzyme EF0404 (Tableau 33). Par contre, l'ordre des  $v_{\text{max}}$  est maintenue entre les deux méthodes (absorbance et fluorescence), la valeur de  $v_{\text{max}}$  de l'enzyme AzoR est plus grande que celle de l'enzyme EF0404 (Tableau 35). Toutefois, les données obtenues en fluorescence avec le cofacteur NADPH nous ont indiqué les mêmes conclusions qu'avec les données obtenues en absorbance à 435 nm. L'enzyme AzoR serait plus affine que l'enzyme EF0404 vis-à-vis du MR. Cependant, étant donné le coefficient de corrélation faible pour ces données avec le cofacteur NADPH, il est difficile de tirer des conclusions exactes sur l'affinité des enzymes. De plus, il n'a pas été possible de reproduire ces résultats. En effet, une autre expérience indépendante a donné un  $K_m$  de 75  $\mu\text{M}$  pour l'enzyme AzoR et 105  $\mu\text{M}$  pour l'enzyme EF0404 vis-à-vis du MR en présence du cofacteur NADH, contre respectivement 16,5  $\mu\text{M}$  et 8,2  $\mu\text{M}$  observés initialement (Tableau 35).

### V.1.3. $K_m$ et $V_{\text{max}}$ NAD(P)H par absorbance à 435 nm et à 340 nm

Les  $K_m$  et  $v_{\text{max}}$  des enzymes AzoR et EF0404 vis-à-vis du NAD(P)H ont été déterminés de la même manière que pour le MR avec une gamme de NAD(P)H de 10 à 60  $\mu\text{M}$  avec 25  $\mu\text{M}$  de MR, 5  $\mu\text{M}$  de FMN et 15 ng d'enzyme pour AzoR ou 300 ng d'enzyme pure EF0404. La réaction a été suivie en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm et absorbance aux longueurs d'ondes de 435 nm et 340 nm.

Les données obtenues ont difficilement été exploitables, car reliées à des coefficients de corrélation faibles, que ce soit avec le cofacteur NADH ou le cofacteur NADPH et ceci avec les deux longueurs d'ondes utilisées pour la mesure de l'absorbance (Tableau 36 et Tableau 37). Si l'on s'en tient à ces valeurs, cela signifierait que l'enzyme AzoR serait plus affine pour le cofacteur NADPH que pour le cofacteur NADH alors qu'il semblerait que ça soit l'inverse

Espèce	Enzymes	Constantes	Absorbance à 435 nm	Absorbance à 340 nm
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	73,2 µM*	231,6 µM
		V <sub>max</sub>	0,49 µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *	3,09 µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	87,7 µM	2,2 µM*
		V <sub>max</sub>	0,01 µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	0,01 µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *

**Tableau 36 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur dépendance vis-à-vis du NADPH en présence du MR.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données d'absorbance mesurée à 435 nm et 340 nm. Lorsque le coefficient de corrélation R<sup>2</sup> est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

Espèce	Enzymes	Constantes	Absorbance à 435 nm	Absorbance à 340 nm
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	ND	50 µM*
		V <sub>max</sub>	ND	2.10 <sup>-3</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	ND	43 µM*
		V <sub>max</sub>	ND	5.10 <sup>-4</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *

**Tableau 37 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur dépendance vis-à-vis du NADH en présence du MR.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données d'absorbance mesurées à 435 nm et 340 nm. Lorsque le coefficient de corrélation R<sup>2</sup> est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

Espèce	Enzymes	Constantes	NADH	NADPH
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	73,4µM	636,2 µM
		V <sub>max</sub>	27.10 <sup>4</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>	98.10 <sup>6</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	6,7 µM *	373 µM
		V <sub>max</sub>	1700 µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> *	17.10 <sup>5</sup> µM.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup>

**Tableau 38 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis des cofacteurs NAD(P)H en présence MR.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données de fluorescence mesurées aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm. Lorsque le coefficient de corrélation R<sup>2</sup> est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

pour l'enzyme EF0404 (Tableau 36 et Tableau 37). S'agissant des valeurs de  $v_{\max}$ , globalement, l'enzyme AzoR a des valeurs de  $v_{\max}$  plus élevées que l'enzyme EF0404 (Tableau 36 et Tableau 37).

#### **V.1.4. Km et Vmax vis-à-vis des cofacteurs NADH et NADPH par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm**

Les constantes enzymatiques vis-à-vis des cofacteurs NADH et NADPH lors de la réduction du MR par les enzymes AzoR et EF0404 ont également été calculées à partir des mesures de fluorescence. Les Km obtenus pour les deux enzymes (AzoR et EF0404) sont plus faibles pour le cofacteur NADH que le cofacteur NADPH (Tableau 38). Ceci tend à montrer que ces enzymes auraient plus d'affinité pour le cofacteur NADH que pour le cofacteur NADPH. La préférence pour le cofacteur NADH avait déjà été supposée lors de la caractérisation qualitative de l'activité azoréductase des enzymes AzoR et EF0404.

Dans le cas des deux cofacteurs, l'enzyme EF0404 a un Km plus petit que l'enzyme AzoR. Ceci tend à montrer que l'enzyme EF0404 serait plus affine pour les cofacteurs NADH et NADPH que l'enzyme AzoR. Toutefois, ces données sont à prendre avec précaution, car elles n'ont pas été reproduites. Une expérience indépendante a débouché sur un Km de 105  $\mu\text{M}$  pour l'enzyme EF0404 et un Km de 226  $\mu\text{M}$  pour l'enzyme AzoR à partir des mesures en fluorescence, ce qui tend aussi à montrer une affinité plus élevée de l'enzyme EF0404 par rapport à l'enzyme AzoR pour le cofacteur NADH.

Concernant les valeurs de  $v_{\max}$ , on a retrouvé la même hiérarchie entre les valeurs de l'enzyme AzoR et de l'enzyme EF0404 que les valeurs de  $v_{\max}$  obtenues par les mesures d'absorbance. En effet, globalement, l'enzyme AzoR a des valeurs de  $v_{\max}$  plus élevées que l'enzyme EF0404 (Tableau 38). Toutefois, il existe une différence d'échelle importante entre les valeurs de  $v_{\max}$  obtenues avec les mesures d'absorbance (de l'ordre de  $10^0$  à  $10^{-4}$ ) et les mesures en fluorescence (de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$ ) ce qui ne permet pas de comparer quantitativement les valeurs absolues.

Espèce	Enzymes	Constantes	NADH	NADPH
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	14 $\mu\text{M}$	ND
		$v_{\text{max}}$	$10.10^4 \text{ RFU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	ND
	NfsA	Km	15,9 $\mu\text{M}$	ND
		$v_{\text{max}}$	$15.10^4 \text{ RFU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	ND
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	6 $\mu\text{M}^*$	ND
		$v_{\text{max}}$	$256.10^4 \text{ RFU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1*}$	ND

**Tableau 39 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR , NfsA et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis du 7NCCA en présence des cofacteurs NADH ou NADPH.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données de fluorescence mesurées aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm. Lorsque le coefficient de corrélation  $R^2$  est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

## V.2. Nitroréductases

### V.2.1. Km et Vmax du substrat 7NCCA

La gamme de concentration de 7NCCA utilisée se situe entre 5 et 30  $\mu\text{M}$  avec 200  $\mu\text{M}$  de NAD(P)H, 5  $\mu\text{M}$  de FMN et 1  $\mu\text{g}$  d'enzyme. Le milieu réactionnel contenait 50 mM de glutamine pour limiter la durée de la phase durant laquelle aucune variation de fluorescence n'est observée (phase 2 de la Figure 57). La réduction a été suivie en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm. Les vitesses initiales ont été déterminées entre 60 et 200 minutes, correspondant au début de la première phase d'augmentation de fluorescence (phase 3 de la Figure 57). Les Km suivants ont été déterminés par la méthode de Lineweaver et Burk. Cependant, le même problème d'unité qu'avec le MR a été rencontré pour le paramètre  $v_{\text{max}}$ . Toutefois, à la différence du MR, le produit de réduction 7NCCA n'a pas pu être caractérisé. C'est pourquoi, les valeurs de  $v_{\text{max}}$  obtenues ont été exprimées en  $\text{RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  d'enzyme et ne sont comparables qu'aux valeurs obtenues dans les mêmes conditions.

Dans ces conditions, l'enzyme EF0404 est apparue comme étant l'enzyme ayant la plus grande affinité suivie de l'enzyme AzoR puis de l'enzyme NfsA (Tableau 39). Une expérience indépendante avait conclu sur l'enzyme AzoR comme étant la plus affine car son Km avait été évalué à 7  $\mu\text{M}$  tandis que le Km de l'enzyme EF0404 avait été évalué à 26  $\mu\text{M}$ . Celui de l'enzyme NfsA n'avait pas pu être déterminé. Les différences entre les valeurs brutes sont importantes (un facteur 2 entre les 2 valeurs de Km obtenues pour l'enzyme AzoR et un facteur 4 entre les 2 valeurs de Km obtenues pour l'enzyme EF0404), ce qui montre les difficultés à reproduire ces mesures quantitatives.

L'enzyme ayant le plus grand  $v_{\text{max}}$  semble être l'enzyme EF0404 suivie de l'enzyme AzoR, puis de l'enzyme NfsA (Tableau 39). Lors de l'autre expérience indépendante, le  $v_{\text{max}}$  de l'enzyme AzoR avait été évaluée à  $16\cdot 10^4 \text{ RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  et celui de l'enzyme EF0404 à  $1,7\cdot 10^4 \text{ RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Il existe un facteur 1,6 entre les deux valeurs obtenues pour AzoR, ce qui est faible alors qu'il existe un facteur de 150 entre les deux valeurs de  $v_{\text{max}}$  de l'enzyme EF0404 obtenues pour l'instant.

Une tentative de détermination des constantes enzymatiques a été faite à partir de la première phase de la courbe correspondant à une diminution de fluorescence. Toutefois, aucune valeur n'a pu être mise en évidence, les facteurs de corrélation étaient trop faibles.

Espèce	Enzymes	Constantes	NADH	NADPH
<i>E. coli</i>	AzoR	Km	394,8 $\mu\text{M}$	ND
		$v_{\text{max}}$	$6,6 \cdot 10^3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	ND
	NfsA	Km	524,7 $\mu\text{M}$	ND
		$v_{\text{max}}$	$1,6 \cdot 10^3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	ND
<i>E. faecalis</i>	EF0404	Km	310,9 $\mu\text{M}^*$	ND
		$v_{\text{max}}$	$10,5 \cdot 10^3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1*}$	ND

**Tableau 40 : Constantes enzymatiques des enzymes AzoR , NfsA et EF0404 pour leur affinité vis-à-vis du NADH ou NADPH en présence du substrat 7NCCA.**

Ces constantes ont été obtenues à partir des données d'absorbance à 340 nm. Lorsque le coefficient de corrélation  $R^2$  est compris entre 0,8 à 0,9, le résultat est doté d'une étoile \* signifiant que ces valeurs ne sont pas significativement représentatives de l'affinité ou de la vitesse maximale de réaction entre l'enzyme et le substrat MR. ND signifie non déterminé notamment à cause d'un coefficient de corrélation inférieur à 0,8.

### V.2.2. Km et Vmax NAD(P)H

Les Km et Vmax des enzymes vis-à-vis du NAD(P)H ont été déterminés de la même manière que pour le 7NCCA avec une gamme de NADH de 100  $\mu\text{M}$  à 250  $\mu\text{M}$  avec 400  $\mu\text{M}$  de 7NCCA et 5  $\mu\text{M}$  de FMN. L'oxydation du NADH a été suivie par absorbance à 340 nm.

Les vitesses initiales ont pu être déterminées entre 0 et 4 minutes. Selon ces données, l'enzyme ayant le plus petit Km est l'enzyme EF0404 suivie de l'enzyme Azor puis de l'enzyme NfsA (Tableau 40). On retrouve la même hiérarchie d'affinité que pour les valeurs de Km obtenues avec les données de fluorescence. Concernant les valeurs de  $v_{\text{max}}$ , l'enzyme ayant le plus grand  $v_{\text{max}}$  semble être l'enzyme NfsA suivie de l'enzyme Azor puis de l'enzyme EF0404 (Tableau 40). Les gammes de concentrations utilisées n'étaient pas optimisées pour déterminer les constantes enzymatiques vis-à-vis du NADPH, c'est pourquoi il n'y a pas de données.

### V.2.3. Conclusion sur la détermination des constantes enzymatiques

La détermination des constantes enzymatiques est longue et fastidieuse. Selon les différentes méthodes utilisées, les valeurs obtenues sont différentes et non reproductibles d'une expérience à une autre. La classification des enzymes selon leur affinité pour le substrat étudié peut être la même pour deux méthodes mais peut aussi varier, ce qui ne permet pas de valider les données obtenues.



## VI. Etude du rôle *in vivo* des azoréductases et nitroréductases dans la réduction des substrats « azo » et « nitro » : exemple avec une souche de *Escherichia coli*

### VI.1. Construction des simples mutants délétés de *azoR* et/ou *nfsA* et/ou *nfsB*

Le travail a été initié sur les souches sauvages de *E. coli* ECO87 et *E. faecalis* SFL95 de la souchothèque de bioMérieux mais des soucis de compétence des cellules de ces souches nous ont contraint à poursuivre sur la souche de laboratoire K12 MG1655. L'intérêt de la souche de laboratoire MG1655, c'est qu'elle est très peu modifiée génétiquement et donc très proche d'une souche sauvage non pathogène et que son génome est entièrement séquencé (17). Les mutants ont été obtenus par mutagenèse dirigée utilisant la méthode mise au point par Datsenko *et al* (44) sur la souche de laboratoire d'*E. coli* K12 MG1655 (ECOK12).

La souche ECOK12 a été transformée avec le plasmide pKD46 (souche ECOK12/pKD46). Les cellules de la souche ECOK12/pKD46 ont été cultivées à 30°C en milieu liquide LB supplémenté avec 100 µg.mL<sup>-1</sup> d'ampicilline (LB-amp) et 1 mM d'arabinose pour induire l'expression de la Lambda Red recombinase, puis rendues compétentes. Ces cellules ont ensuite été transformées avec le fragment PCR contenant une cassette de résistance au chloramphénicol (gène *cat*) encadrée par des séquences FRT et des séquences homologues aux régions flanquantes du gène cible, en l'occurrence le gène *azoR* ou le gène *nfsA*, ou le gène *nfsB*. La sélection des clones recombinants a été faite sur gélose LB supplémentée avec 20 µg.mL<sup>-1</sup> de chloramphénicol (GL-cm). 100 µL de cellules transformées dans 1 mL de LB supplémenté avec 20 µg.mL<sup>-1</sup> de chloramphénicol (LB-cm) ont été étalés. Les cellules transformées ont ensuite été centrifugées, le surnageant éliminé et les cellules reprises dans 200 µL de LB-cm. 100 µL de ces cellules concentrées ont également été étalées sur GL-cm. Les géloses ont été incubées 24 h à 37°C. Le reste des cellules transformées non étalées a été laissé à température ambiante dans les 100 µL de LB-cm. A l'issue de 24h d'incubation, aucun clone n'a été observé. Les 100 µL restant des cellules ont alors été étalés sur GL-cm et incubés à 37°C sur 24h. A l'issue de ces 24h d'incubation, les premières boîtes inoculées 48h avant ne présentaient toujours pas de clones alors que la boîte inoculée la deuxième fois

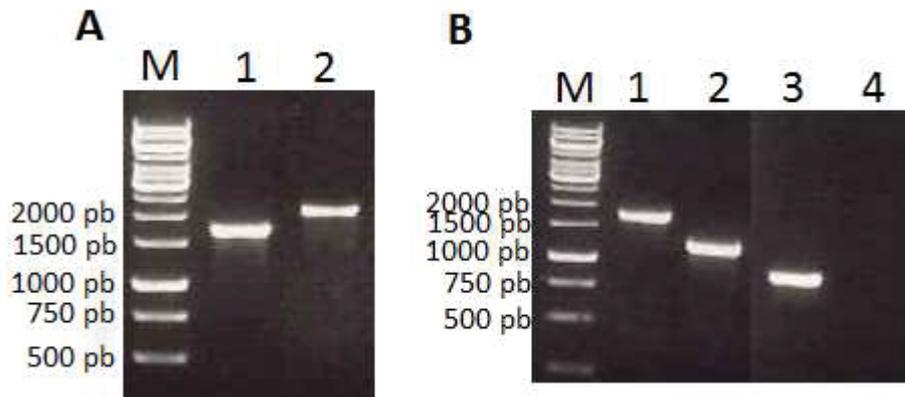
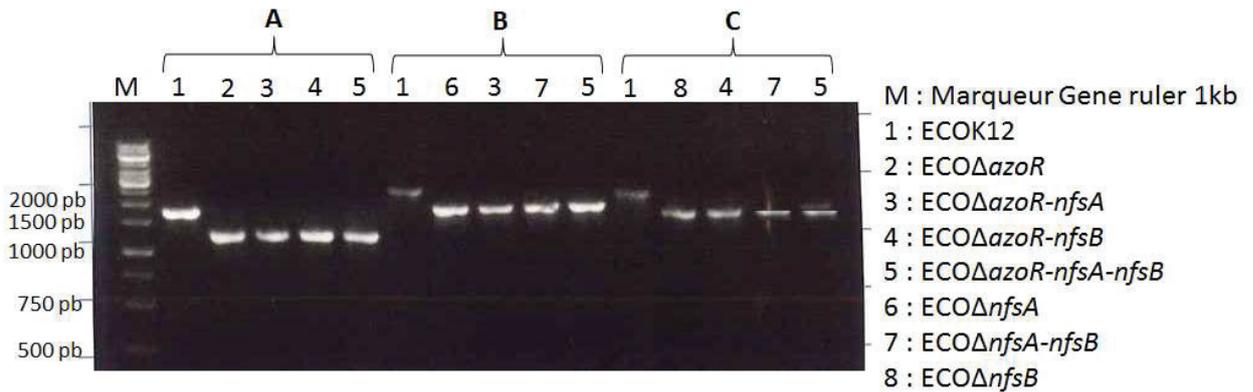


Figure 63 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de vérification du mutant *ECOΔazoR*.

A) PCR avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* sur les souches ECOK12 (1) et ECOK12 ayant recombiné avec le fragment PCR FRT-*azoR* (2). B) PCR avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* (1,2) et les amorces *pQEazoR* (3,4) sur les souches ECOK12 (1,3) et ECOK12 ayant recombiné avec le fragment PCR FRT-*azoR* puis avec le plasmide *pCP20*(2,4). Le marqueur de poids moléculaire est le maraueur Gene Ruler 1Kb Fermentas (M).

présentait 5 clones pour la construction du simple mutant  $ECO\Delta azoR$  délété du gène *azoR*. Dans le cas des autres simples mutants, une dizaine de clones s'est développée pour la construction de la souche délétée du gène *nfsA* ( $ECO\Delta nfsA$ ) et seulement 3 clones pour la construction de la souche délétée du gène *nfsB* ( $ECO\Delta nfsB$ ). Pour les deux constructions  $ECO\Delta nfsA$  et  $ECO\Delta nfsB$ , l'étalement de la moitié des cellule suite à la transformation par électroporation s'est faite après 2h30 d'incubation à température ambiante (au lieu d'1h à 37°C). Ainsi, des clones ont pu être observés dès 24h après la transformation contrairement à la construction  $ECO\Delta azoR$  pour laquelle les clones ne sont apparus qu'après l'étalement des cellules incubées sur la nuit à température ambiante. Une première PCR sur colonie a été effectuée avec des amorces dessinées en amont et en aval de la région à déléter pour vérifier l'insertion au bon site de la cassette de résistance au chloramphénicol. Pour la délétion du gène *azoR* les amorces utilisées sont *amontazoR* et *avalazo* ; pour la délétion du gène *nfsA* les amorces utilisées sont *amontnfsA* et *avalnfsA* ; et pour la délétion du gène *nfsB* les amorces utilisées sont *amontnfsB* et *avalnfsB* (Cf. Tableau 21). La taille de la cassette de résistance au chloramphénicol encadrée des séquences FRT est plus grande que la taille du gène natif (Cf III.2.3 de Matériel et Méthodes). De ce fait le fragment de la souche recombinée doit être plus grand que le fragment de la souche parentale ECOK12. Par exemple, le fragment de la région contenant *azoR* fait 1724 pb chez la souche parentale ECOK12 alors que le fragment de cette même région dans la souche recombinée doit faire 2133 pb (Figure 63A). Tous les clones testés pour les simples mutants contenaient la cassette de résistance au chloramphénicol insérée au bon site. A l'issue de cette étape, tous les simples mutants recherchés et résistants au chloramphénicol ont été obtenus.

L'étape suivante consistait à exciser la cassette de résistance au chloramphénicol. Pour cela, les mutants résistants au chloramphénicol ont été transformés avec le plasmide pCP20. Ce plasmide thermosensible code pour la FLP recombinase capable d'effectuer une recombinaison entre deux séquences FRT. Les cellules transformées sont étalées sur GL-amp et incubées à 30°C sur la nuit. Le lendemain, cinq clones ont été sélectionnés et mis en culture en milieu liquide LB sans antibiotique à 42°C sur la nuit pour que les cellules perdent le plasmide pCP20. Des essais ont été effectués à 37°C mais des clones résistants à l'ampicilline persistaient, ce qui indiquent que les cellules avaient du mal à perdre le plasmide.  $10^2$  cellules ont été étalées sur gélose LB sans antibiotique (GL) et incubées à 37°C sur la nuit. Une dizaine de clones a été repiquée sur GL et incubées à 37°C sur la nuit. La



**Figure 64 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de vérification de tous les mutants.**

A) PCR avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* sur les simples (2), doubles (3, 4) et triple (5) mutants délétés de *azoR* ainsi que sur la souche parentale (1). B) PCR avec les amorces *amontnfsA* et *avalnfsA* sur les simples (6), doubles (3, 7) et triple (5) mutants délétés de *nfsA* ainsi que sur la souche parentale (1). C) PCR avec les amorces *amontnfsB* et *avalnfsB* sur les simples (8), doubles (4, 7) et triple (5) mutants délétés de *nfsB* ainsi que sur la souche parentale (1). Le marqueur de poids moléculaire est le marqueur Gene Ruler 1Kb Fermentas (M).

perte de résistance aux antibiotiques (ampicilline et chloramphénicol) a été vérifiée à 37°C par la méthode de réplique de ces 10 clones sur velour en utilisant des boîtes de pétri GL, GL-amp et GL-cm. Aucun clone n'a été capable de se développer sur les géloses supplémentées avec les antibiotiques ampicilline et chloramphénicol. Ces données indiquent que les mutants ont perdus les résistances aux antibiotiques (perte de la cassette *cat* du chromosome et perte du plasmide pCP20) utilisés pour la sélection des clones au cours de la méthode de mutagénèse.

Une seconde PCR avec les mêmes amorces que précédemment permet de vérifier la délétion du gène d'intérêt. Cette fois-ci, la taille du fragment de la souche mutée doit être inférieure à celle du fragment de la souche parentale ECOK12. Par exemple, le fragment de la région contenant *azoR* fait toujours 1724 pb chez la souche parentale ECOK12 alors que le fragment de cette même région chez la souche délétée du gène *azoR* doit faire 1117 pb (Figure 63B). Deux clones ont été testés pour chaque construction et les deux clones étaient correctement délétés des gènes *azoR*, *nfsA* ou *nfsB*. L'absence d'amplification par PCR sur le gène *azoR* avec les amorces pQE<sub>azoR</sub> internes au gène *azoR* a montré que le gène *azoR* n'était plus présent sur le génome de la souche  $ECO\Delta azoR$  (Figure 63B). De plus, le séquençage de la partie délétée a confirmé la délétion du gène *azoR* laissant place à une cicatrice des séquences FRT (Annexe page 351). Les gènes *nfsA* et *nfsB* ont également été délétés avec succès du génome de *E. coli* K12 MG1655 par la même méthode que *azoR* (Figure 64 puits 6 et 7) et vérifiés par séquençage (Annexe pages 352 et 353).

## **VI.2. Construction des doubles et du triple mutants délétés des gènes *azoR* et/ou *nfsA* et/ou *nfsB***

Les doubles mutants délétés de *azoR* et *nfsA* ( $ECO\Delta azoR-nfsA$ ), de *azoR* et *nfsB* ( $ECO\Delta azoR-nfsB$ ) et de *nfsA* et *nfsB* ( $ECO\Delta nfsA-nfsB$ ) ont été construits selon la même méthode que les simples mutants. Pour cela, la souche de départ à transformer avec le plasmide pKD46 n'était pas la souche parentale ECOK12 mais un des simples mutants. Pour la construction des doubles mutants  $ECO\Delta azoR-nfsA$  et  $ECO\Delta azoR-nfsB$  la souche de départ a été le simple mutant  $ECO\Delta azoR$ . Pour la construction du double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  la souche de départ a été le simple mutant  $ECO\Delta nfsB$ . A l'issue de l'étape de transformation avec le fragment PCR contenant la cassette de résistance au chloramphénicol, un plus grand nombre de clones résistants au chloramphénicol (une cinquantaine en moyenne) s'est



**Figure 65 : Analyse sur gel d'agarose 1.2% des fragments PCR de criblage des doubles mutants.**

A) PCR avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* sur la souche parentale (P) et le simple mutant *ECOΔazoR* (S) ainsi que sur les clones résistants au chloramphénicol négatifs pour l'insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol avec les amorces *amontnfsA* et *avalnfsA* pour la construction du double mutant *ECOΔazoRΔnfsA* et avec les amorces *amontnfsB* et *avalnfsB* pour la construction du double mutant *ECOΔazoRΔnfsB*. B) PCR avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* sur la souche parentale (P) et le simple mutant *ECOΔazoR* (S) ainsi que sur les clones résistants au chloramphénicol potentiellement recombinés au locus de *nfsB*. Les numéros correspondent aux numéros de clones pour les 2 gels. Le marqueur de poids moléculaire est le marqueur Gene Ruler 1Kb Fermentas (M).

développé par rapport au nombre de clones qui ont été obtenus lors de la construction des simples mutants. Cependant, seul 1 clone sur 45 testés (soit un rendement de 2%) s'est révélé être un clone recombinant intéressant suite à la PCR de vérification de la bonne insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol au locus de *nfsA* pour le double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsA$ . Deux clones sur 45 testés (soit un rendement de 4%) se sont révélés être des clones recombinants au niveau du locus du gène *nfsB* pour le double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsB$  et 3 clones sur 33 testés pour le double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  (soit un rendement de 9%). L'augmentation du nombre de clones résistants au chloramphénicol est certainement due à une recombinaison entre la cicatrice de la séquence FRT du simple mutant et les séquences FRT du fragment PCR introduit dans la cellule. En effet, une PCR sur colonie sur les 10 premiers clones obtenus lors de la construction du double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsA$  avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* a mis en évidence un fragment de taille supérieure à la taille du fragment obtenu avec la souche parentale ce qui indique qu'il y a eu une insertion à ce locus *azoR* (Figure 65A) et non au locus *nfsA* ciblé. Le criblage par PCR pour rechercher les doubles  $ECO\Delta azoR-nfsA$  et  $ECO\Delta azoR-nfsB$  a donc été effectué avec les amorces *amontazoR* et *avalazoR* en recherchant un clone résistant au chloramphénicol dont le fragment PCR amplifiant le locus de *azoR* soit de taille inférieure au fragment de la souche parentale pour la même région chromosomique. Ainsi, pour le double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsB$  2 clones (n°24 et n°26) se sont avérés résistants au chloramphénicol et délétés pour le gène *azoR* (Figure 65B). De cette manière, on a pu supposer que la cassette de résistance au chloramphénicol s'était insérée au locus désiré, c'est-à-dire au locus de *nfsB* dans le cas montré dans la Figure 65B. Cette insertion a évidemment été vérifiée et confirmée par PCR à l'aide des amorces *amontnfsB* et *avalnfsB* dans le cas du double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsB$  et par les amorces *amontnfsA* et *avalnfsA* dans le cas du double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsA$ . Dans le cas du double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$ , le criblage des clones recombinés a été effectué avec les amorces *amontnfsA* et *avalnfsA*.

L'étape suivante d'excision s'est déroulée de la même manière que pour les simples mutants. La seconde analyse par PCR a permis de vérifier la délétion des gènes ciblés et de valider les doubles mutants (Figure 64 puits 3, 4 et 7). Une réaction de PCR sur chaque gène avec les amorces internes aux gènes (*pQEazoR* pour le gène *azoR*, *pQEnfsA* pour le gène *nfsA* et *pQEnfsB* pour le gène *nfsB*) a permis de vérifier que le gène ciblé n'était plus présent sur le génome de la souche mutée. De plus, le séquençage de la partie délétée a confirmé la

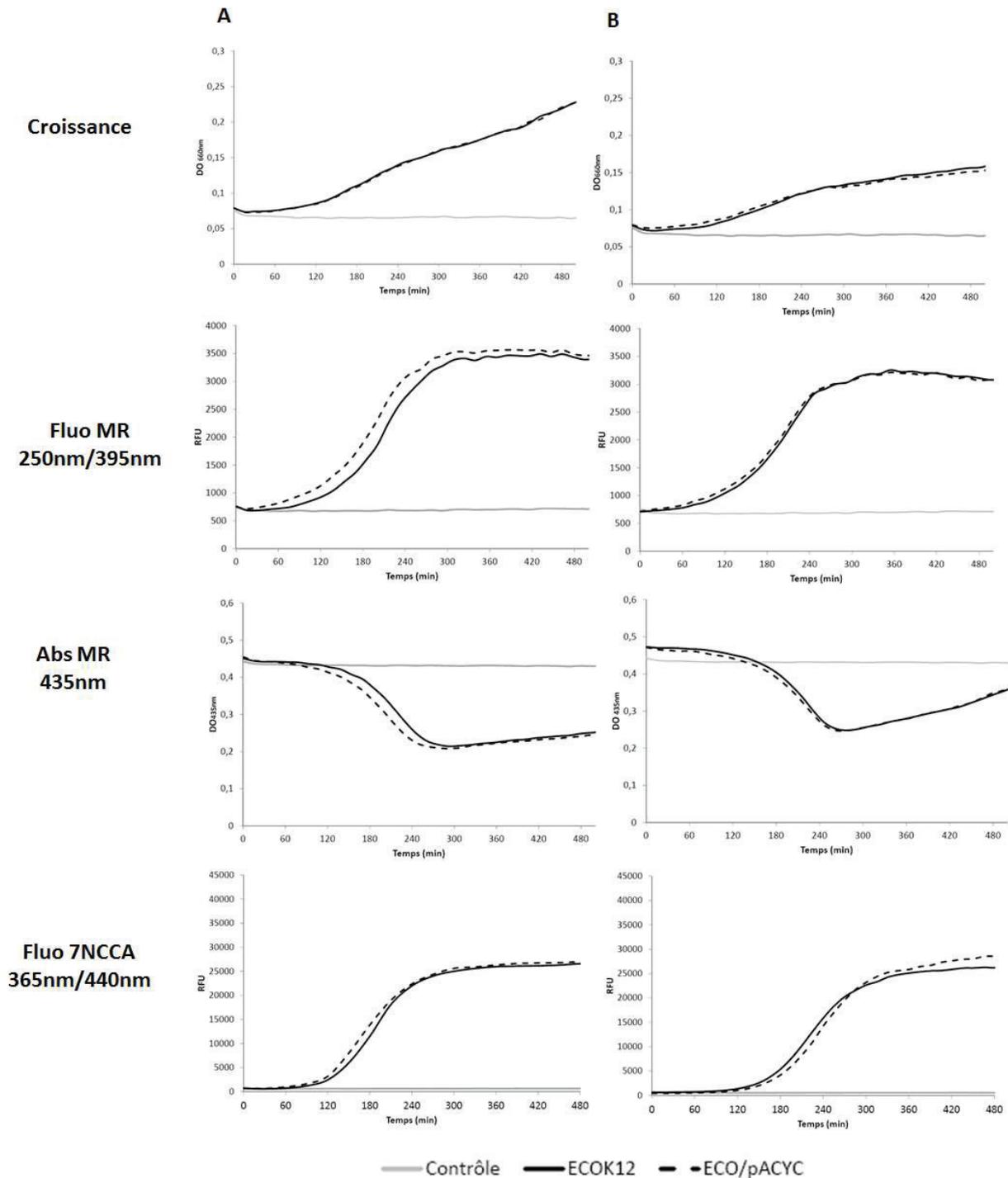


Figure 66 : Impact du plasmide vide pACYC177 sur la croissance et les activités azoréductase et nitroréductase de la souche ECOK12.

100 µL de mélange réactionnel contient 100 µM de MR ou 7NCCA et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie en conditions statiques (A) et sous agitation orbitale (B) en absorbance à 660 nm (croissance) et à 435 nm (Abs), ainsi qu'en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du produit de réduction du MR (250 nm/395 nm) (fluo MR) ou du produit de réduction du 7NCCA (365 nm/440 nm) (fluo 7NCCA).

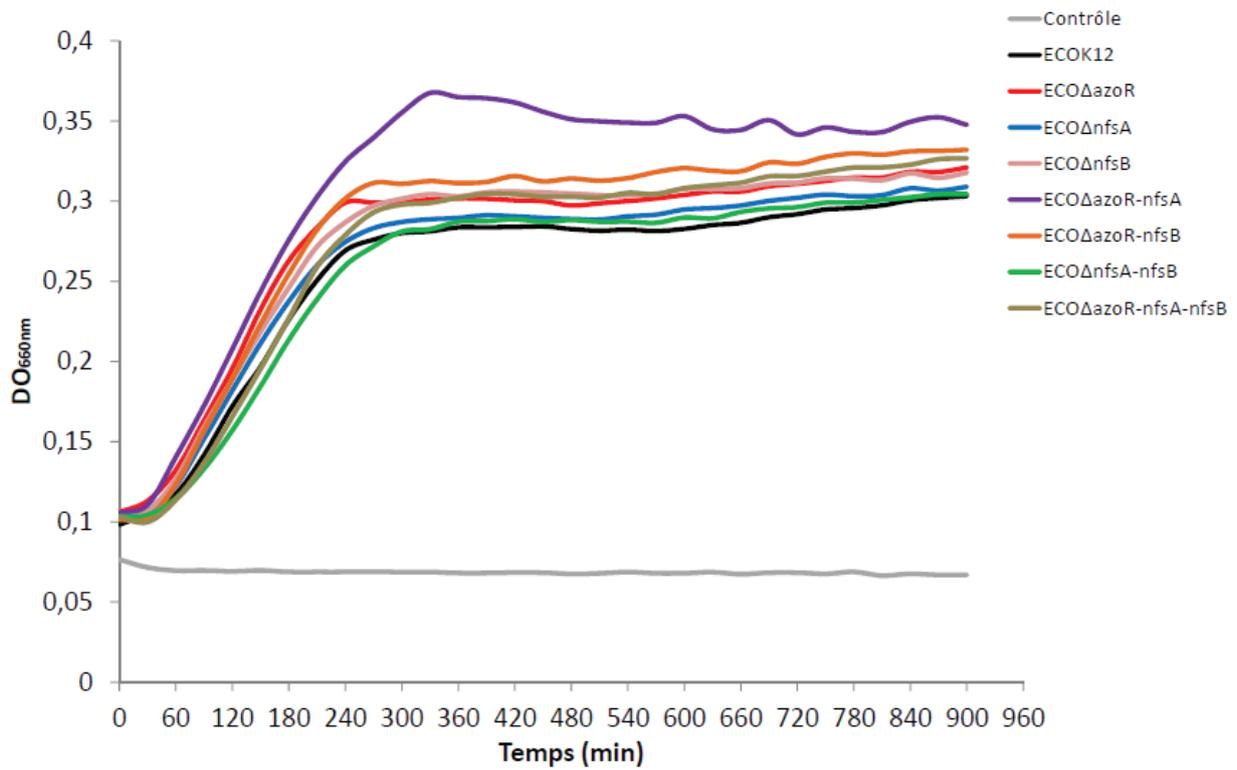
délétion de chaque gène ciblé laissant place à une cicatrice des séquences FRT (Annexe page 351).

Le triple mutant a été construit selon la même méthode que les doubles mutants en prenant la souche *ECOΔazoR-nfsA* comme souche de départ. A l'issue de l'étape de transformation avec le fragment d'ADN issu de la PCR contenant la cassette de résistance au chloramphénicol, 34 clones se sont développés. Cependant, un seul clone sur les 34 testés s'est révélé être un clone recombinant intéressant suite à la PCR de vérification avec les amorces *amontnfsB* et *avalnfsB* de la bonne insertion de la cassette de résistance au chloramphénicol (soit un rendement de 3%). L'excision de la cassette de résistance au chloramphénicol n'a pas posé de problème. La délétion des trois gènes a été vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces *amontnfsB* et *avalnfsB* (Figure 64 puits 7) ainsi que par les amorces internes au gène *azoR* (*pQEazoR*), au gène *nfsA* (*pQEnfsA*) et au gène *nfsB* (*pQEnfsB*). De même, les zones délétées du triple mutant ont été vérifiées par séquençage, ce qui a mis en évidence la cicatrice FRT à chacun des 3 sites ciblés. Grâce à la méthode Datsenko *et al* (44), trois simples mutants, trois doubles mutants et un triple mutant ont été construits avec succès. De manière générale, un plus grand nombre de clones résistants au chloramphénicol sont observés après avoir étaler le reste des cellules incubées à température ambiante une nuit après l'électroporation plutôt que l'étalement suite à 1 h à 37°C ou 2 h 30 à température ambiante. Il est donc préférable d'étendre la culture d'expression sur une nuit pour obtenir des mutants résistants au chloramphénicol 48 h après électroporation.

### **VI.3. Complémentation des mutants**

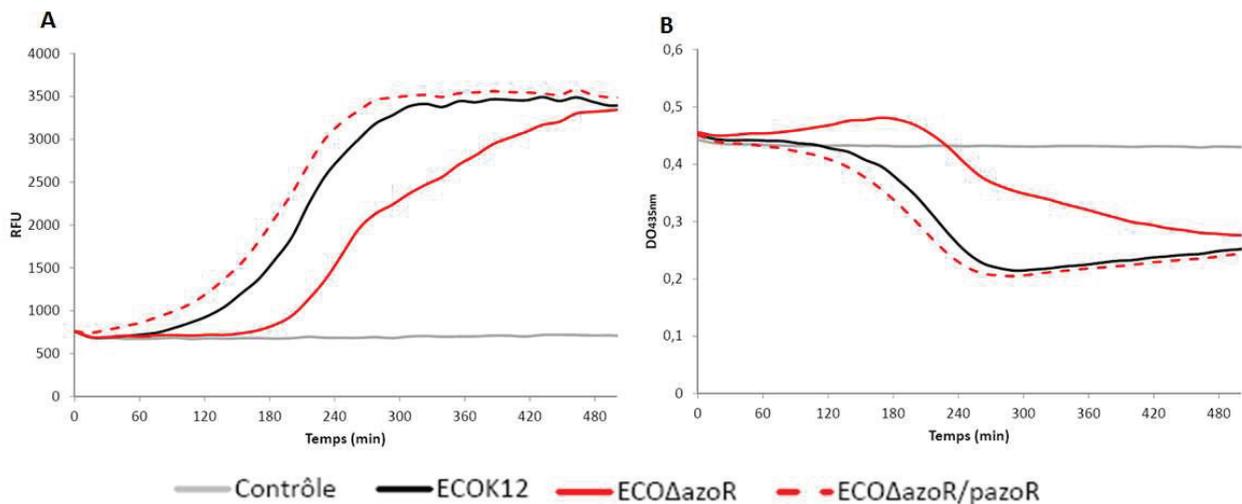
#### **VI.3.1. Le plasmide pACYC177 vide n'a pas d'incidence sur la souche**

Afin de s'assurer que le plasmide pACYC177 n'a pas d'impact sur la croissance ou sur les capacités de réduction des souches dans le but de l'utiliser comme vecteur de complémentation, toutes les souches mutantes construites ont été transformées avec le plasmide vide pACYC177. La souche *ECO*pACYC177 a été testée en comparaison de la souche sauvage *ECO*K12. Aucune différence de croissance ni de modification d'activité azoréductase ou nitroréductase n'a été remarquée que ce soit en condition statique limitant l'oxygénation ou sous agitation augmentant l'oxygénation du milieu (Figure 66). Cette observation a été faite pour toutes les souches. Le plasmide vide pACYC177 n'a donc pas d'impact sur le



**Figure 67 : Courbes de croissance des souches mutantes en présence de Methyl Red (MR).**

Les courbes de croissance ont été obtenues par mesure de l'absorbance à 660 nm en TSB supplémenté avec 100 µM de MR à 35°C sans apport d'oxygène.



**Figure 68 : Réduction de MR par le mutant *ECOΔazoR* en condition statique.**

500 µL de mélange réactionnel contient 100 µM de MR et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie en condition statique par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (A) et absorbance à 435 nm (B).

phénotype des souches et peut être utilisé comme vecteur de complémentation.

### VI.3.2. Construction des souches complémentées

Les gènes *azoR*, *nfsA* et *nfsB* ont été clonés avec leur séquence promotrice native dans le plasmide pACYC177. Le choix des sites de restriction pour ces clonages s'est fait de façon à pouvoir cloner dans un même plasmide les trois gènes, ceci dans le but de n'avoir qu'un seul plasmide à introduire à la fois dans les mutants multiples (doubles et triple). De cette façon, les doubles et le triple mutants ont pu être complémentés par un seul gène à la fois, mais aussi par deux ou trois gènes avec un seul plasmide. Par exemple, le double mutant  $ECO\Delta azoR-nfsA$  a pu être transformé avec le plasmide pACYC177 contenant le gène *azoR* (*pazoR*), le plasmide pACYC177 contenant le gène *nfsA* (*pnfsA*) ou le plasmide pACYC177 contenant les 2 gènes *azoR* et *nfsA* (*pazoR-nfsA*). Les cartes des plasmides de complémentation sont disponibles en annexe (page 296 à 302).

## VI.4. Rôle de AzoR, NfsA et NfsB dans l'activité azoréductase

### VI.4.1. En absence d'oxygène

Lors de notre étude, l'absence d'oxygène lors de la croissance a été obtenue en cultivant les microorganismes en milieu liquide sans agitation. Aucune différence de croissance (suivie par mesure d'absorbance à 660 nm) n'a été constatée entre la souche parentale et les souches mutantes lors de la mise en culture dans du TSB supplémenté avec 100  $\mu$ M de Methyl Red (MR) à 35°C (température d'incubation recommandée par les systèmes TEMPO® et Vitek®2) (Figure 67). Les différents mutants obtenus ont été testés sur le MR selon le protocole de cinétique de réduction par des cellules en croissance en condition statique en suivant la réduction du MR en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm

#### VI.4.1.1. AzoR

Le mutant délété du gène *azoR* était toujours capable de dégrader le MR, mais un retard dans la réduction du substrat par rapport à la souche sauvage a été observé (Figure 68). Ce retard de réduction est bien dû à la délétion du gène *azoR* puisqu'aucune différence de croissance n'a été constatée entre la souche parentale et la souche mutante (Figure 67). En rapportant le gène sauvage *azoR* par le plasmide pACYC177 (*pazoR*) dans la souche

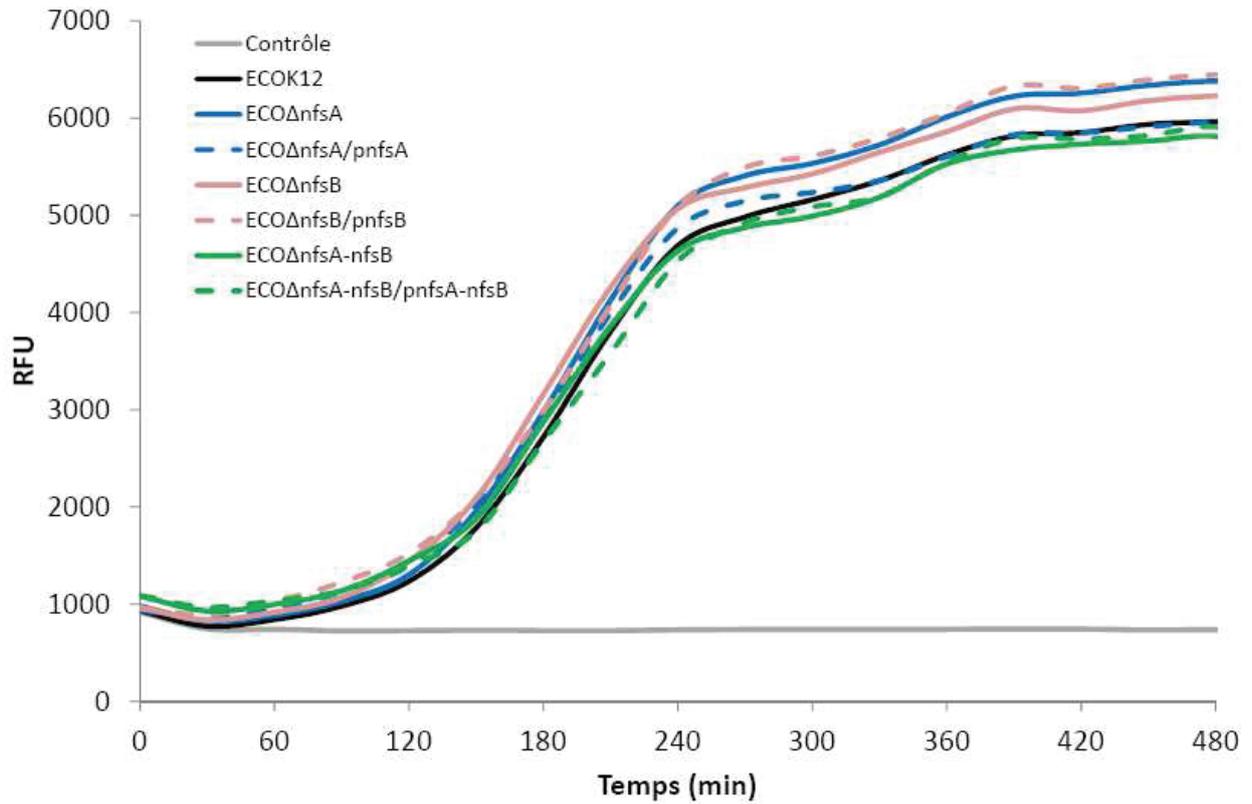


Figure 69 : Réduction de MR par le mutant *ECOΔnfsA* *ECOΔnfsB* et *ECOΔnfsA-nfsB* complété (- -) ou non (--) par le plasmide hybride *pACYC177* porteur des gènes délétés sur le chromosome.  
 500 µL de mélange réactionnel contient 100 µM de MR et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie en conditions statiques par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm.

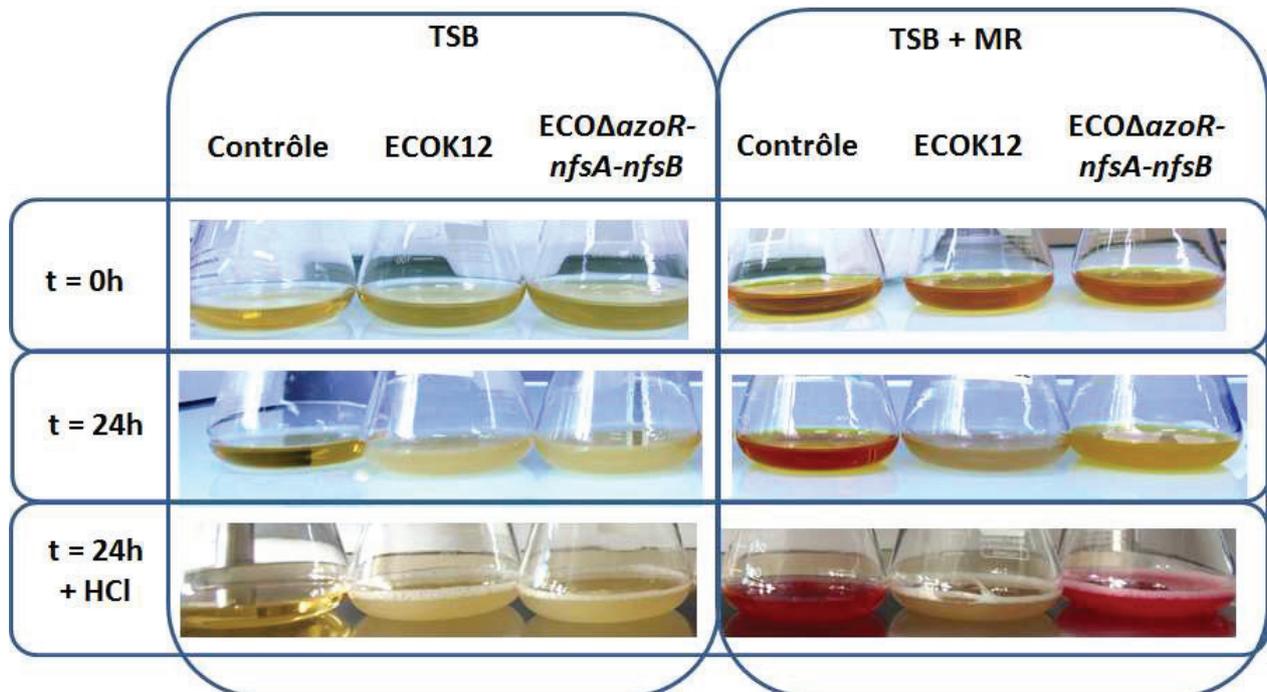


Figure 70 : Réduction du MR par le triple mutant *ECOΔazoR-nfsA-nfsB* sous agitation à 35°C.  
 40 mL de milieu réactionnel contient 100 µM de MR, un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle contient le milieu réactionnel sans inoculum. A t=24 h, quelques gouttes de HCl ont été ajoutés pour vérifier la présence de MR qui devient rouge en condition acide.

ECO $\Delta$ *azoR*, une restauration de la vitesse de dégradation du MR de la souche sauvage a pu être observée (Figure 68). Ces résultats montrent que la protéine AzoR est impliquée dans la dégradation du MR mais n'est pas indispensable en absence d'oxygénation du milieu.

#### VI.4.1.2. NfsA et NfsB

Les mutants délétés des gènes *nfsA* et/ou *nfsB* sont capables de réduire le MR de façon identique à la souche parentale (Figure 69). Les protéines codées par ces gènes ne sont donc pas indispensables à la dégradation du MR en absence d'oxygène.

### VI.4.2. En présence d'oxygène

La réduction du MR par les différents mutants a également été testée en modifiant les conditions d'oxygénation par culture des cellules en agitation continue. L'agitation permet de maintenir la concentration en dioxygène dans le milieu liquide.

#### VI.4.2.1. AzoR

A l'issue de 24 h d'incubation à 35°C sous agitation, la culture de la souche délétée des 3 gènes *azoR*, *nfsA* et *nfsB* est restée jaune-orange (Figure 70). Le MR donne une couleur rouge au milieu de culture TSB. Une fois que la densité cellulaire bactérienne a augmenté du fait de la croissance sans dégrader le MR, la coloration devient jaune-orange ce qui peut être difficile à distinguer de la culture bactérienne qui a réduit le MR. Afin de vérifier s'il reste du MR dans la culture, quelques gouttes d'acide chlorhydrique ont été ajoutées dans la culture en fin d'incubation car le MR devient rouge en condition acide. Ainsi, il est aisé de faire la différence entre les erlenmeyers ou les puits dans lesquels il reste du MR et dans lesquels il n'y en a plus. De cette façon, nous avons constaté que le triple mutant n'avait pas dégradé significativement le MR, contrairement à la souche parentale ECOK12 (Figure 70). Les mêmes observations ont été faites avec le mutant simple ECO $\Delta$ *azoR* incubé dans les mêmes conditions (Figure 71). Les données d'absorbance à 435 nm ont confirmé ces observations (Figure 72A). L'absorbance à 435 nm du MR en présence de la souche parentale a commencé à diminuer dès la première heure. Au cours de la quatrième heure d'incubation, l'absorbance a réaugmenté jusqu'à sa valeur initiale. En parallèle, l'augmentation de l'intensité de fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission 250 nm/395 nm s'est arrêtée après 6h d'incubation. Tout le MR a été *a priori* consommé, ce qui peut expliquer pourquoi l'absorbance ne diminue plus. La croissance bactérienne crée un trouble

	1	2	3	4	5	6
A	ECOΔ <i>azoR</i>	ECOΔ <i>azoR</i> /pACYC177	ECOΔ <i>azoR</i> /pazoR	ECOΔ <i>nfsA</i>	ECOΔ <i>nfsA</i> /pACYC177	ECOΔ <i>nfsA</i> /p <i>nfsA</i>
B	ECOΔ <i>nfsB</i>	ECOΔ <i>nfsB</i> /pACYC177	ECOΔ <i>nfsB</i> /p <i>nfsB</i>	ECOΔ <i>nfsA-nfsB</i>	ECOΔ <i>nfsA-nfsB</i> /pACYC177	ECOΔ <i>nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsA-nfsB</i>
C	ECOΔ <i>nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsA</i>	ECOΔ <i>nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsB</i>	ECOK12/pACYC177	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i>	M ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /pACYC177	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /pazoR- <i>nfsA-nfsB</i>
D	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /pazoR- <i>nfsA</i>	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /pazoR- <i>nfsB</i>	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsA-nfsB</i>	ECOΔpazoR- <i>nfsA-nfsB</i> /pazoR	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsA</i>	ECOΔ <i>azoR-nfsA-nfsB</i> /p <i>nfsB</i>

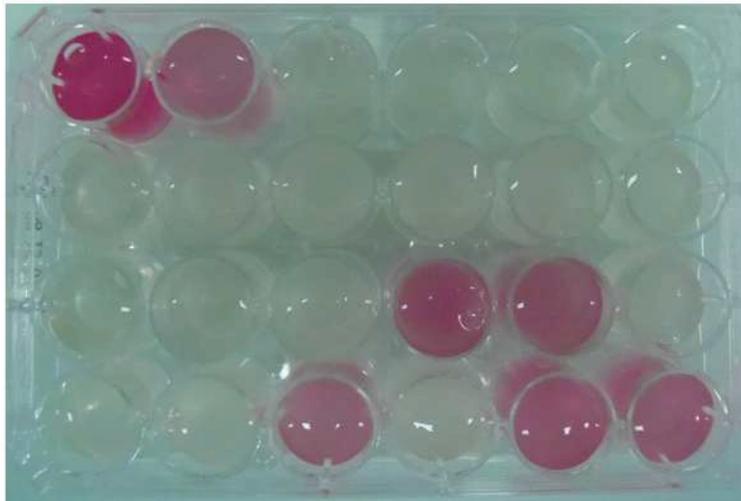


Figure 71 : Réduction du MR par les mutants délétés de *azoR* et/ou *nfsA* et/ou *nfsB* sous agitation à 35°C en plaque 24puits. 500 µL de milieu réactionnel contient 100µM de MR, un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le tableau correspond au plan de plaque. A t=24h quelques gouttes de HCl ont été rajoutées pour vérifier la présence de MR qui devient rouge en condition acide.

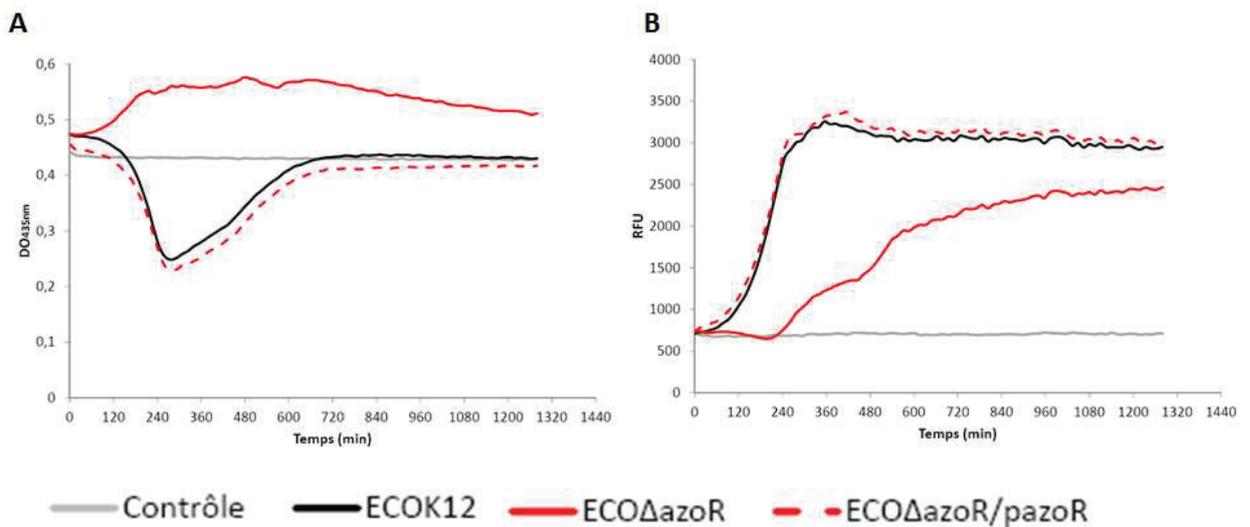


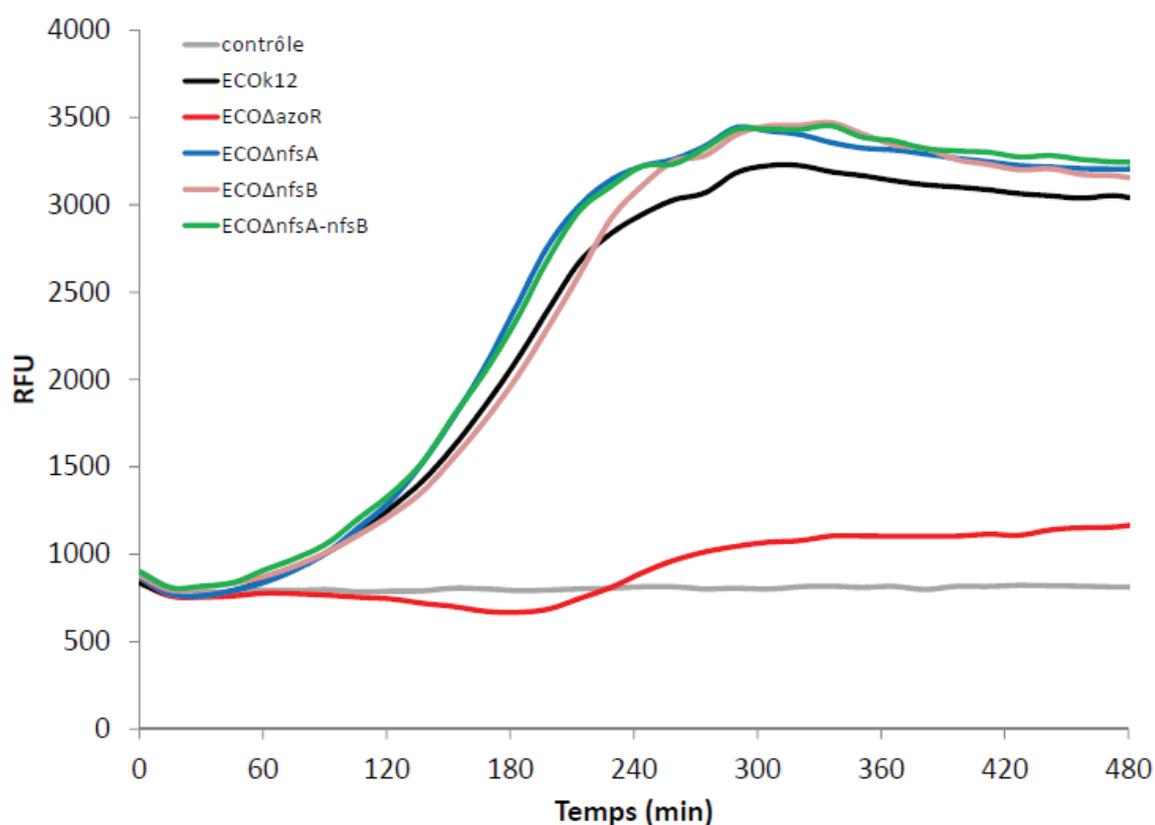
Figure 72 : Réduction de MR par le mutant ECOΔ*azoR* sous agitation orbitale sur 22 h.

500 µL de mélange réactionnel contient 100 µM de MR et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie sous agitation en absorbance à 435 nm (A) et en fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation/émission de 250 nm/395 nm (B).

dans la solution ce qui pourrait expliquer l'augmentation d'absorbance à 435 nm. Les données de fluorescence obtenues ne sont pas aussi marquées. Malgré l'absence de décoloration, on a pu observer une augmentation de fluorescence non négligeable dès 4h d'incubation. Cependant, elle était beaucoup plus lente que celle observée avec la souche parentale pour laquelle l'augmentation de la fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du produit de réduction du MR (250 nm/395 nm) a démarré au cours de la première heure d'incubation (Figure 72B).

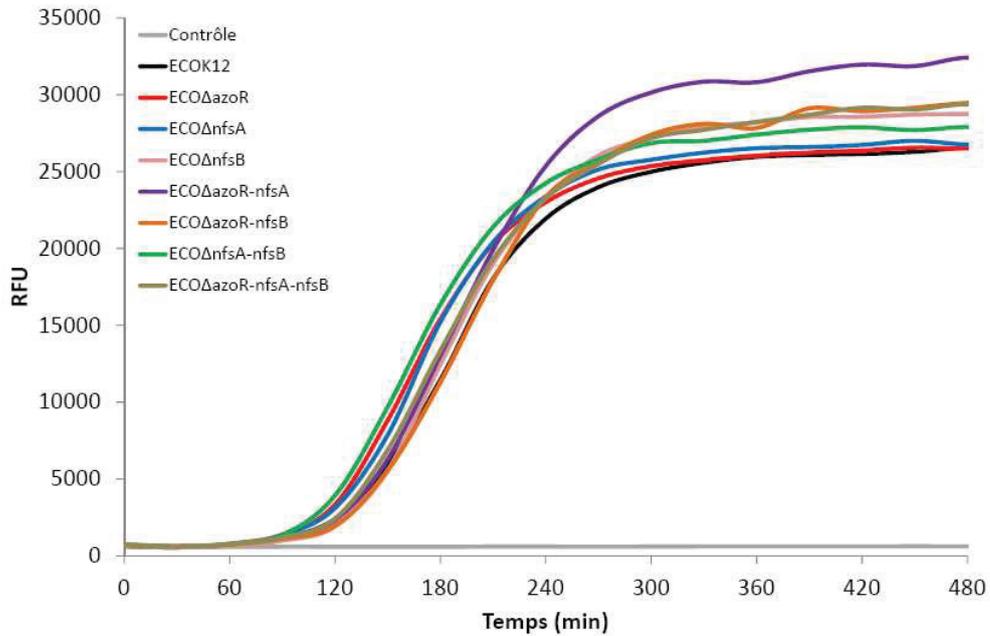
#### VI.4.2.2. NfsA et NfsB

En présence d'oxygène, les mutants *ECOΔnfsA*, *ECOΔnfsB* et *ECOΔnfsA-nfsB* ont réduit le MR de la même façon que la souche parentale *ECOK12* (Figure 73). *A priori*, les protéines NfsA et NfsB ne sont pas nécessaires à la réduction du MR que ce soit en absence ou en présence d'oxygène.



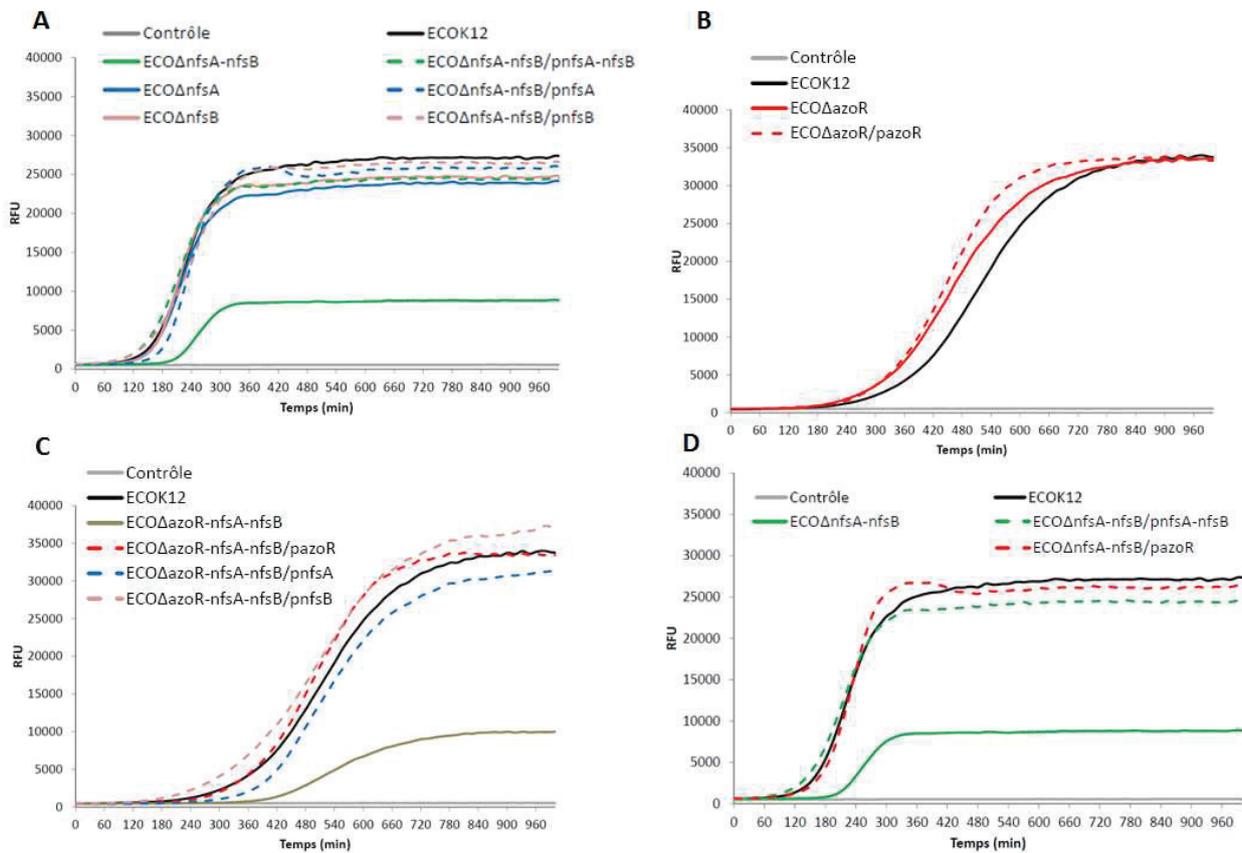
**Figure 73 : Réduction de MR par les mutants *ECOΔazoR*, *ECOΔnfsA*, *ECOΔnfsB* et *ECOΔnfsA-nfsB*.**

500  $\mu$ L de mélange réactionnel contient 100  $\mu$ M de MR et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie sous agitation par fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm.



**Figure 74 : Réduction de 7NCCA par les différents mutants en conditions statiques.**

500  $\mu$ L de mélange réactionnel contient 100  $\mu$ M de MR et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie en conditions statiques par fluorescence à 365 nm/440 nm.



**Figure 75 : Réduction de 7NCCA par les différents mutants complémentés ou non en conditions d'agitation.**

A) *ECOΔnfsA*, *ECOΔnfsB*, *ECOΔnfsA-nfsB*, B) *ECOΔazoR*, C) *ECOΔazoR-nfsA-nfsB*, D) *ECOΔnfsA-nfsB*. 500  $\mu$ L de mélange réactionnel contient 100  $\mu$ M de 7NCCA et un inoculum de 0,5 MF dans du TSB. Le contrôle est constitué du milieu réactionnel sans inoculum. La réaction est suivie en conditions d'agitation à 35°C par fluorescence à 365 nm/440 nm.

## VI.5. Rôle de AzoR, NfsA et NfsB dans l'activité nitroréductase

### VI.5.1. En absence d'oxygène

L'activité nitroréductase a également été étudiée avec les mutants. La réduction du substrat « nitro » 7NCCA a été suivie en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission du 7NCCA réduit (365 nm/440 nm) en absence d'oxygène (condition statique) à 35°C. Aucune différence n'a été observée entre la réduction du 7NCCA par les mutants et la réduction du 7NCCA par la souche parentale. La délétion des 3 gènes n'a pas eu d'impact sur la capacité des cellules à dégrader le substrat 7NCCA en absence d'oxygène (Figure 74).

### VI.5.2. En présence d'oxygène

#### VI.5.2.1. L'importance du couple NfsA/NfsB

La délétion des gènes *nfsA* et *nfsB* indépendamment l'un de l'autre n'a pas eu d'impact sur l'activité nitroréductase cellulaire (Figure 75A). Par contre, la délétion des 2 gènes en même temps a conduit à une diminution de l'activité nitroréductase cellulaire : plus lente et la quantité de 7NCCA réduit était moins importante en fin d'incubation que la quantité produite par la souche parentale (Figure 75A). Une estimation correspondant à une perte d'activité d'environ 70% a pu être faite. De plus, l'activité nitroréductase a été complètement restaurée en complétant la souche par un seul des 2 gènes (Figure 75A).

#### VI.5.2.2. AzoR est capable de compenser la perte d'activité nitroréductase induite par la délétion des 2 gènes *nfsA* et *nfsB*.

La délétion du gène *azoR* n'a pas eu d'impact sur l'activité nitroréductase des cellules car le mutant simple  $ECO\Delta azoR$  a présenté une activité nitroréductase similaire à celle de la souche parentale ECOK12 (Figure 75B). De même, la faible activité nitroréductase du triple mutant était identique à celle du double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$ . Étonnement, le plasmide hybride pACYC177 contenant le gène *azoR* (*pazoR*) a été capable de restaurer une activité nitroréductase similaire à la souche parentale ECOK12 chez le triple mutant délété des 3 gènes *azoR*, *nfsA* et *nfsB* mais aussi chez le double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  (Figure 75C et D). La restauration de l'activité nitroréductase par le gène *azoR* a été confirmée en testant la complémentation des mutants  $ECO\Delta azoR-nfsA-nfsB$  et  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  par le plasmide vide pACYC177. En effet, le plasmide vide pACYC177 n'a eu aucune incidence sur l'activité

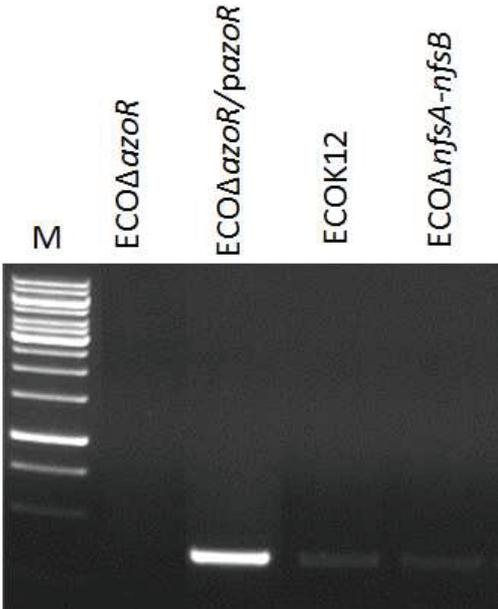


Figure 76 : Analyse sur gel d'agarose 1,2% des fragments RT-PCR sur le gène *azoR*.

nitroréductase cellulaire des mutants.

#### VI.5.2.3. Surexpression de *azoR* sur le plasmide pACYC177

La complémentation du double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  par *pazoR* est surprenante. On suppose que la régulation du gène *azoR* en conditions natives ne permet pas de compléter naturellement la perte des 2 gènes *nfsA* et *nfsB*. Une vérification de la différence d'expression du gène *azoR* en conditions natives et sur le plasmide *pazoR* a été faite par RT-PCR. Les résultats ont indiqué que le gène *azoR* en conditions natives était faiblement exprimé alors que, dans les souches  $ECO\Delta azoR/pazoR$  et  $ECO\Delta nfsA-nfsB/pazoR$ , il était fortement exprimé (Figure 76). Cette forte expression correspond certainement au nombre de copies du plasmide (environ 15 copies) car la séquence promoteur en amont du gène *azoR* est la séquence native présente chez *E. coli* et conservée lors du clonage.

#### VI.5.3. Conclusion

Les mutants construits lors de cette étude ont permis d'avoir des informations sur le rôle des protéines codées par les gènes *azoR*, *nfsA* et *nfsB* dans les activités azoréductase et nitroréductase cellulaires. Les voies impliquées dans l'azoréduction et la nitroréduction sont différentes en fonction des conditions d'oxygénation. Les conditions statiques peuvent être assimilées à des conditions de microaérophilie car l'apport d'oxygène consommé au cours de la croissance est faible, du fait de la surface d'échange avec l'air ambiant limitée. A l'inverse, les conditions d'agitation peuvent être assimilées à des conditions optimales d'aérobie.

La protéine AzoR est impliquée dans l'azoréduction en microaérophilie, mais n'est pas indispensable puisqu'une voie indépendante de cette protéine prend rapidement le relais. A l'opposé, en aérobie, la voie d'azoréduction active est dépendante d'AzoR.

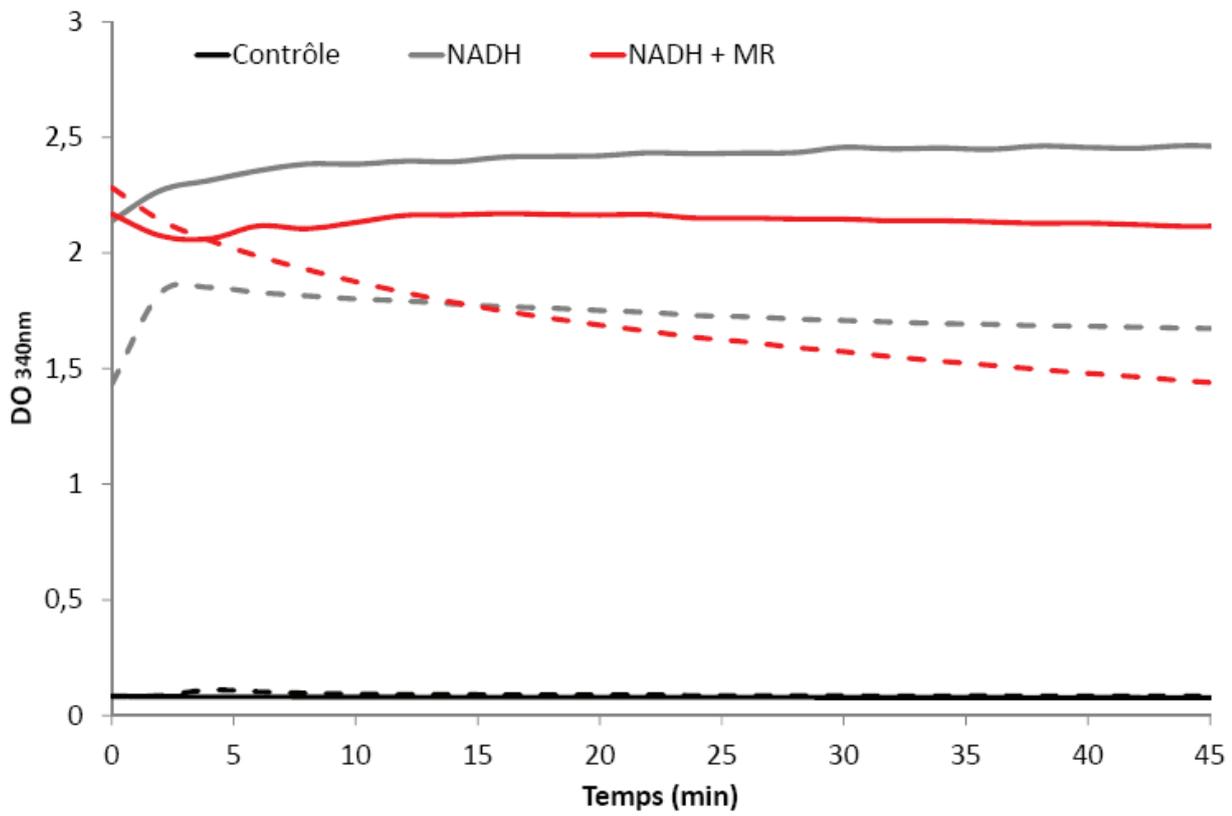
Concernant l'activité nitroréductase chez *E. coli*, la voie impliquée en microaérophilie n'est dépendante d'aucune des trois enzymes AzoR, NfsA ou NfsB. Aucune de ces 3 protéines n'est, en effet, indispensable pour réduire le substrat « nitro » 7NCCA dans ces conditions. Par contre, en aérobie, le couple NfsA-NfsB devient essentiel pour cette activité enzymatique et apporte environ 70% de l'activité nitroréductase à la cellule d'*E. coli* pour la dégradation du 7NCCA lors de nos expériences. Mais au sein de ce couple, il n'y a pas de protéine ayant une activité *in vivo* plus importante que l'autre. En effet, la présence d'une seule de ces 2 protéines permet de restaurer une activité nitroréductase identique à celle de



la souche parentale. Enfin, l'enzyme AzoR est capable de compenser la perte de NfsA et NfsB lorsque le gène *azoR* est apporté par le plasmide hybride *pazoR*. Par contre cette enzyme est incapable de compenser la perte de NfsA et NfsB en conditions natives puisque le double mutant  $ECO\Delta nfsA-nfsB$  est déficient pour l'activité nitroréductase. L'expérience de RT-PCR sur le gène *azoR* a permis de mettre en évidence qu'une surexpression du gène apporté par le plasmide hybride pACYC177 permettait de compenser la perte de NfsA et NfsB. Cette observation confirme donc l'activité nitroréductase de l'enzyme AzoR.



# DISCUSSION



**Figure 77 :Suivi de l'oxydation du NADH en présence et en absence de EF0404 purifiée en conditions natives.**

100 µL de milieu réactionnel contient du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7, 0,5 mM NADH avec ou sans 100 µM de MR. Le contrôle contient uniquement du tampon phosphate de sodium. Les courbes en trait plein représentent les cas sans enzyme, les courbes en pointillés, les cas avec 0,5 µg d'enzyme.

## I. L'activité azoréductase

### I.1. Les moyens de détection de l'activité azoréductase

#### I.1.1. L'absorbance

Jusqu'alors, les études d'enzymologie sur les substrats colorés « azo » étaient basés sur la décoloration des substrats (26,49,54) ou sur le suivi de la consommation du NAD(P)H (101). Techniquement, suivre la disparition d'un substrat est beaucoup moins sensible que suivre l'apparition d'un produit. En effet, le début de la réaction peut être masquée par un excès de substrat au départ, saturant alors la coloration. Par ailleurs, le suivi de la consommation du cofacteur NAD(P)H n'est pas un bon indicateur car sans substrat, le niveau d'absorbance diminue par rapport au témoin sans enzyme pouvant indiquer une consommation du cofacteur NAD(P)H indépendamment de la présence du substrat (Figure 77). De plus, les expériences d'UPLC ont révélé que le NADH pouvait être oxydé par le FMN seul. Le taux de cofacteur NAD(P)H oxydé ne reflète donc pas strictement la quantité de substrat dégradée. Ces observations laissent supposer que le suivi d'oxydation du cofacteur NAD(P)H à 340nm n'est pas utilisable pour suivre la réduction des substrats testés.

#### I.1.2. La fluorescence

Des substrats « azo » libèrent des produits incolores mais également fluorescents lors de leur réduction (exemple avec le MR, la Tar ou encore l'OrII étudiés ici). La fluorescence est généralement plus sensible que l'absorbance. Dans un milieu riche, coloré tel que le TSB, la décoloration d'un substrat peut être difficile à voir avec des interférences dans l'absorbance, contrairement à la fluorescence.

Toutefois, la fluorescence peut présenter des inconvénients si d'autres composés du milieu réactionnel absorbent à la longueur d'onde d'excitation ou d'émission utilisée. En effet, lors de notre étude, des problèmes de « quenching » ont été mis en évidence. La longueur d'onde maximale d'absorbance du MR se situe à 435 nm d'après le spectre d'absorbance de la molécule obtenu (annexe page 308). La longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence se trouve à 395 nm pour le produit de réduction du MR. En regardant le spectre d'absorbance du MR, on constate que ce substrat absorbe aussi à 395 nm, même si ce n'est pas son maximum d'absorption. De ce fait, s'il reste du MR dans le milieu lorsque le produit de réduction du MR (l'acide anthranilique) est excité à 250 nm et

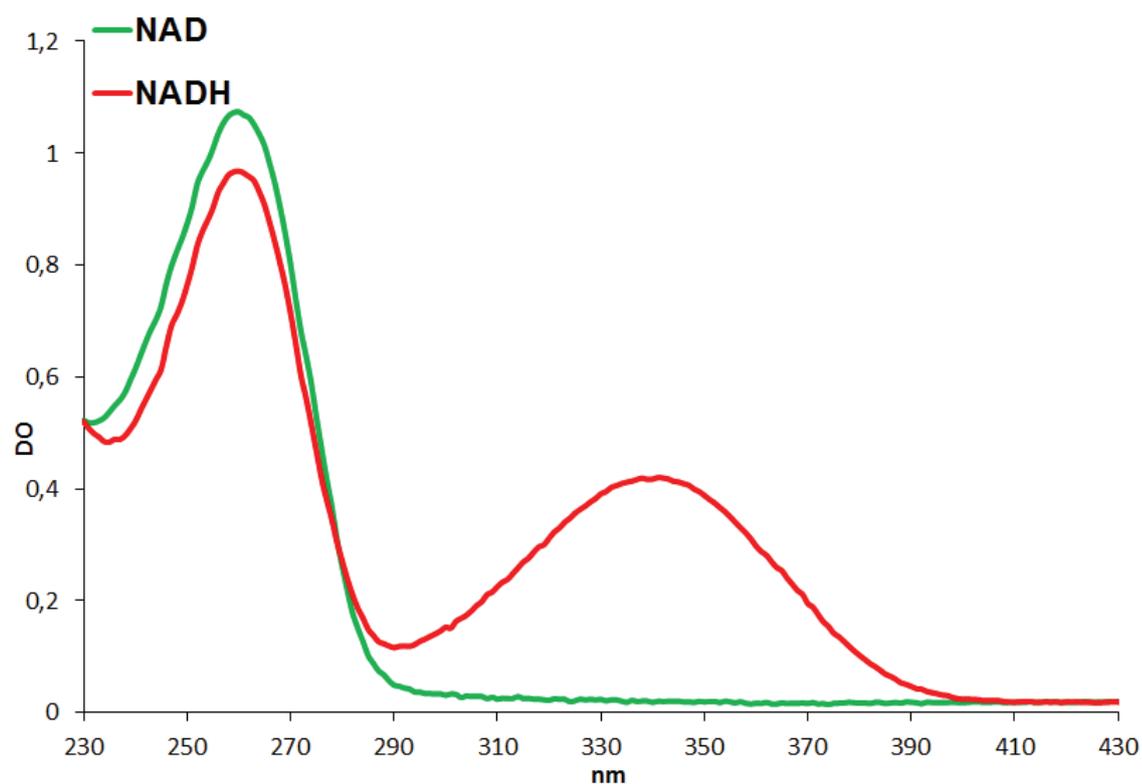


Figure 78 : spectre d'absorbance du NADH et du NAD.

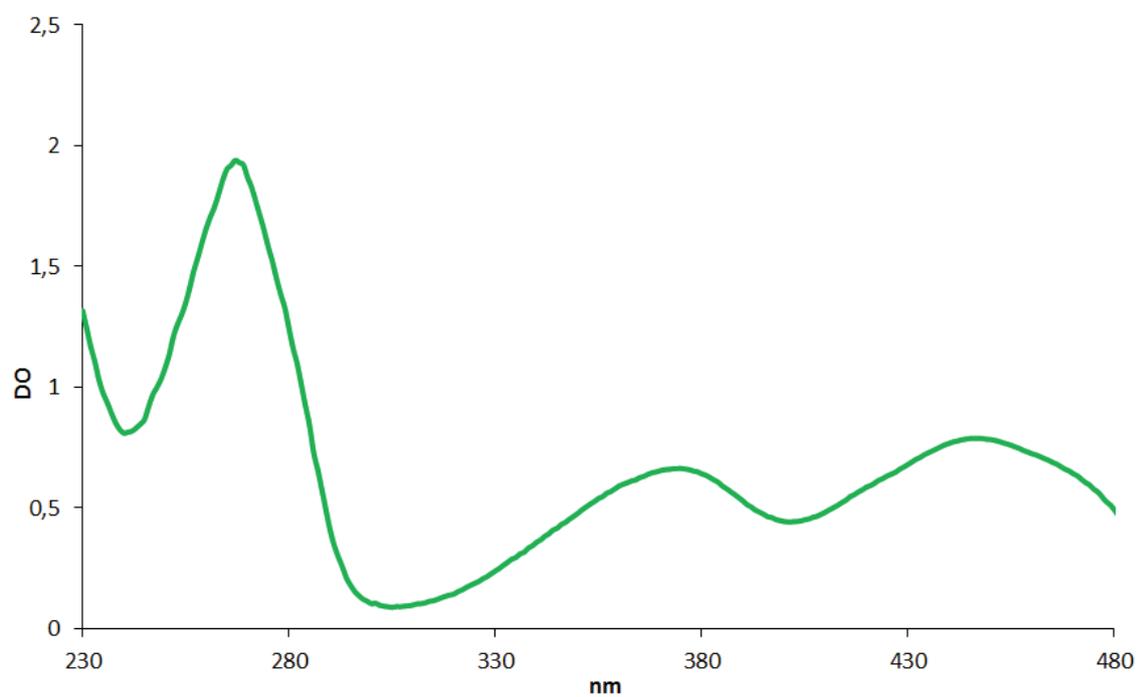


Figure 79 : Spectre d'absorbance du FMN.

que l'émission est lue à 395 nm, une partie de l'émission de fluorescence à 395 nm est liée au produit de dégradation du MR mais une partie est également absorbée par le substrat MR restant dans le milieu. C'est pourquoi, une gamme mimant l'effet du « quenching » du MR a été indispensable pour évaluer la quantité d'acide anthranilique présent dans le milieu réactionnel.

La longueur d'onde maximale d'absorption du cofacteur NADH est 340 nm (Figure 78). Le produit de réduction du 7NCCA est fluorescent aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm (annexe page 308). En regardant de plus près le spectre d'absorbance du NADH, on constate que cette molécule est aussi capable d'absorber la lumière à 365 nm. De ce fait, s'il reste du NADH non transformé en NAD dans le milieu, lorsque le produit de réduction du 7NCCA est excité à 365 nm une partie de cette excitation est absorbée par le reste de NADH. De plus, le NAD(P)H est fluorescent aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 275 nm/448 et 350 nm/445 nm. Une partie de l'émission mesurée à 440 nm pour la détection du produit de réduction du 7NCCA est donc due au reste de NAD(P)H présent dans le milieu (169).

Le coenzyme FMN pose aussi des problèmes de « quenching » puisque cette molécule absorbe à toutes les longueurs d'ondes utilisées (435 nm, 250 nm, 395 nm, 365 nm et 440 nm) pour le suivi de la réduction des substrats testés (Figure 79). Cependant, ce cofacteur a toujours été utilisé en faible concentration (5  $\mu\text{M}$ ) par rapport aux concentrations de substrat (100  $\mu\text{M}$ ) et de cofacteurs NAD(P)H (500  $\mu\text{M}$ ) utilisées ce qui a limité l'impact de ce phénomène.

Un autre inconvénient de la fluorescence concerne la difficulté de déterminer des constantes enzymatiques du fait de l'absence de linéarité entre les valeurs de fluorescence et les concentrations en produit.

Lors de cette étude, tous nos travaux ont permis d'aborder les limites de cette technique de suivi de réaction en fluorescence. En effet, la fluorescence ne peut être utilisée que dans des conditions suivantes :

- Le milieu réactionnel ne doit pas contenir, ou alors en faibles quantités ou en quantités constantes, des composés absorbants aux longueurs d'ondes d'excitation ou d'émission de la molécule fluorescente pour éviter de masquer le signal de la molécule suivie. Ceci peut être facilement vérifié en faisant un spectre d'absorbance et en mesurant la fluorescence aux longueurs d'ondes voulues du



milieu réactionnel sans substrat.

- La quantification d'un produit fluorescent doit se faire dans une gamme de concentrations définie dans laquelle la linéarité entre les valeurs de fluorescence et les quantités de produit fluorescent a été démontrée.

## **I.2. Activité azoréductase des enzymes pures.**

### **I.2.1. Analyse qualitative**

L'activité azoréductase est largement répandue au sein de la population microbienne. Toutefois, seules quelques enzymes spécifiques possédant cette activité enzymatique chez plusieurs espèces ont été décrites (Tableau 3). Lors de ce travail de thèse, 3 enzymes ont été caractérisées comme étant des azoréductases : AzoR chez *E. coli*, AzoA et EF0404 chez *E. faecalis*. L'activité azoréductase des enzymes AzoR et AzoA a déjà été décrites dans la littérature (32,132). Par contre, l'enzyme EF0404 de *E. faecalis* n'avait jamais été caractérisée biochimiquement auparavant. L'activité azoréductase de EF0404 est surprenante car, phylogénétiquement, cette enzyme semble plus éloignée des azoréductases AzoA et AzoR que des nitroréductases. L'intérêt d'avoir inclu les enzymes AzoA et AzoR dans notre étude est d'avoir un point de comparaison entre les enzymes jamais décrites et celles déjà décrites, notamment vis-à-vis des dépendances en cofacteur. De plus, la stricte dépendance au FMN n'avait pas forcément été étudiée dans les travaux antérieurs.

*E. faecalis* est une espèce ayant une forte activité azoréductase. Les souches testées appartenant à cette espèce se sont révélées capable de réduire tous les composés « azo » testés lors de notre étude de répartition des activités réductases. Le fait de trouver deux enzymes ayant une activité azoréductase, contrairement à *E. coli* qui semble n'en avoir qu'une, peut être une explication de la forte activité azoréductase de *E. faecalis*.

Une étude a montré que la surexpression de la protéine AzoA chez *E. coli* permettait une augmentation du taux de réduction de l'Orange II. Les concentrations de substrats « azo » utilisées variaient de 0,2 mM à 2 mM avec 200 mg.L<sup>-1</sup> de cellules et la réaction se déroulait à 37°C (53). Par ailleurs, une activité spécifique de 1,92 U.mg<sup>-1</sup> de protéines ( U représente la quantité d'enzyme nécessaire pour dégrader 1 µM de substrat par minutes) a été établie pour l'enzyme AzoA de *E. faecalis* à 23°C sur ce même substrat Orange II à 25 µM avec 0,1 mM de NADH et 10 µM de FMN (32). L'activité spécifique déterminée pour le MR



était de  $58,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , donc bien supérieure à celle obtenue pour l'Orange II. Néanmoins, au cours de notre étude les activités azoréductases des enzymes pures mises en évidence n'ont pu l'être qu'avec le MR comme substrat. Aucune activité azoréductase n'a pu être montrée avec ces enzymes pures sur d'autres substrats « azo » connus tel que l'Orange II. Lors des tests de réduction de ces substrats par des cellules bactériennes en croissance, une dégradation de ces molécules « azo » par des souches des espèces *E. coli* et *E. faecalis* avait été mise en évidence. A première vue, la différence de réduction des substrats entre les cellules bactériennes en croissance et les enzymes pures peut être due à de mauvaises conditions de milieu réactionnel (cofacteurs température, pH...). Par rapport à l'article de Chen *et al* (32), la principale différence entre nos conditions respectives est la température (35°C versus 23°C). Cette différence de température pourra être étudiée pour vérifier l'impact de ce paramètre sur la réduction de ce substrat par l'enzyme AzoA. En parallèle, la réduction du substrat Orange II ainsi que d'autres substrats « azo » pourra être testée avec la souche *E. coli* surproduisant l'enzyme AzoA (ECO-pazoA95) avec et sans induction de l'expression du gène *azoA* pour comparer avec les résultats de l'équipe de Feng *et al* (53) avant de pouvoir définitivement conclure sur l'absence de dégradation des composés « azo » autres que MR.

La capacité de réduction des cellules bactériennes en croissance peut également être due à d'autres enzymes que celles purifiées lors de cette étude. En effet, deux azoréductases avaient été purifiées chez *E. coli* par l'équipe de Gosh *et al*, dont une avait une bonne activité azoréductase sur les substrats Tar et OrII (azoréductase I) et l'autre avait une très faible activité sur ces deux substrats (azoréductase II) (58). L'enzyme AzoR pourrait donc correspondre à l'azoréductase II décrite dans cet article. Cependant, concernant l'enzyme azoréductase II, aucune données dans la littérature ou dans notre étude ne permet de confirmer la présence d'une autre azoréductase. Les voies de réduction des composés « azo » peuvent donc être différentes en fonction des substrat « azo » utilisés. Nous pouvons imaginer que certains substrats ne sont pris en charge que par la voie supposée aspécifique privilégiée en anaérobie, à savoir la voie métabolique d'azoréduction impliquant les composés quinones et les quinones réductases.

### 1.2.2. Analyse quantitative

La quantification de l'activité azoréductase des enzymes AzoR, AzoA et EF0404 a été



**Figure 80 : Réaction de réduction du Methyl red (MR).**

La réduction partielle du MR donne une forme diazène et la réduction totale du substrat aboutit à la libération des produits N,N-dimethyl-para-phénylène diamine et acide anthranilique (31.187).

difficile. Selon les valeurs obtenues en absorbance (435 nm et 340 nm), l'enzyme Azor semble plus affine pour le MR que l'enzyme EF0404. De même, la valeur de  $v_{\max}$  obtenue pour l'enzyme Azor est plus élevée que celle obtenue pour l'enzyme EF0404 vis-à-vis du MR. Ces données permettent de faire la même conclusion que celle faite avec l'analyse qualitative, à savoir, l'enzyme Azor a une meilleure activité (plus rapide) sur le substrat MR que l'enzyme EF0404. Cependant, les données obtenues en fluorescence inverse ce classement des enzymes vis-à-vis de leur affinité pour le MR. En effet, les valeurs obtenues en fluorescence indiquent que l'enzyme EF0404 est plus affine pour le MR que l'enzyme Azor. Par contre, l'ordre des  $v_{\max}$  ne change pas. Les mêmes problèmes d'ordre d'affinité et de  $v_{\max}$  en fonction des méthodes utilisées (absorbance ou fluorescence) ont été rencontrés pour les constantes enzymatiques déterminées par rapport aux cofacteurs NAD(P)H.

Ces différences de résultats obtenus entre les méthodes en absorbance et en fluorescence posent un problème pour valider ces méthodes. En mettant de côté les données d'absorbance à 340 nm, les  $K_m$  obtenus en absorbance à 435 nm et en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 250 nm/395 nm devraient être proches puisque dans un cas la disparition du substrat est suivie, et dans l'autre cas, c'est l'apparition d'un produit de réduction du substrat qui est suivie. Toutefois, ce qui n'est pas pris en compte dans les données de fluorescence, c'est la réduction partielle possible du MR en diazène (HN-NH) (Figure 80). En supposant que la forme diazène est incolore et ne fluoresce pas aux longueurs d'ondes d'excitation/émission utilisées, cette réduction partielle pourrait causer la décoloration du substrat, et donc une consommation du substrat pourrait être visualisée en absorbance à 435 nm. À la différence, le signal fluorescent, étant dû à l'apparition de l'acide anthranilique, un produit de réduction totale du MR, n'indiquerait pas cette réduction partielle. Ainsi, les données d'absorbance à 435 nm prendraient en compte la dégradation du substrat MR sous toutes ses formes contrairement aux données de fluorescence qui ne prennent en compte que la réduction totale du MR. Cette réduction partielle pourrait expliquer les différences de  $K_m$  entre les 2 méthodes. Dans le cas de mesure d'absorbance à 435 nm, le  $K_m$  calculé correspondrait à l'affinité de l'enzyme pour le substrat MR, alors que dans le cas des mesures de fluorescence, le  $K_m$  calculé correspondrait à l'affinité de l'enzyme pour la forme intermédiaire diazène. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait être capable de doser la forme diazène du MR dans le milieu réactionnel au cours de l'incubation. Nous pouvons imaginer un suivi de la réaction en HPLC



couplée à de la spectrométrie de masse. Mais la vitesse de réaction rapide associée au risque d'instabilité de la forme diazène rend complexe la mise au point de son dosage.

La congélation permet la conservation des enzymes, cependant, leur activité semble diminuer au fur et à mesure du temps de conservation à -80°C. C'est pourquoi, il est difficile de reproduire les constantes enzymatiques d'une expérience à l'autre.

### **I.3. Les voies métaboliques d'azoréduction chez *E. coli***

Dans la littérature, 2 voies métaboliques sont suggérées pour l'azoréduction : une voie spécifique en condition d'aérobie et une voie aspécifique en condition d'anaérobie (85,94). Cependant, ces voies n'ont jamais été clairement démontrées. Dans cette étude, les conditions d'anaérobie ont été assimilées à une incubation sans agitation en partant du principe que l'agitation permet une bonne dissolution du dioxygène dans le milieu liquide et donc l'absence d'agitation permet d'avoir un milieu liquide rapidement épuisé en dioxygène (187). Les résultats obtenus lors de ces travaux confirment l'existence de 2 voies métaboliques d'azoréduction dépendantes de la concentration en dioxygène dans le milieu chez *E. coli*. En présence d'une bonne oxygénation, la présence de la protéine AzoR est indispensable pour réduire le substrat MR, alors qu'en absence de dioxygène, AzoR participe à cette dégradation sans que son activité soit indispensable.

La voie aspécifique suggérée en condition d'anaérobie impliquerait une étape primaire de réduction des composés quinones présents dans le milieu par des quinone réductases (163). Afin de montrer le rôle de ces quinone réductases, il serait intéressant de déléter successivement les gènes connus codant les quinone réductases chez *E. coli* afin d'étudier l'impact sur l'activité azoréductase de la cellule en condition anaérobie. Ces délétions devraient être réalisées dans un contexte génétique *azoR*<sup>+</sup> mais surtout *azoR*<sup>-</sup>. La technique de Datsenko *et al.* (44) utilisée pour construire les mutants dans cette étude pourrait être à nouveau utilisée pour construire ces multiples mutants délété du gène *azoR* et du ou des gènes codant des quinone réductases (par exemple les gènes *mdaB* (17) et *ChrR* (63). Toutefois, il se peut que des difficultés soient rencontrées selon la proximité des gènes à déléter sur le chromosome. En effet, au moment de l'excision de la cassette de résistance à l'antibiotique (dans notre étude il s'agissait du chloramphénicol) lors de la construction d'un mutant multiple, si une cicatrice FRT est trop proche de la zone de délétion d'intérêt il se peut qu'il y ait recombinaison entre cette cicatrice FRT et la séquence FRT encadrant la



cassette de résistance à l'antibiotique. Dans ces cas là, il sera peut être préférable de laisser la cassette de résistance à l'antibiotique sur le chromosome bactérien. Dans ces conditions, la délétion d'un autre gène à partir de ce mutant portant une cassette de résistance à un antibiotique demandera d'utiliser un autre marqueur de sélection pour permettre la sélection des nouveaux clones recombinants.

En parallèle, il peut être intéressant d'évaluer l'activité quinone réductase des enzymes purifiées lors de cette étude et d'étudier l'impact des quinones oxydées ou réduites sur la réduction des composés « azo ».

## II. L'activité nitroréductase

### II.1. L'activité nitroréductase des enzymes pures

L'activité nitroréductase est également une activité enzymatique largement répandue au sein de la population microbienne (Tableau 5). Contrairement à l'activité azoréductase, un grand nombre d'enzymes réductases sont capables de nitroréduction. Lors d'une étude menée par Prosser et ses collaborateurs, chez *E. coli*, 11 protéines ont été sélectionnées pour leur activité nitroréductase potentielle (146). Notre étude confirme la grande étendue de l'activité nitroréductase au sein des microorganismes puisque toutes les enzymes testées, bien que leur activité nitroréductase n'ait pas été toujours établie auparavant, sont capables de réduire au moins un composé « nitro » : le 7NCCA.

D'une manière qualitative, l'enzyme NfsA semble être l'enzyme capable de réduire la plus grande quantité de substrat 7NCCA en 10h par rapport aux enzymes NfsB et AzoR chez *E. coli*. Chez *E. faecalis*, EF1181 semble être l'enzyme capable de réduire la plus grande quantité de substrat en 10h par rapport aux enzymes EF0648, EF0655, EF0404 et AzoA. Par contre, la quantification de l'activité nitroréductase de chacune de ces enzymes n'a pas pu être menée jusqu'au bout et il est difficile de conclure sur les données obtenues actuellement. En effet, le manque de reproductibilité pose vraiment un problème pour déterminer précisément les constantes enzymatiques. De plus, la méconnaissance des produits de réduction du substrat 7NCCA est un problème pour pouvoir établir des gammes étalons en relation avec l'intensité de fluorescence et la concentration de substrat comme il a pu être fait pour le substrat « azo » MR.

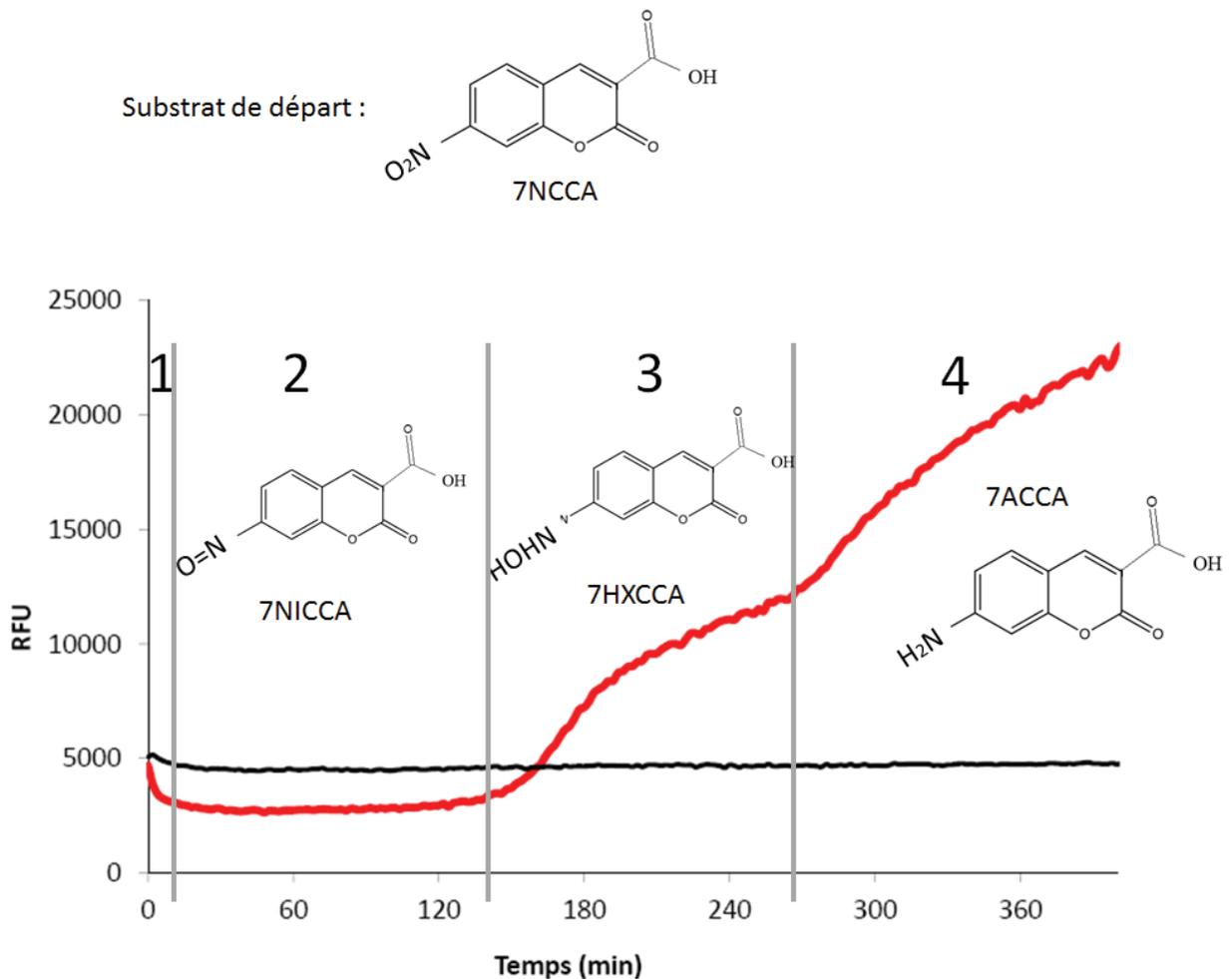


Figure 81 : Hypothèse de réduction enzymatique du 7NCCA (acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique) en 7ACCA (acide 7-aminocoumarine-3-carboxylique).

La réaction de réduction passerait par la formation de différents intermédiaires dont les caractéristiques optiques sont différentes : le composé acide 7-nitrosocoumarine-3-carboxylique (7NICCA) correspondrait à la phase 2 de la courbe, l'acide 7-hydroxylaminocoumarine-3-carboxylique (7HXCCA) correspondrait à la phase 3 et la phase 4 correspondrait au produit final 7ACCA. Cette courbe et ces phases sont tirées de la courbe en fluorescence aux longueurs d'ondes d'excitation/émission de 365 nm/440 nm de réduction du 7NCCA (100  $\mu$ M) par l'enzyme EF0404 (0,5  $\mu$ g) avec NADH 0,5 mM de la Figure 53.

## II.2. La réaction de réduction du 7NCCA et constantes enzymatiques

Le produit fluorescent assimilé au produit final de la réaction enzymatique de réduction du 7NCCA met du temps à apparaître. La réduction d'un composé « nitro » passe par différents intermédiaires. Il est possible que la phase d'absence de fluorescence soit due à un intermédiaire tel que la forme nitroso qui est potentiellement non fluorescente. La forme nitroso n'est généralement pas observée par les expérimentateurs (161). Cependant, une étude a montré que les nitroréductases avaient une affinité plus grande pour les substrats de type nitroso que pour les formes « nitro » (148), ce qui pourrait expliquer pourquoi cette forme n'est pas observée durant la dégradation des composés « nitro » car transformée en hydroxylamine dès son apparition. Les phases d'absence d'augmentation de fluorescence varient en fonction des enzymes. Si on considère que la forme fluorescente n'apparaît qu'après la formation de la forme non fluorescente, l'affinité de l'enzyme pour cette forme non fluorescente varierait en fonction des enzymes.

La réduction du substrat 7NCCA en plusieurs phases pose également un problème pour déterminer les constantes enzymatiques. La méthode de calcul des constantes enzymatiques utilisée est valable pour les enzymes dites de type Mickaëliennes. Les enzymes Mickaëliennes ont une activité enzymatique pouvant être modélisée par une courbe hyperbolique. Cette courbe hyperbolique n'est pas précisément retrouvée dans la réaction de réduction enzymatique du 7NCCA suivie en fluorescence. Les constantes enzymatiques déterminées à partir des données de fluorescence aux longueurs d'ondes maximales d'excitation/émission de 365 nm/440 nm ont été déterminées sur la première phase d'augmentation de fluorescence, considérée comme hyperbolique (phase 3 de la Figure 57). La fluorescence observée durant cette phase est potentiellement due à un second produit intermédiaire de réduction entre la forme « nitro » et amino du substrat. Les constantes enzymatiques déterminées à partir de cette phase sont donc liées à la réaction de transformation de l'intermédiaire de la phase 2 (nitroso ?) à l'intermédiaire de la phase 3 (hydroxylamino ?) (Figure 81). Les  $K_m$  correspondent donc à l'affinité de l'enzyme pour l'intermédiaire de la phase 2 et non pour le substrat 7NCCA.

Les tentatives de détermination des constantes enzymatiques du couple enzyme/7NCCA à partir du début de la réaction (phase 1 de diminution de fluorescence) n'ont pas abouti. A ce stade, nous ne connaissons pas le produit intermédiaire et ne pouvons



donc pas conclure sur ce point. En effet, nos premières approches pour caractériser ce produit n'ont pas abouti car nous ne disposons pas d'une chaîne LC-MS pour pouvoir séparer et caractériser les différents produits issus de la réaction. Par ailleurs, notre méthode pour stopper la réaction à différents temps d'incubation ne nous permettait pas de récupérer la totalité des produits formés lors de la réaction de réduction du substrat 7NCCA. En effet, la perte d'intensité de fluorescence de l'échantillon passé sur la colonne Ni-NTA pour enlever l'enzyme nous laisse supposer qu'une partie du produit fluorescent reste liée à l'enzyme. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser un substrat compétiteur du produit formé vis-à-vis de l'enzyme pour saturer l'enzyme en compétiteur et récupérer tout les produits de réduction du substrat 7NCCA. Pour cela, il faudrait identifier un substrat pour lequel l'enzyme possède une plus forte affinité que pour le produit de réduction du 7NCCA. Il est possible d'imaginer utiliser un autre substrat « nitro » par exemple, comme le nitrofurazone ou bien des composés tel que le benzamide, le phénole et la caféine qui sont des compétiteurs du cofacteur NADH mais aussi du substrat 2,4-dinitrotoluène pour la nitroréductase d'*Enterobacter cloacae* (91).

Les différents intermédiaires correspondraient, en théorie, à différents niveaux de réduction de la fonction NO<sub>2</sub> du 7NCCA. Les différences entre ces composés correspondent à des compositions en oxygène et en hydrogène différentes. Les différences de masse entre deux intermédiaires est donc faible. De ce fait, l'analyse en spectrométrie de masse devra se faire selon une méthode ayant une résolution permettant de distinguer ces différents composés. Une analyse par RMN pourraient être également envisagée pour identifier l'emplacement des protons sur la molécule et avoir une idée précise de la structure des composés.

Par ailleurs, si le produit intermédiaire non fluorescent est identifié, il serait intéressant de savoir si cette forme de substrat peut être synthétisée et suffisamment stable pour être utilisée comme substrat de départ afin de simplifier la réaction testée en passant de 3 étapes à 2 étapes voire à 1 seule. Cela pourrait aussi permettre de réduire le temps nécessaire à une réaction positive en terme d'apparition de produit fluorescent.

### **II.3. Les voies métaboliques de la nitroréduction chez *E. coli***

#### **II.3.1. La sensibilité à l'oxygène**

La littérature envisage 2 types d'enzymes nitroréductases (161). Les enzymes



sensibles à l'oxygène et les enzymes insensibles à l'oxygène. Jusqu'à ce jour, aucune enzyme sensible à l'oxygène n'a été décrite. Malgré la description de la réaction sensible au dioxygène, la question de l'existence de ces enzymes dans la nature peut se poser. La sensibilité à l'oxygène des enzymes purifiées au cours de notre étude n'a pas pu être testée directement en raison d'absence de dispositif permettant de travailler en anaérobiose stricte. Cependant, le fait d'avoir pu identifier une activité enzymatique pour chaque enzyme purifiée tend à montrer que ces enzymes ne sont pas sensibles à l'oxygène. Cela reste à vérifier en testant les activités réductases des enzymes purifiées en condition d'aérobiose stricte en favorisant l'oxygénation du milieu réactionnel par agitation.

Les travaux sur les mutants ont donné des résultats intéressants puisqu'en condition d'aérobiose optimale, la délétion des 2 gènes codant NfsA et NfsB induit une perte de 70% de l'activité nitroréductase de la cellule alors qu'aucune perte d'activité n'a été observée dans les conditions statiques, c'est-à-dire avec un faible taux d'oxygénation. Dans ces conditions, d'autres enzymes doivent pouvoir prendre le relais en cas d'absence ou d'inactivation de NfsA et NfsB, rôle qu'elles ne peuvent pas jouer en conditions d'aérobiose si elles sont sensibles à l'oxygène. Une étude a montré l'existence de trois activités nitroréductase en conditions d'aérobiose (21). Une activité était liée à l'enzyme NfsA, une autre à l'enzyme NfsB et une troisième attribuée à une protéine NfsC. Aucun gène n'a pu être identifié codant pour NfsC (21). Les 30% d'activité nitroréductase résiduelles dans les mutants délétés des gènes *nfsA* et *nfsB* pourraient être liées à cette activité NfsC représentée par une ou plusieurs enzymes insensibles au dioxygène. A ce stade, nous ne pouvons conclure sur le rôle de l'oxygène dans ces voies alternatives de nitroréduction. En effet, ces voies pourraient faire intervenir aussi bien des enzymes dont l'activité nitroréductase serait sensible à l'oxygène, mais cela pourrait être aussi le résultat d'une régulation génétique. Les gènes de ces voies alternatives ne seraient pas exprimés en présence d'oxygène, nous pourrions alors parler de répression par l'oxygène. Une mutagenèse aléatoire pourrait alors être proposée pour tenter d'identifier les gènes codants ces enzymes responsables de la nitroréduction en conditions d'anaérobiose. Par exemple, il serait possible de mettre au point un test sur milieu gélosé utilisant le substrat 1-nitropyrene qui est un composé « nitro » jaune sous sa forme oxydée et incolore sous sa forme réduite (156). D'autres substrats de nitroréductase sont disponibles chez bioMérieux et pourraient également être utilisés dans ce cadre (substrat de types Nitrophenyl-benzothiazole (52) et Nitrostyryl-quinolinium/lepidinium (51)). Les



souches mutantes obtenues par mutagénèse aléatoire (par transposition par exemple) à partir du triple mutant *ECOΔazoR-nfsA-nfsB* incapables de dégrader le 1-nitropyrrène en conditions anaérobies pourraient être mises en évidence. A partir de ces souches, la région mutée pourrait être identifiée et conduire à l'identification d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la nitroréduction. Les protéines codées par ces gènes pourront alors être étudiées pour caractériser leur(s) activité(s) enzymatique(s), leur sensibilité à l'oxygène, leur conditions d'expression chez *E. coli* afin de mieux caractériser ces voies alternatives.

### II.3.2. Rôle de NfsA et NfsB

Au cours de ces travaux de thèse, 2 voies métaboliques dépendantes des concentrations en oxygène ont été identifiées. Les enzymes NfsA et NfsB chez *E. coli* sont importantes dans la voie en aérobie. Pour autant, les 2 enzymes prises séparément ne sont pas nécessaires à l'activité nitroréductase cellulaire. La présence d'un seul des 2 gènes suffit à compléter la perte d'activité subie. Une seule des 2 protéines est donc suffisante pour prendre en charge l'activité nitroréductase cellulaire majeure. Il est donc difficile de juger qui de NfsA et NfsB est la nitroréductase majeure pour la cellule. Ces observations remettent en cause la qualification de NfsA comme nitroréductase majeure et NfsB de nitroréductase mineure (197,199-201). La notion de majeure et mineure a été basée sur les constantes enzymatiques des protéines. Les difficultés rencontrées pour établir les constantes enzymatiques des enzymes étudiées lors de ces travaux ne nous permettent pas de comparer nos valeurs avec celles obtenues dans la littérature. Toutefois, d'un point de vue cellulaire, NfsA ne semble pas plus importante que NfsB. Nous pouvons donc conclure que ce sont ces 2 protéines qui représentent l'activité nitroréductase majeure chez *E. coli*. Ainsi, l'activité nitroréductase mineure est certainement détenue par les nombreuses protéines potentiellement capables d'avoir une activité nitroréductase aussi minime soit-elle (146).

### II.3.3. Rôle de AzoR

AzoR est une enzyme décrite pour son activité azoréductase. Lors de cette étude, une activité nitroréductase a pu être mise en évidence pour cette enzyme. La délétion du gène *azoR* codant cette protéine n'a pas d'impact sur l'activité nitroréductase des cellules. Cependant, le double mutant délété de *nfsA* et *nfsB* a pu être complémenté par *azoR*. La complémentation de ce double mutant par *azoR* est due à une surexpression du gène *azoR* par rapport à son expression dans le contexte sauvage. Ainsi, la quantité d'enzyme AzoR



produite par la souche parentale n'est pas suffisante pour avoir une activité nitroréductase cellulaire permettant de compenser la perte des enzymes NfsA et NfsB. Bien que le promoteur natif permettant l'expression du gène *azoR* soit conservé sur le plasmide hybride *pazoR*, le nombre de copies du plasmide (environ 15) semble suffisant à fournir une quantité d'enzyme AzoR permettant de pallier à la déficience des activités de NfsA et NfsB. Dans ce contexte, l'activité nitroréductase de l'enzyme AzoR n'est plus négligeable et est capable de compenser la perte des 2 nitroréductases principales de la cellule NfsA et NfsB.

### III. La dépendance à la flavine

Toutes les enzymes étudiées au cours de cette thèse sont des flavoprotéines. Cette observation est en accord avec les précédentes études (23,32,199,201). Toutefois, nous avons pu montrer que la flavine est un facteur indispensable à l'activité enzymatique de toutes les enzymes à l'exception de l'enzyme NfsA. La méthode mise au point pour purifier les enzymes sous leur forme apoenzyme, c'est à dire sans leur groupement prosthétique flavinique, a permis d'éliminer environ 90% de la flavine. Ces résultats ont été présentés via un poster en juillet 2012 au congrès enzymes, coenzymes et voies métaboliques des Gordon Research conferences (Waterville Valley Resort, New-Hampshire, Etats-Unis). Une incompréhension sur la volonté d'enlever la flavine d'un échantillon de protéines connues comme flavoprotéines s'est manifestée. En effet, la plupart des études caractérisent les activités réductases de ces enzymes avec des échantillons de protéines sous leur forme holoenzyme directement (186). La forme apoenzyme d'AzoA avait été purifiée lors d'une autre étude en enlevant le groupement flavinique en dénaturant les protéines (5 mg) avec une solution de sulfate d'ammonium puis en passant l'échantillon sur une colonne d'échange d'ion avec un flux de 2 mL.min<sup>-1</sup> suivi d'un gradient de 400 mL de sulfate d'ammonium de 1 M à 0 M toujours avec le même débit (c'est-à-dire que 3 h 30 de gradient sont effectués). Une fois la flavine éluée, l'enzyme sous sa forme apoenzyme était éluée avec 100 mL de tampon phosphate de potassium (32). Une autre technique a permis de purifier la forme apoenzyme de l'enzyme NfsB en dénaturant les protéines (3,2 mg) par une solution de bromure de potassium et en les précipitant par du sulfate d'ammonium puis à reconstituer la forme holoenzyme en incubant la forme apoprotéine avec du FMN à 10°C pendant 69 h (c'est-à-dire presque 3 jours) (201). Cependant, ces techniques sont longues, faites sur de grandes quantités d'enzymes préalablement purifiées et sont rarement utilisées.



La purification en conditions dénaturantes mises au point dans cette étude ne nécessite pas de faire une première purification des protéines d'intérêt en conditions natives. De cette façon l'enzyme est directement purifiée sous sa forme apoenzyme. Cette technique nous a permis de purifier les formes apoenzymes des protéines NfsA, AzoR, EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181 dont cette forme n'avait jamais été purifiée avant. Par ailleurs, aucune méthode n'avait été utilisée pour évaluer la quantité de FMN restant dans les échantillons.

Notre étude montre également qu'il semblerait y avoir des différences d'affinité pour la flavine en fonction de l'enzyme. En effet, malgré la perte de 92% de flavine par rapport à la protéine NfsA purifiée en conditions natives, l'apoenzyme NfsA a toujours une activité nitroréductase sans ajout de flavine dans le milieu réactionnel. Il est donc difficile de conclure précisément sur sa dépendance à la flavine. Nous pouvons émettre l'hypothèse du besoin de flavine en faible quantité pour l'activité enzymatique nitroréductase de l'enzyme NfsA.

#### **IV. La classification des enzymes**

Les études enzymatiques permettent de regrouper au sein d'une même classe les protéines ayant la même activité enzymatique avec les mêmes cofacteurs. Dans le cas des activités réductases, le type de donneur d'électron tels que NADH ou NADPH est important. Il est possible de retrouver une classification en fonction du cofacteur pour différentes familles de réductases dont les azoréductases (18,19,31,31,32,59,132,186) et les nitroréductases (161). Au cours de l'étude de l'activité nitroréductase, il a été mis en évidence des enzymes pouvant utiliser le NADH et NADPH de manière équivalente (NfsB, EF0648, EF0655), des enzymes pouvant utiliser les 2 cofacteurs mais avec une préférence pour le NADPH, vu les constantes d'affinité et les vitesses de réaction observées de manière qualitative (NfsA, EF0404, AzoR). Mais il a également été mis en évidence une enzyme ne pouvant utiliser que le cofacteur NADPH (EF1181). Dans ce cas, la classification des enzymes ayant simplement une préférence pour le NADPH devient complexe car il ne serait pas correcte de conclure sur une dépendance au NADPH pour les enzymes NfsA, EF0404 et AzoR lorsqu'on prend en compte les résultats avec EF1181. L'enzyme NfsA a été classée dans le groupe A car son activité spécifique avec le cofacteur NADPH était plus grande qu'avec le cofacteur NADH (21,199). La même problématique peut être adaptée aux azoréductases testées qui ont une préférence pour le NADH mais qui sont tout de même capables d'utiliser



le NADPH. Cette étude montre la difficulté de la classification des enzymes réductases dans des familles. D'après ces observations, nous pouvons proposer une troisième classe de nitroréductase insensible à l'oxygène : le groupe C dont les représentants seraient des nitroréductases insensibles à l'oxygène capables d'utiliser le NADH et le NADPH comme cofacteur mais ayant une préférence pour le NADPH.

## V. L'utilisation des activités azoréductases et nitroréductases dans le domaine du diagnostic *in vitro*

### V.1. Les activités azoréductases

L'activité azoréductase est largement répandue au sein des populations microbiennes. Les essais de réduction de différents substrats « azo » ont montré la diversité des activités azoréductases en fonction des espèces bactériennes et des substrats.

Les tests des différents substrats sur les souches d'*E. faecalis* ont montré une souche (SFL76) ayant un profil atypique (SFL76) de réduction par rapport aux autres souches. L'activité *in vitro* de cette protéine (AzoA76) était plus faible que celles de autres enzymes AzoA testées. Toutefois, le séquençage de la protéine AzoA76 de cette souche n'a pas mis en évidence de différence entre cette protéine et la protéine AzoA des autres souches de *E. faecalis* testées. Les résultats sur cette souche SFL76 sont d'autant plus surprenants que cette souche est considérée comme la souche type de l'espèce *E. faecalis* (ATCC 19433).

Une des souches de l'espèce *A. baumannii* ayant un profil atypique pour le substrat HABA est la souche identifiée comme multirésistante. Il serait intéressant de tester plusieurs souches multirésistantes pour évaluer s'il est possible d'effectuer une identification grâce à ces substrats de ces souches cliniquement importantes.

Deux substrats ont montré des capacités d'universalité pour la détection de l'ensemble des microorganismes testé : MR et HABA.

Suite à ces résultats, une demande de brevet a été déposée au cours de la thèse pour l'utilisation des activités azoréductases pour la détection de microorganismes.

### V.2. Les activités nitroréductases

Les activités nitroréductases sont déjà utilisées dans le domaine du diagnostic, en particulier dans la détection des bactéries lactiques (TEMPO® LAB), des levures et des moisissures (TEMPO® YM). Toutefois, lors de cette étude, une activité nitroréductase a pu



être montrée pour toutes les espèces de microorganismes testées, excepté pour *Candida albicans*. Les résultats négatifs avec *C. albicans* sont surprenants, car le paramètre TEMPO<sup>®</sup> YM, utilisant le 7NCCA, ne rencontre pas de difficultés de détection de cette espèce. L'absence de réduction du 7NCCA pourrait être due à la différence de composition du milieu réactionnel. Afin de confirmer cela, il serait intéressant de tester à nouveau ces souches de *C. albicans* avec le milieu TEMPO<sup>®</sup>YM.

L'activité nitroréductase pourrait donc être utilisée beaucoup plus largement dans la détection des microorganismes dans des échantillons variées. Un nouveau réactif TEMPO<sup>®</sup> est d'ailleurs en fin de conception, il permettra la détection de la flore totale avec le substrat « nitro » 7NCCA.

### V.3. La détection de microorganismes anaérobies stricts ou facultatifs

La ou les voies de réduction des composés « azo » non dépendante d'enzymes spécifiques des substrats « azo » sont actives en présence de très peu d'oxygène voire en absence d'oxygène. On peut imaginer un test diagnostique ciblant ces voies métaboliques pour la détection de germes capables de se développer en absence d'oxygène. Ce type de microorganismes est difficile à détecter et surtout long à détecter en raison de leur croissance lente. L'association de l'utilisation voies non spécifiques et de substrat fluorescent peut être un moyen sensible et rapide de détecter la présence de ces germes. Toutefois, ces voies de réduction en anaérobiose font certainement intervenir des enzymes de type quinone réductases (163). Il serait donc intéressant d'identifier des substrats de la famille des quinones (par exemple : ménadione, lawsone) pour évaluer l'impact de la réduction des composés « azo » par des microorganismes capables de se multiplier en conditions anaérobies.

## VI. Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis la caractérisation d'enzymes à activité nitroréductase chez *E. faecalis* jusque-là non décrites. Une de ces protéines s'est révélée avoir également une activité azoréductase. En parallèle, nous avons bien mis en évidence l'activité nitroréductase des protéines AzoR et AzoA décrites comme azoréductases chez *E. coli* et *E. faecalis* respectivement.

Lors de cette étude une méthode de détection d'activité enzymatique et de



détermination de constantes enzymatiques utilisant la fluorescence a été abordée. Cependant, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés dû en particulier au grand nombre de paramètres physiques difficilement maitrisable comme le chevauchement des spectres de fluorescence et d'absorbance des composés du milieu réactionnel (produits de réduction, FMN, NADH, NADPH).

La voie métabolique de réduction du substrat 7NCCA utilisée dans des tests de bioMérieux tels que TEMPO® LAB et TEMPO®YM était jusque-là très peu connue. Au cours de ces travaux, nous avons pu montrer que la réduction de ce substrat passait par différents intermédiaires sans pour autant avoir pu les identifier. Les travaux sur les espèces de microorganismes détectées par les paramètres TEMPO® LAB et YM ont fait l'objet d'un poster en collaboration avec l'équipe TEMPO Industrie de bioMérieux présentés au congrès biennal de la Fédération des sociétés européennes de microbiologie (FEMS) 2010 à Genève.

L'activité nitroréductase *in vitro* a pu être améliorée en ajoutant de la L-glutamine dans le milieu réactionnel. La prochaine étape sera de tester cet acide aminé et d'autres acides aminés qui n'ont pas été encore testés sur l'activité nitroréductase *in vivo* afin d'évaluer un effet positif potentiel sur la vitesse de réaction. L'ajout d'un composé spécifique peut permettre une amélioration d'activité sans générer autant d'effets secondaires potentiellement gênants que des mélanges complexes tels que les peptones. Ces travaux permettraient de proposer des milieux de croissance modifiés afin de tester *in vivo* l'impact sur le temps de détection de ces activités, ce qui permettrait, à terme, de réduire le temps de diagnostic des tests bioMérieux.

La voie spécifique d'azoréduction dépendante de l'enzyme AzoR en aérobie a été mise en évidence ainsi que l'importance du couple NfsA/NfsB pour l'activité nitroréductase cellulaire en atmosphère aérobie chez *E. coli*. Il serait intéressant de réaliser le même type d'étude *in vivo* chez *E. faecalis*, notamment pour mieux caractériser son activité nitroréductase cellulaire et déterminer plus précisément les rôles des enzymes EF0404, EF0648, EF0655 et EF1181 lors de la croissance cellulaire en présence des composés « nitro » et « azo ».

Les résultats sur les voies d'azoréduction chez *E. coli* ont fait l'objet d'un poster qui a pu être présenté au congrès sur les enzymes, coenzymes et voies métabolique du Gordon Research Conferences en juillet 2012 à Waterville Valley Resort (New Hampshire, Etats-Unis)



ainsi qu'un article soumis en décembre 2012 au « Journal of Bacteriology ».

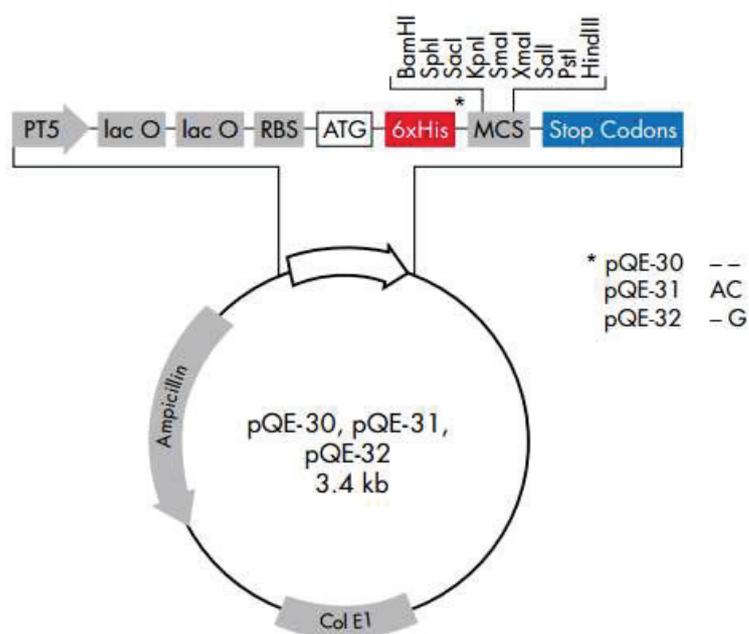
Suite à l'ensemble de ces résultats, des expériences pour étudier plus finement la régulation des gènes codants les azoréductases et nitroréductases sont prévues. Nous souhaitons suivre l'expression des gènes codants les azoréductases et nitroréductases grâce à la fusion d'un gène reporter tel que le gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein) au promoteur des gènes d'intérêt. De cette façon, la fluorescence de la GFP produite du fait de l'expression des gènes d'intérêt pourra être suivie dans différentes conditions de culture (atmosphère, milieux de culture, avec ou sans substrat). Un projet d'étude par analyse de type RNA seq (c'est-à-dire l'identification et la quantification de tous les ARNm produits pour des conditions de croissance choisies) est aussi envisagé dans plusieurs conditions. Ces résultats pourraient aboutir à l'identification des conditions optimales pour développer un test diagnostic utilisant des composés « azo » ou « nitro » pour la détection de microorganismes.



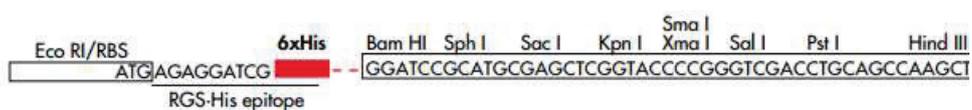
# ANNEXES



## Annexe Cartes plasmidiques.



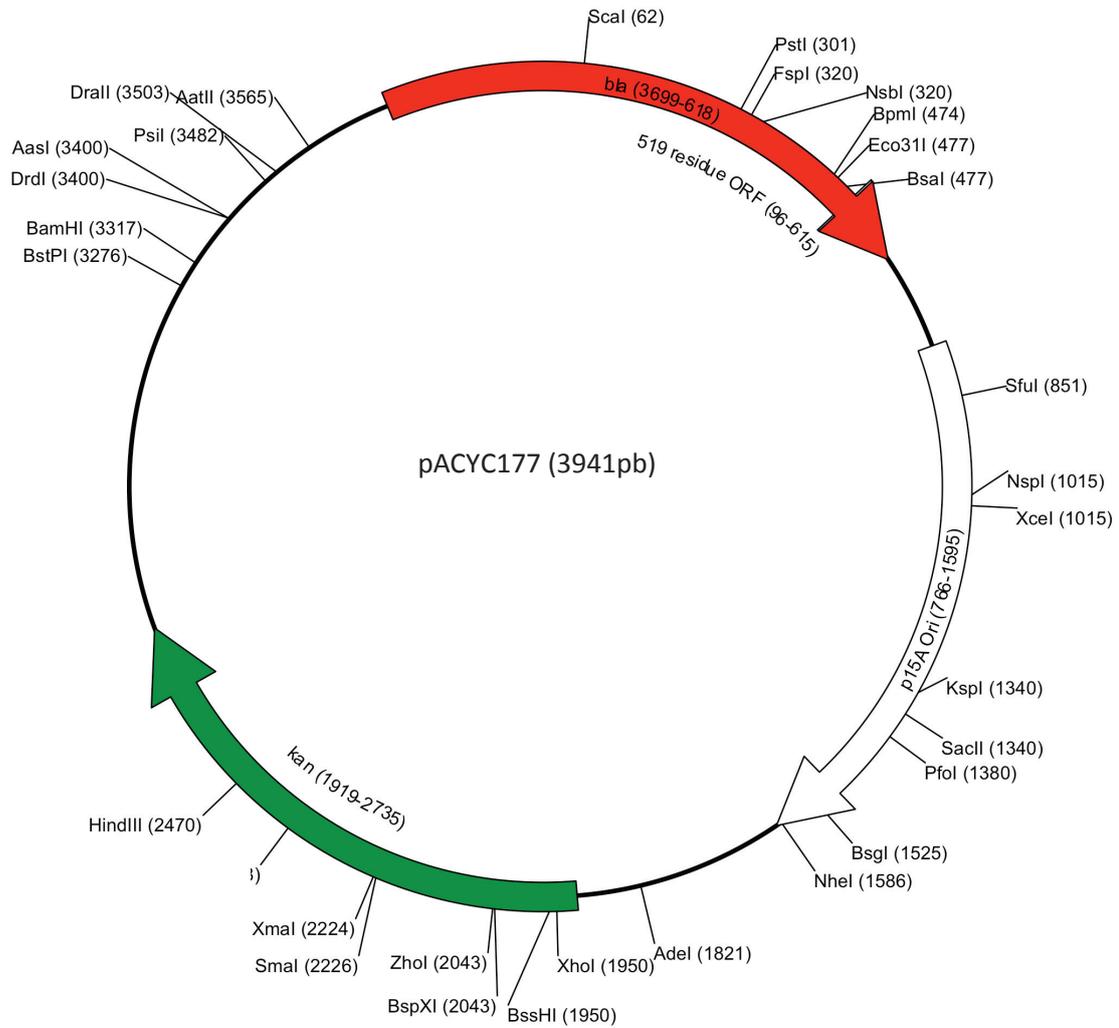
### pQE-30



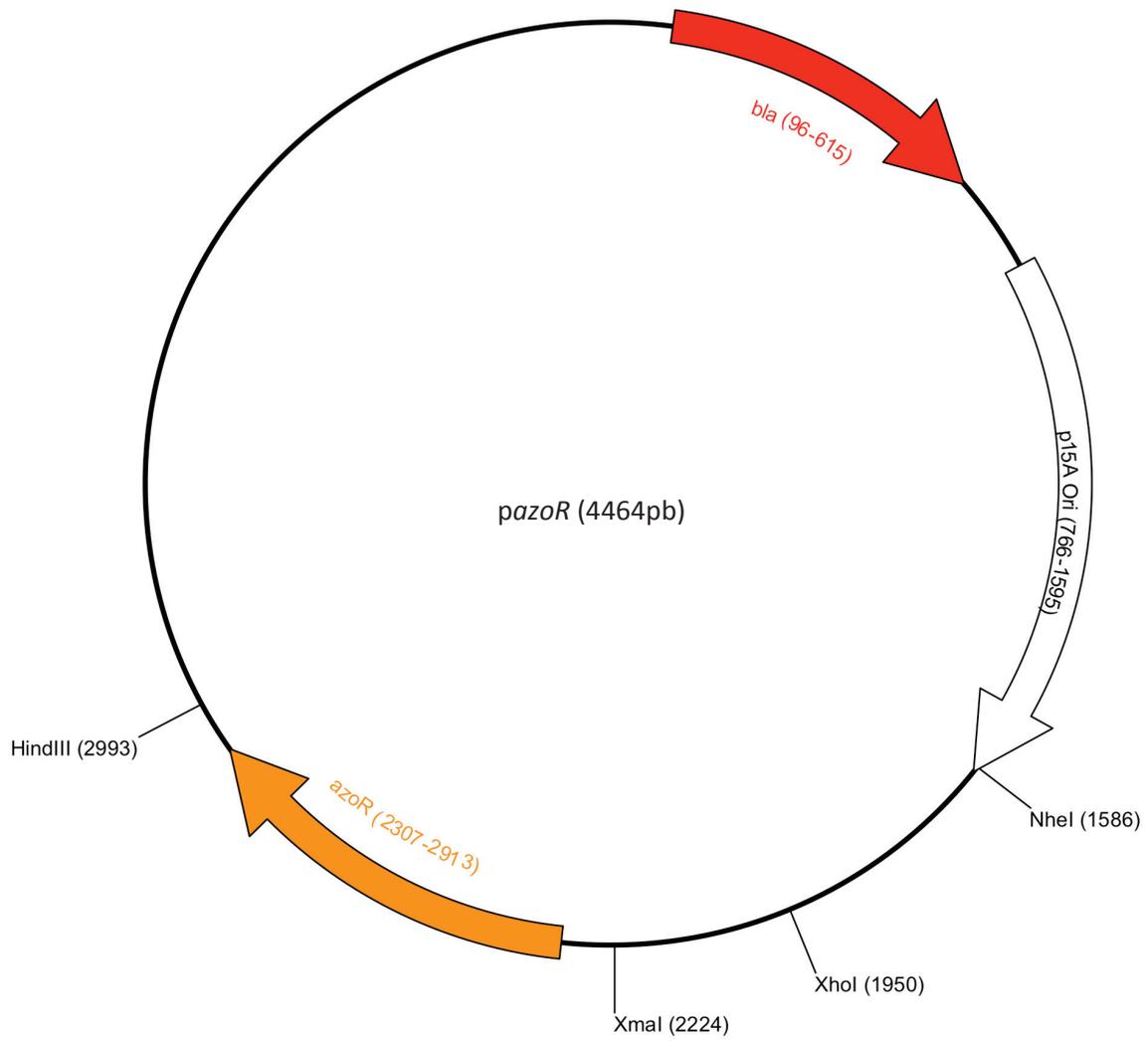
Cette carte est fournie par Qiagen, un des fournisseur de ce plasmide. La séquence nucléotidique est également disponible sur le site [www.Qiagen.com](http://www.Qiagen.com).



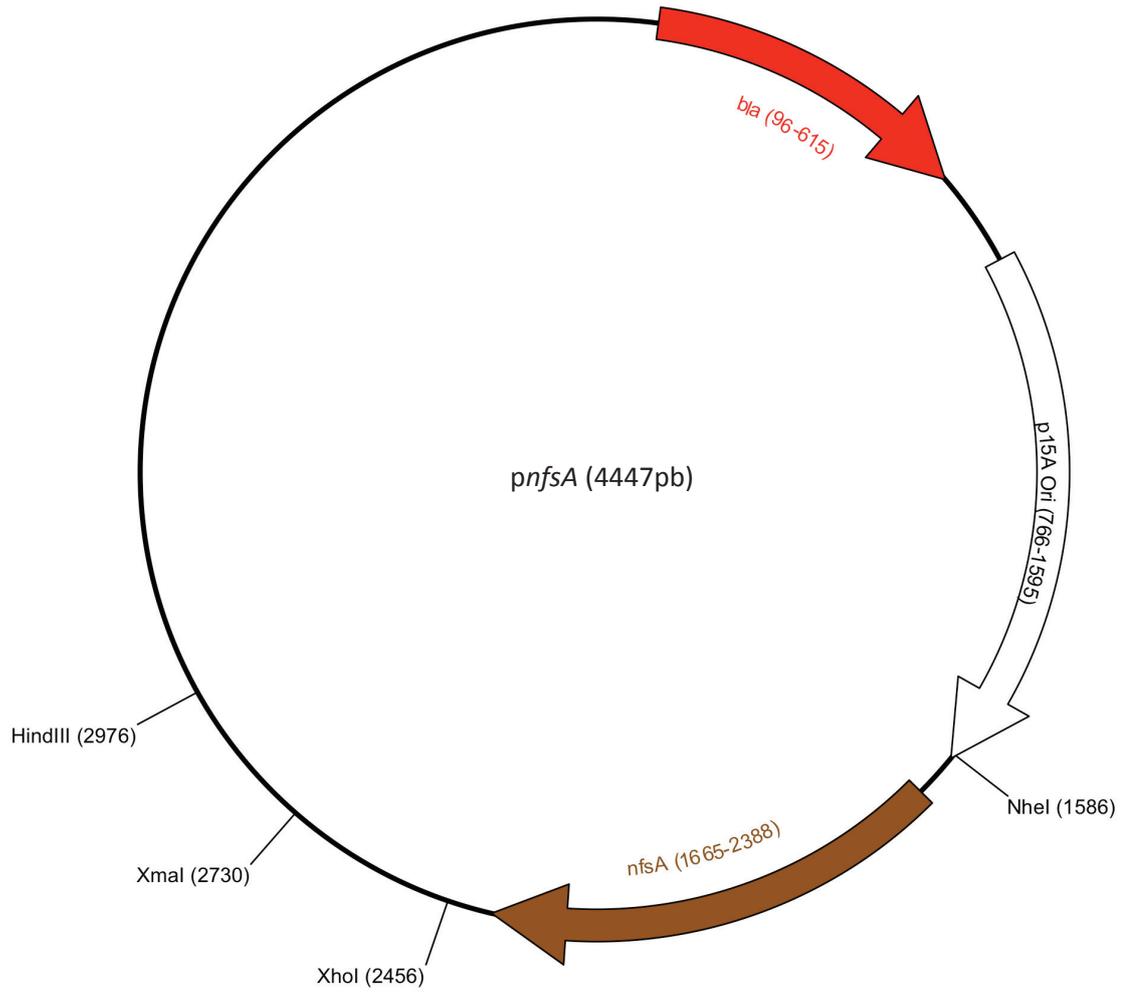
## Annexe cartes plasmidiques

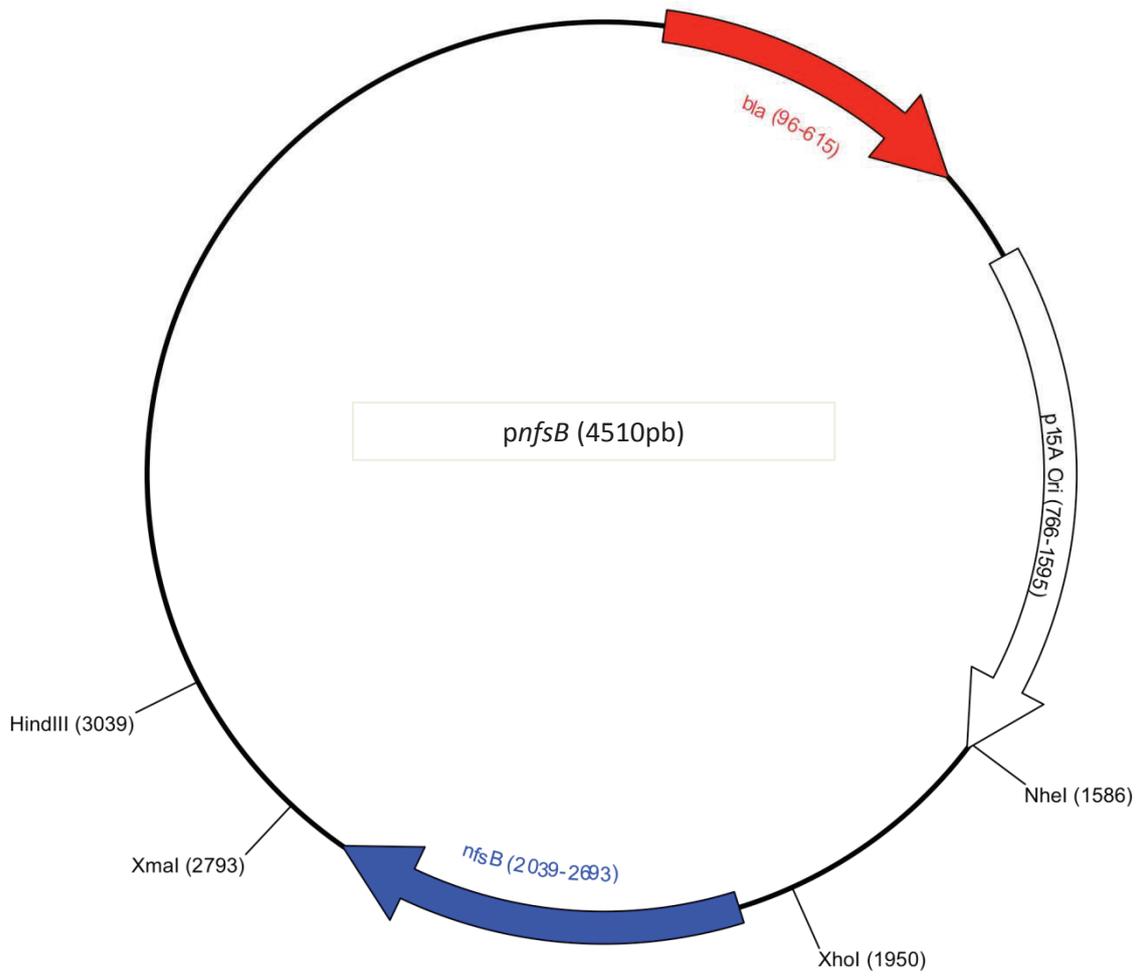


La séquence du plasmide pACYC177 est disponible dans la base de donnée publique nucleotide sur le site du NCBI (n° d'accension X06402.1).

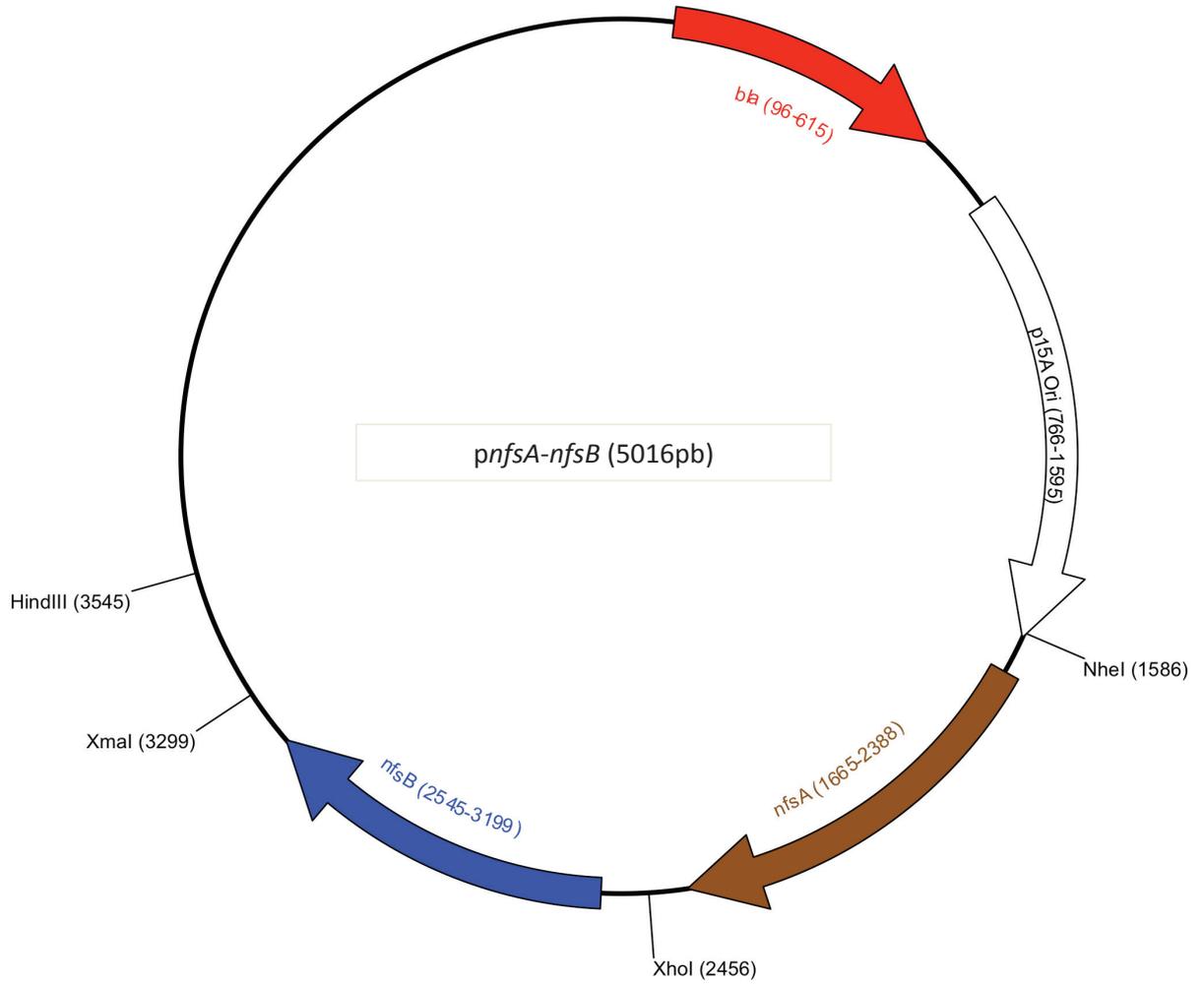


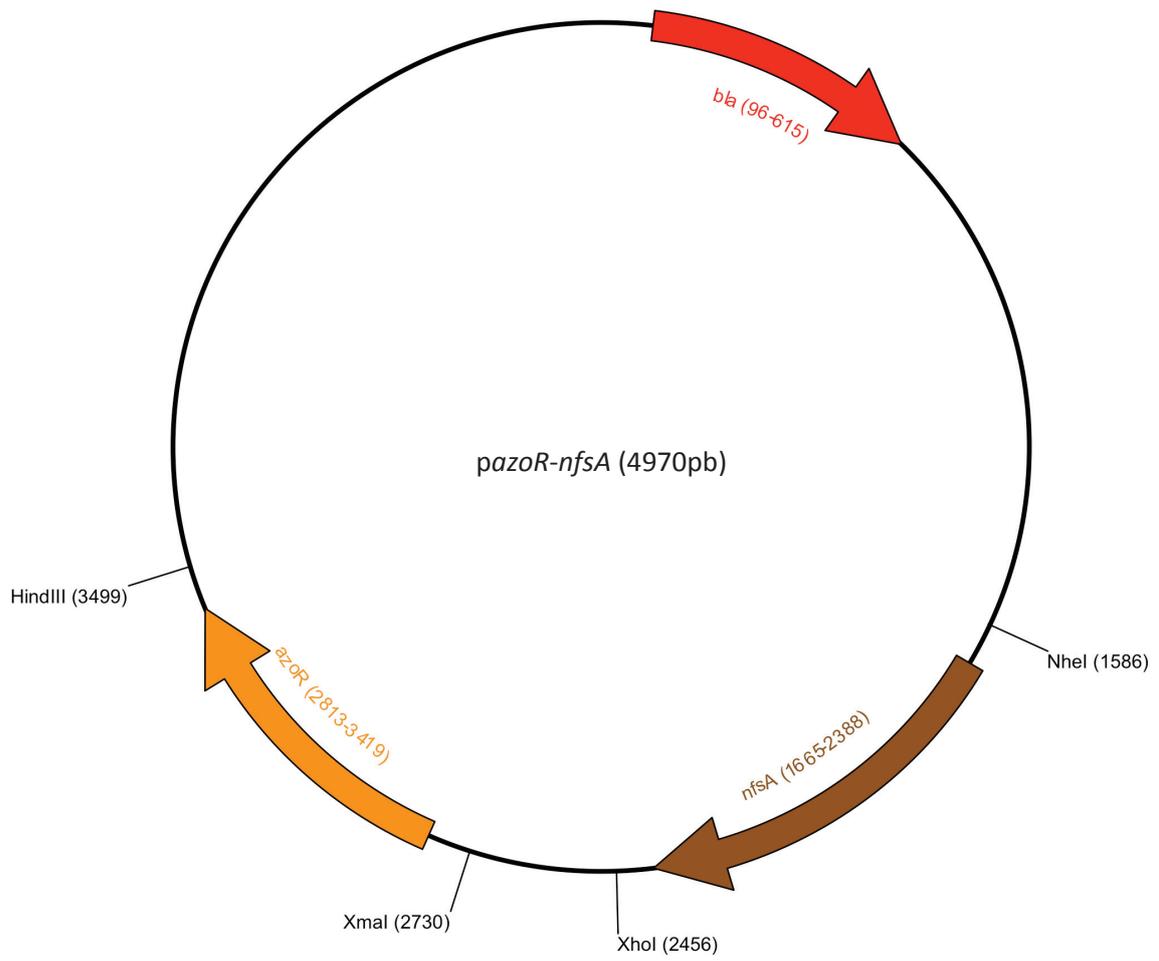
Annexe cartes plasmidiques



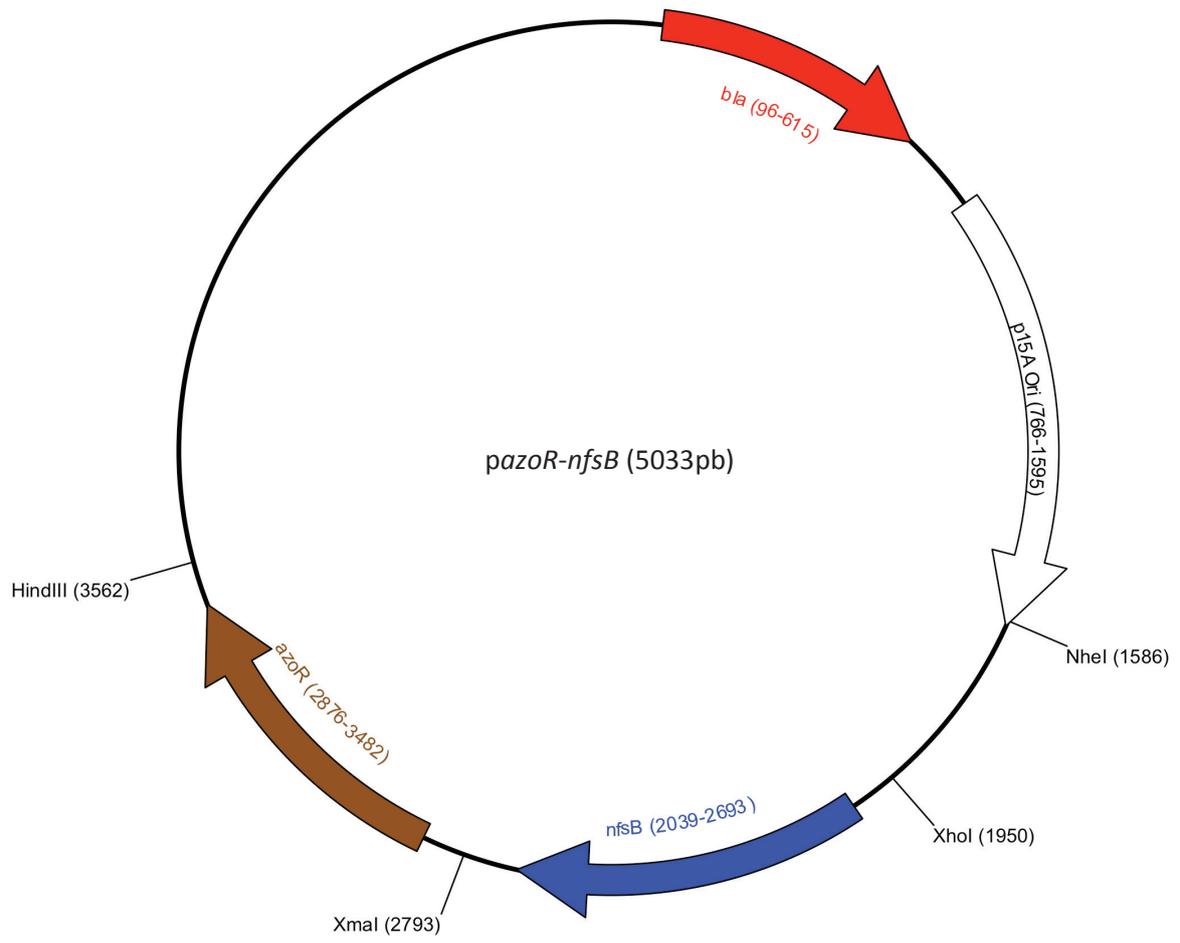


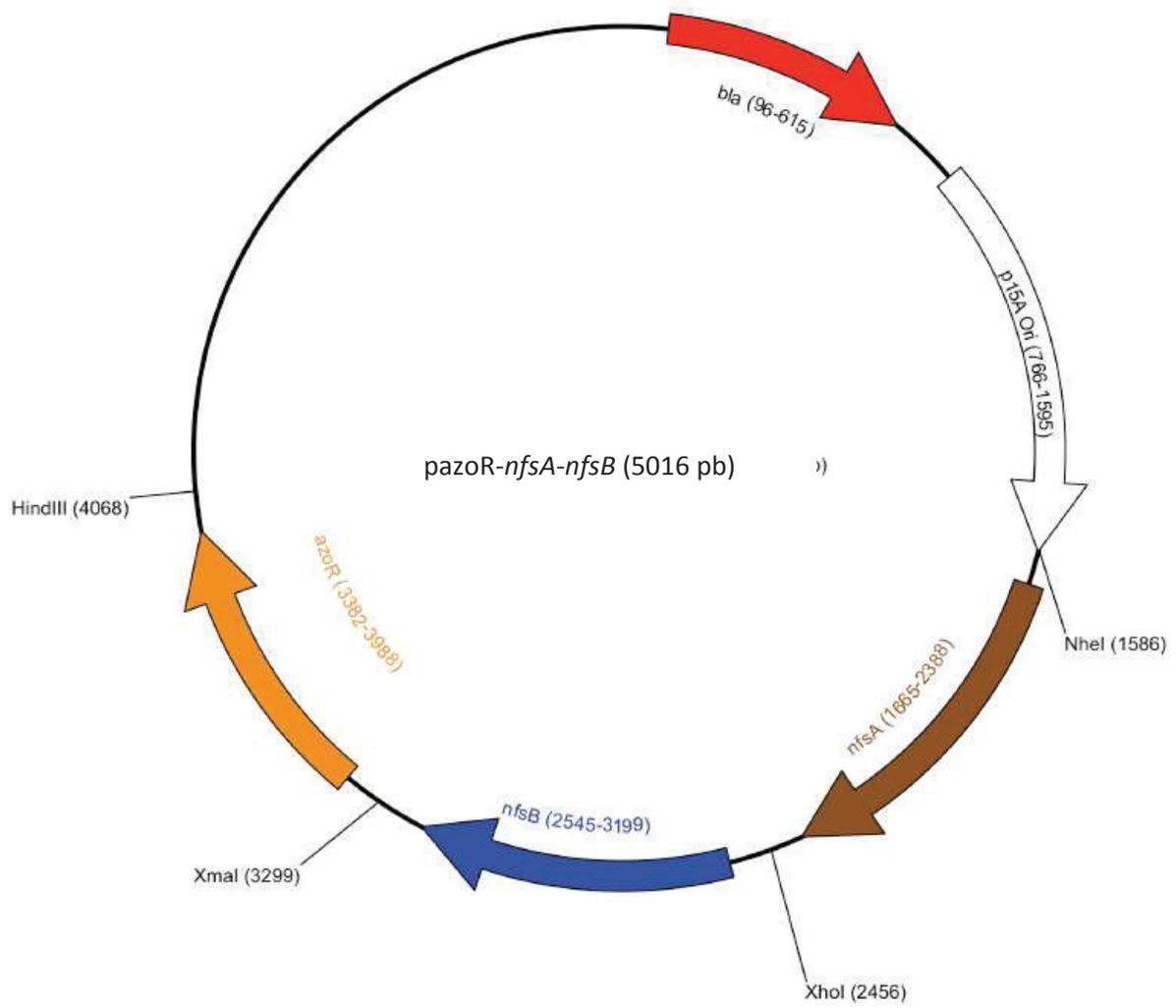
Annexe cartes plasmidiques



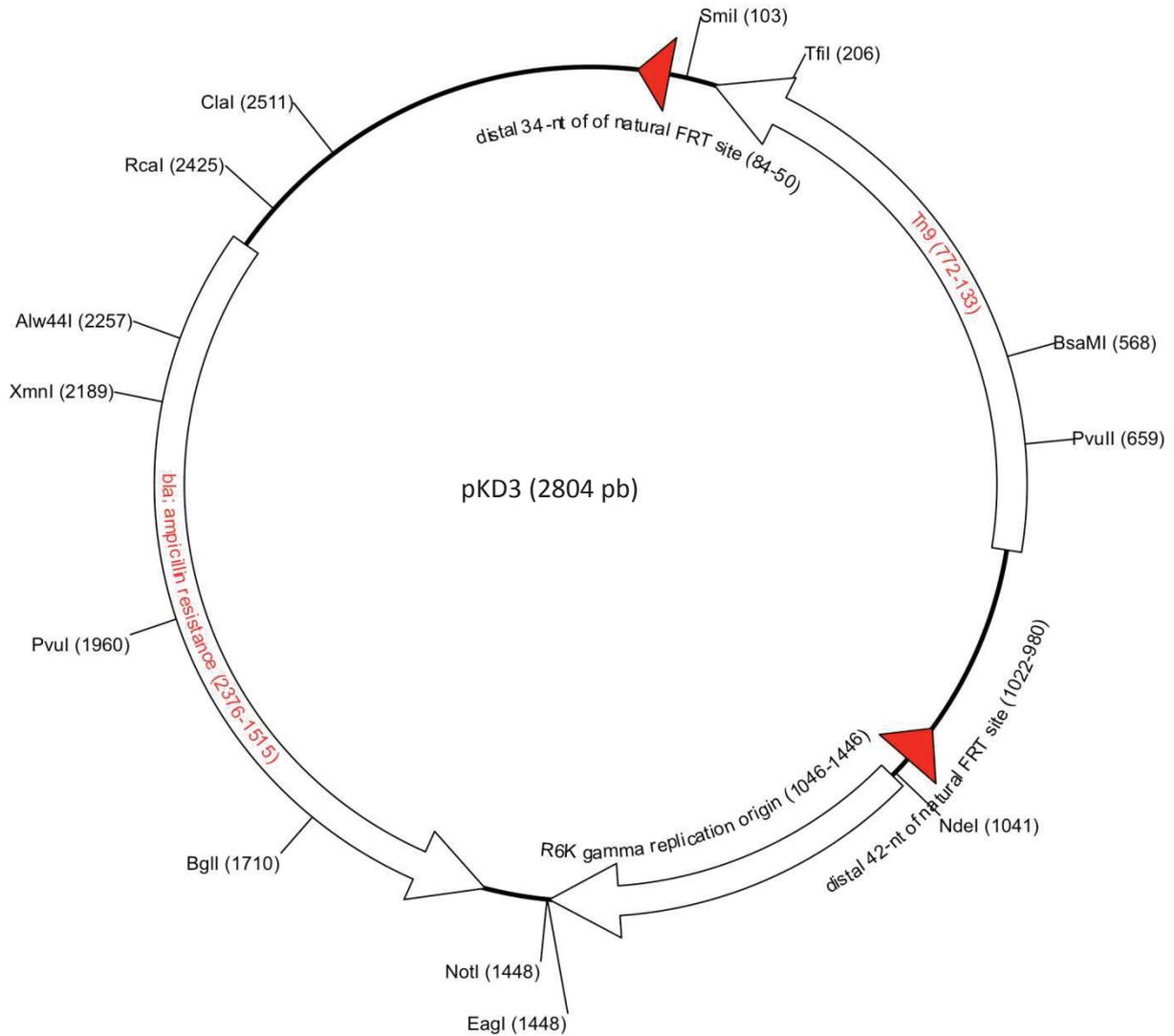


Annexe cartes plasmidiques





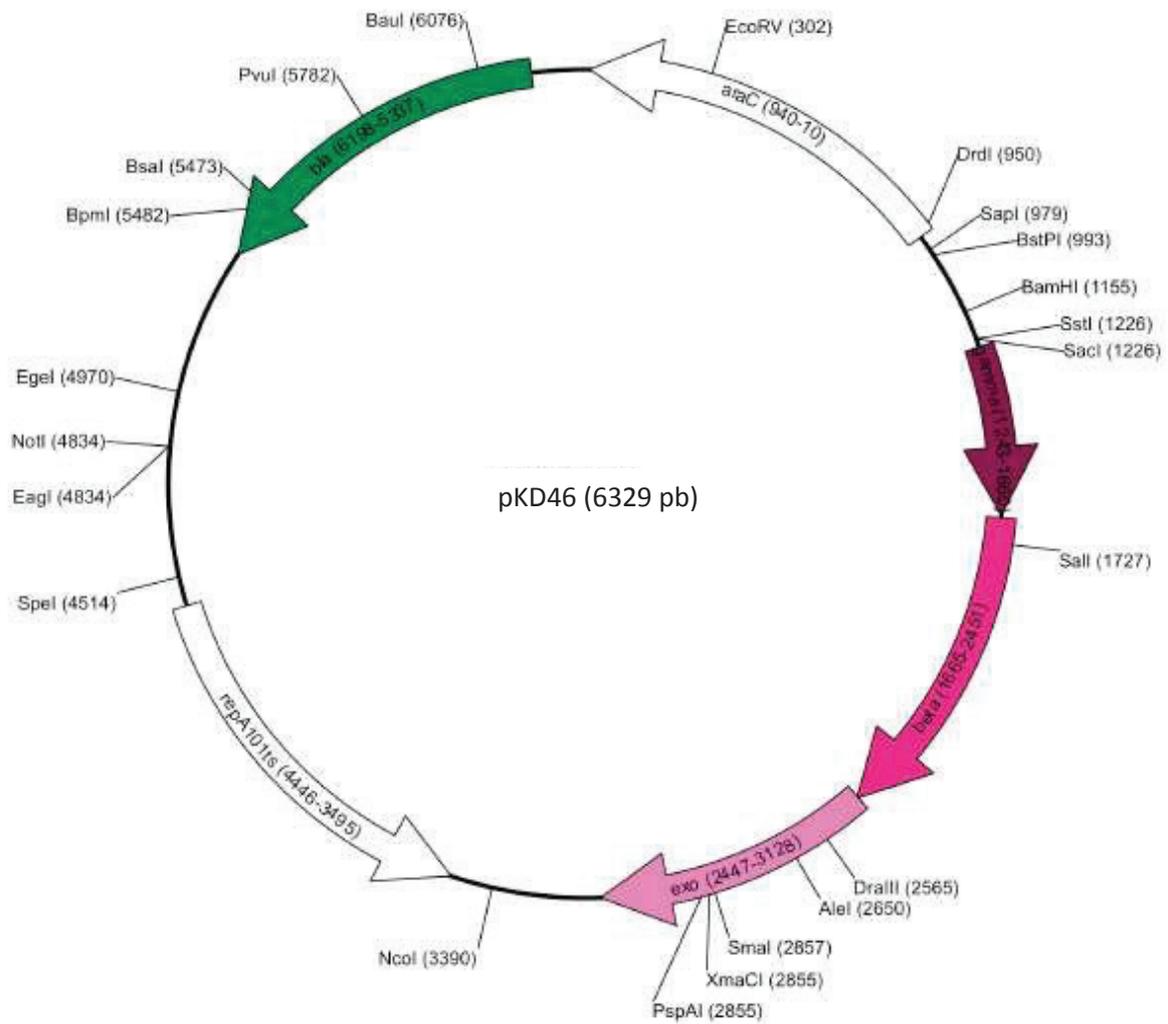
## Annexe cartes plasmidiques



La séquence du plasmide pACYC177 est disponible dans la base de donnée publique nucleotide sur le site du NCBI (n° d'accèsion AY048742.1).



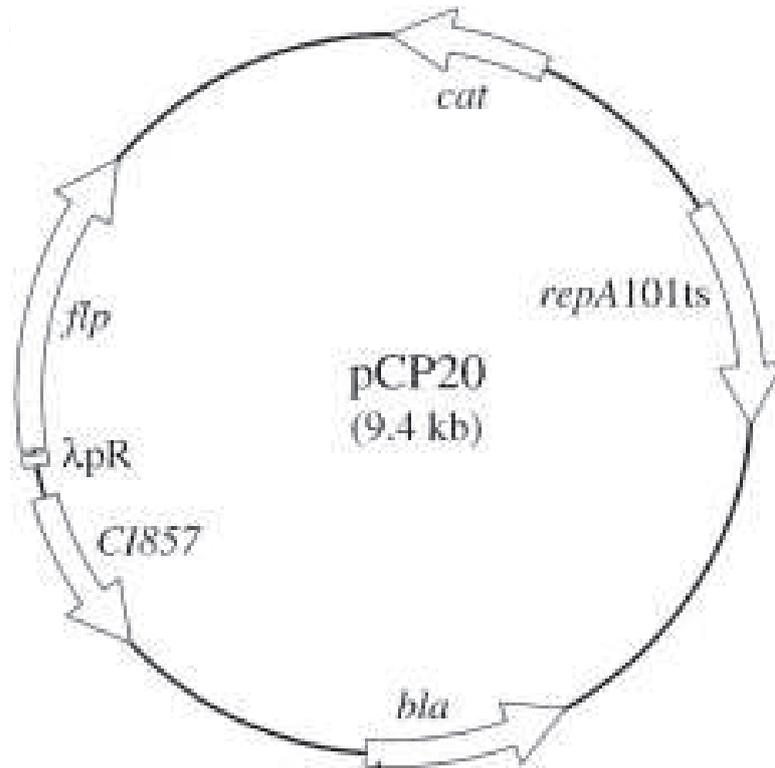
## Annexe cartes plasmidiques



La séquence du plasmide pACYC177 est disponible dans la base de donnée publique nucleotide sur le site du NCBI (n° d'accèsion AY048746.1).



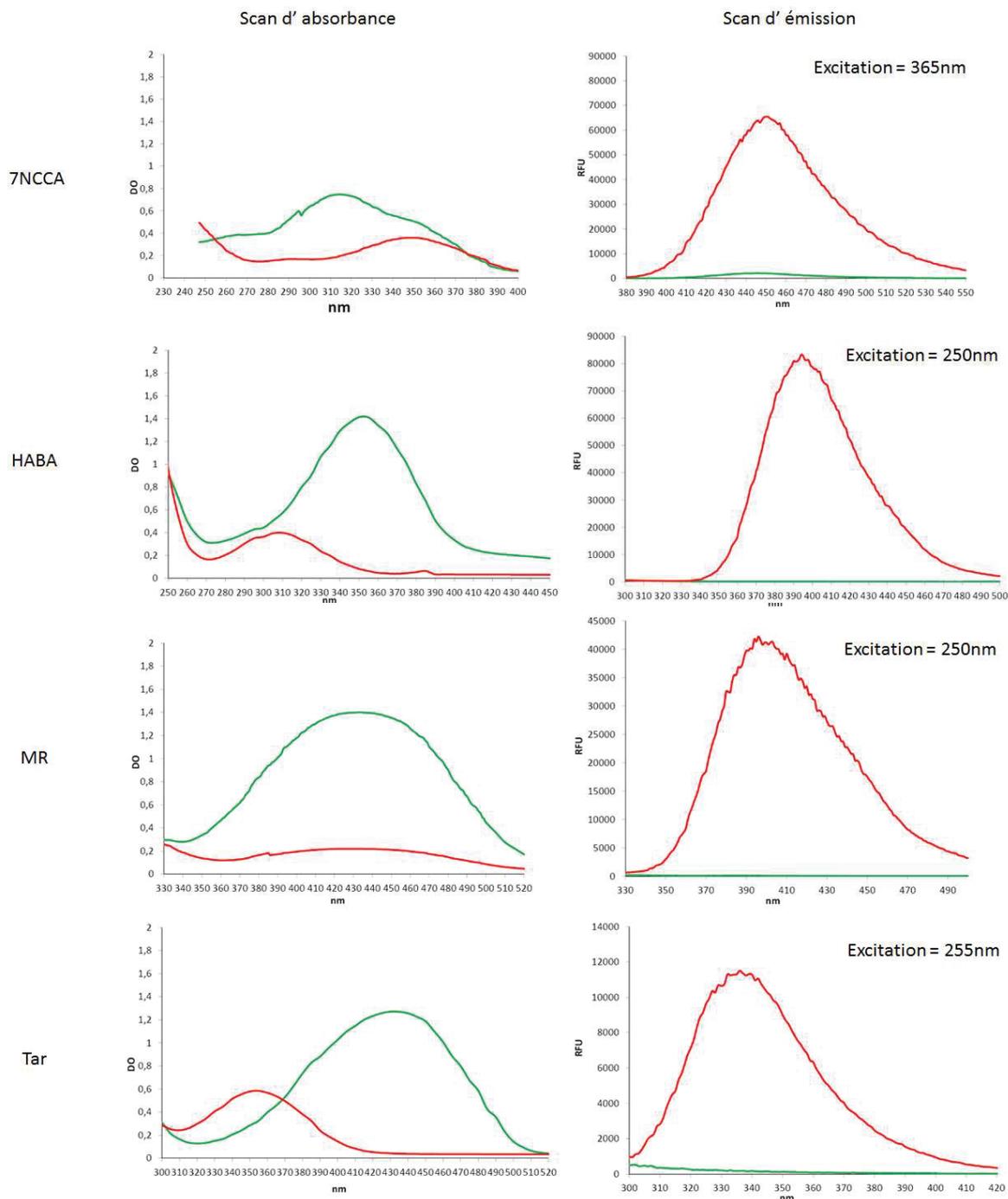
Annexe cartes plasmidiques



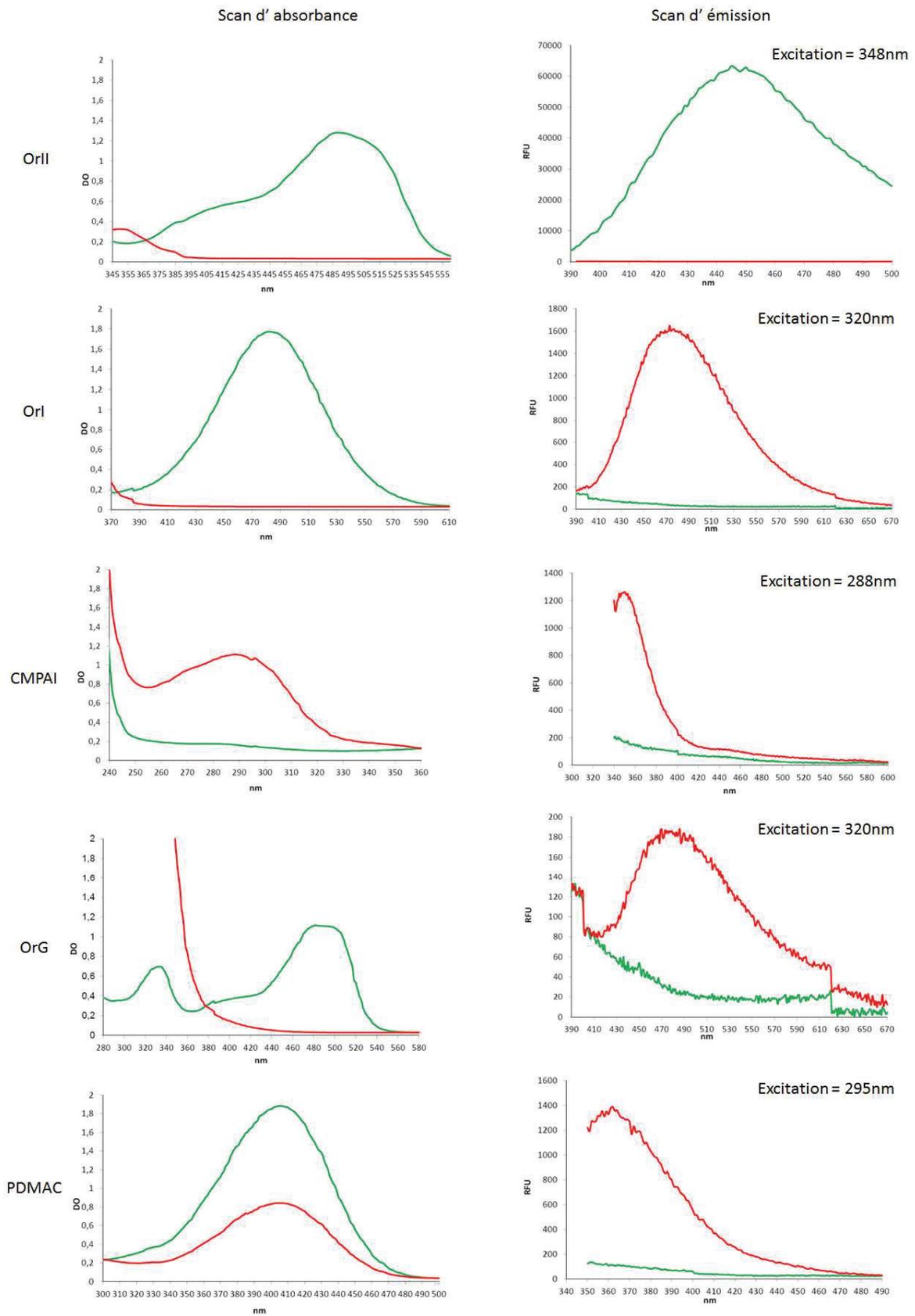
La séquence du plasmide pCP20 n'a pas été publiée, cette carte plasmidique est issue de la publication de l'équipe de B. Doublet de 2008 (31,31,48).

## Annexe Spectre d'absorbance et d'émission des substrats enzymatiques

Les spectres d'absorbance et d'émission des substrats enzymatiques ont été réalisés sur 100 $\mu$ M des formes oxydées (vert) et réduites (rouge) de chaque molécules

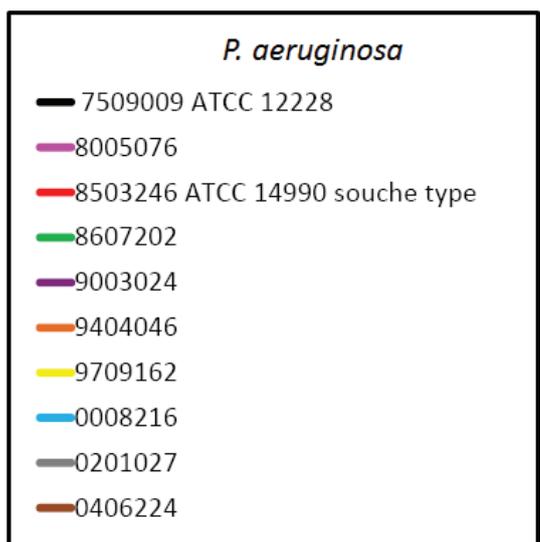
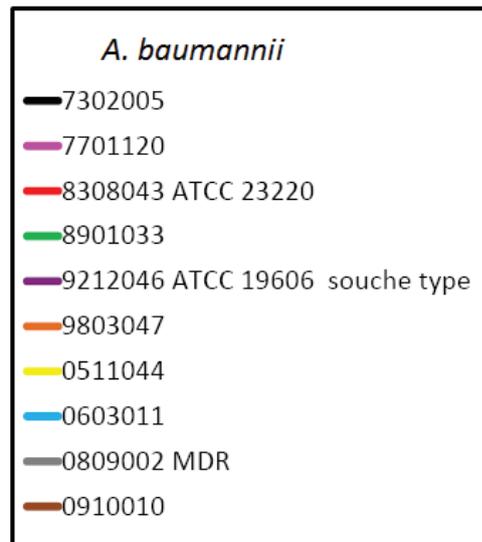
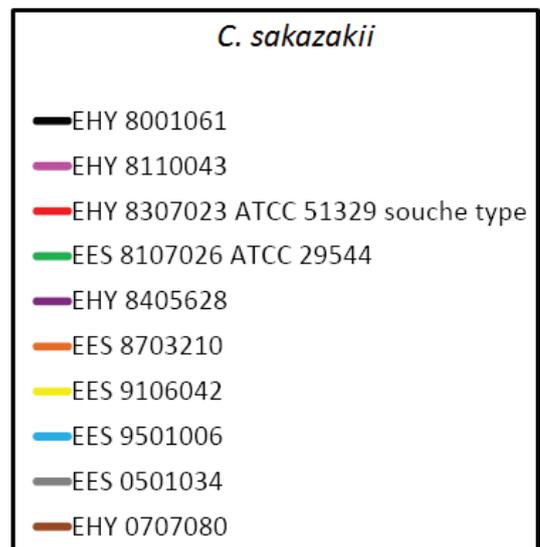
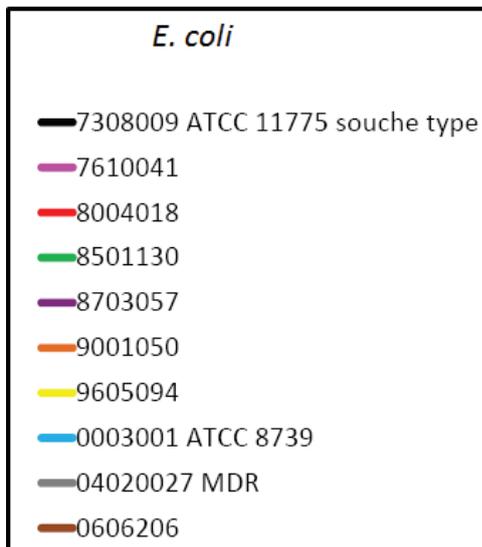


## Annexe Spectres d'absorbance et d'émission des substrats enzymatiques

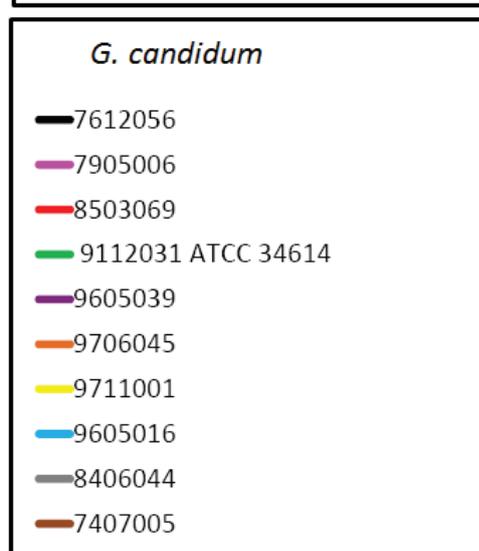
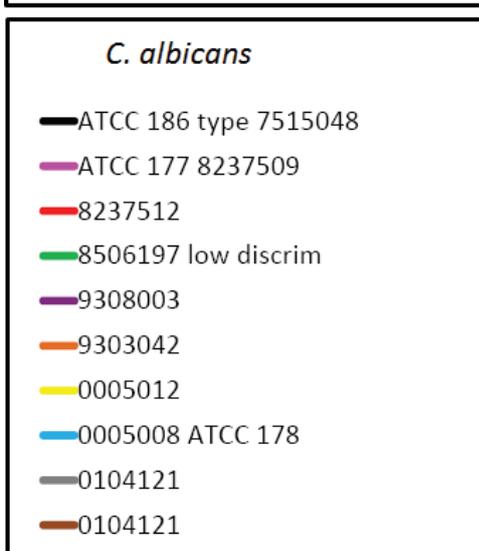
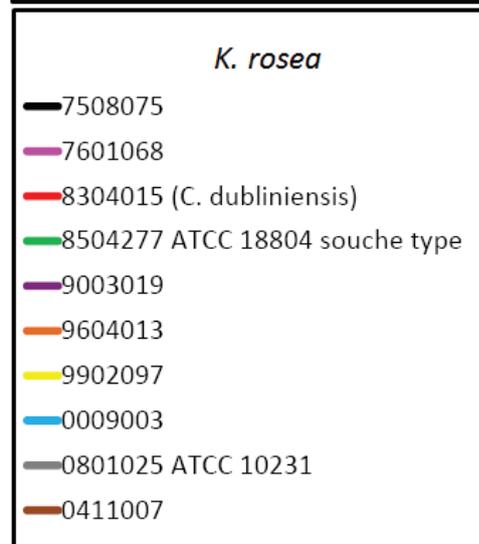
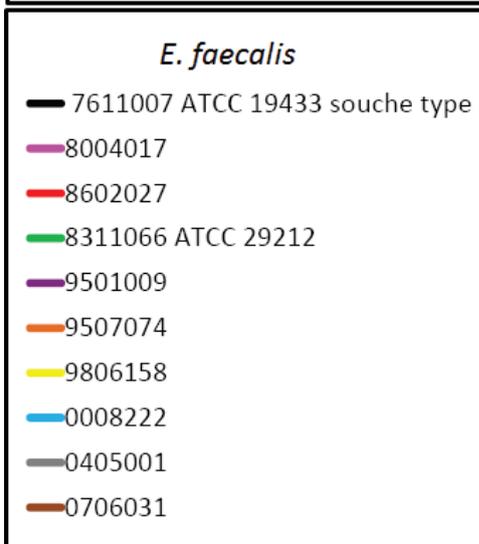
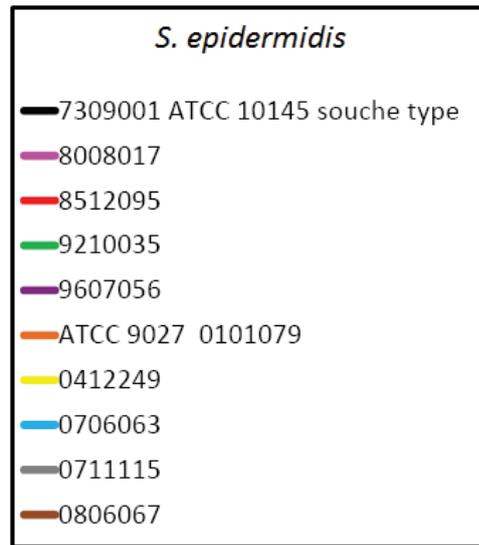
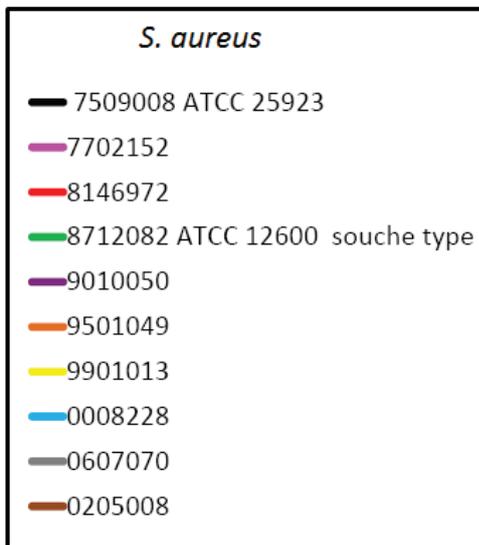


## Annexe Réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactéries à Gram -, 4 espèces de bactéries à Gram + et 2 espèces de levures dans du TSB.

Chaque espèce est représentée par 10 souches. La réduction de chaque substrat a été suivie par fluorescence à l'aide des longueurs d'ondes spécifiques à chaque molécule à l'état réduit sur un Infinite® M200 (Tecan) avec un gain de 70. Pour chaque courbe, la fluorescence intrinsèque de la souche a été déduite. Le substrat est considéré comme réduit par la souche lorsque les valeurs de fluorescence augmentent. Les échelles sont les mêmes pour un même substrat mais différentes d'un substrat à l'autre. (MDR = MultiDrug Resistant, souche multirésistante)



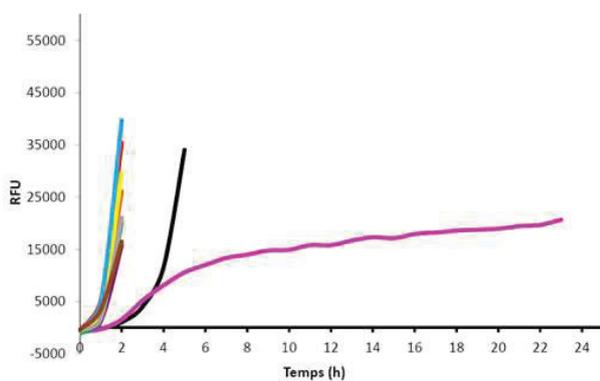
Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB



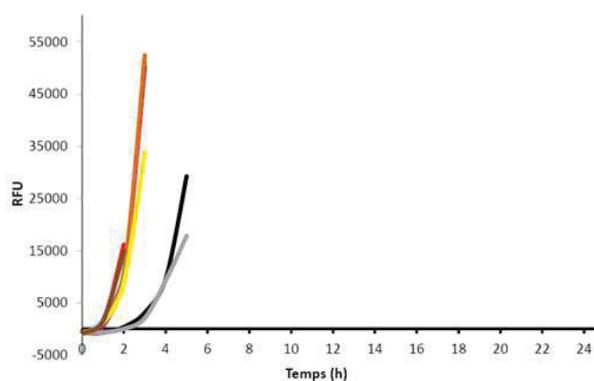
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

7NCCA (365nm/440nm)

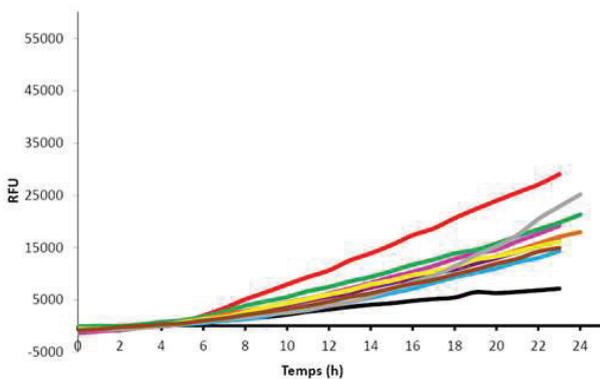
*E. coli*



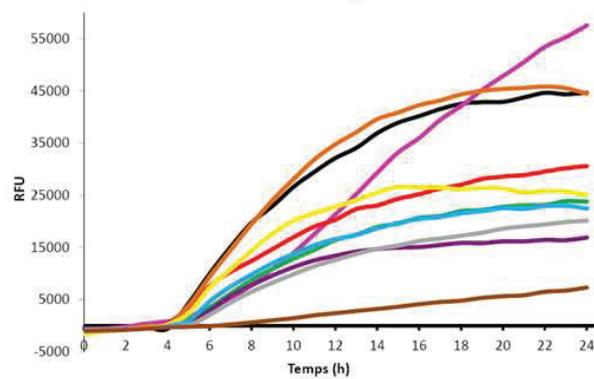
*C. sakazakii*



*A. baumannii*

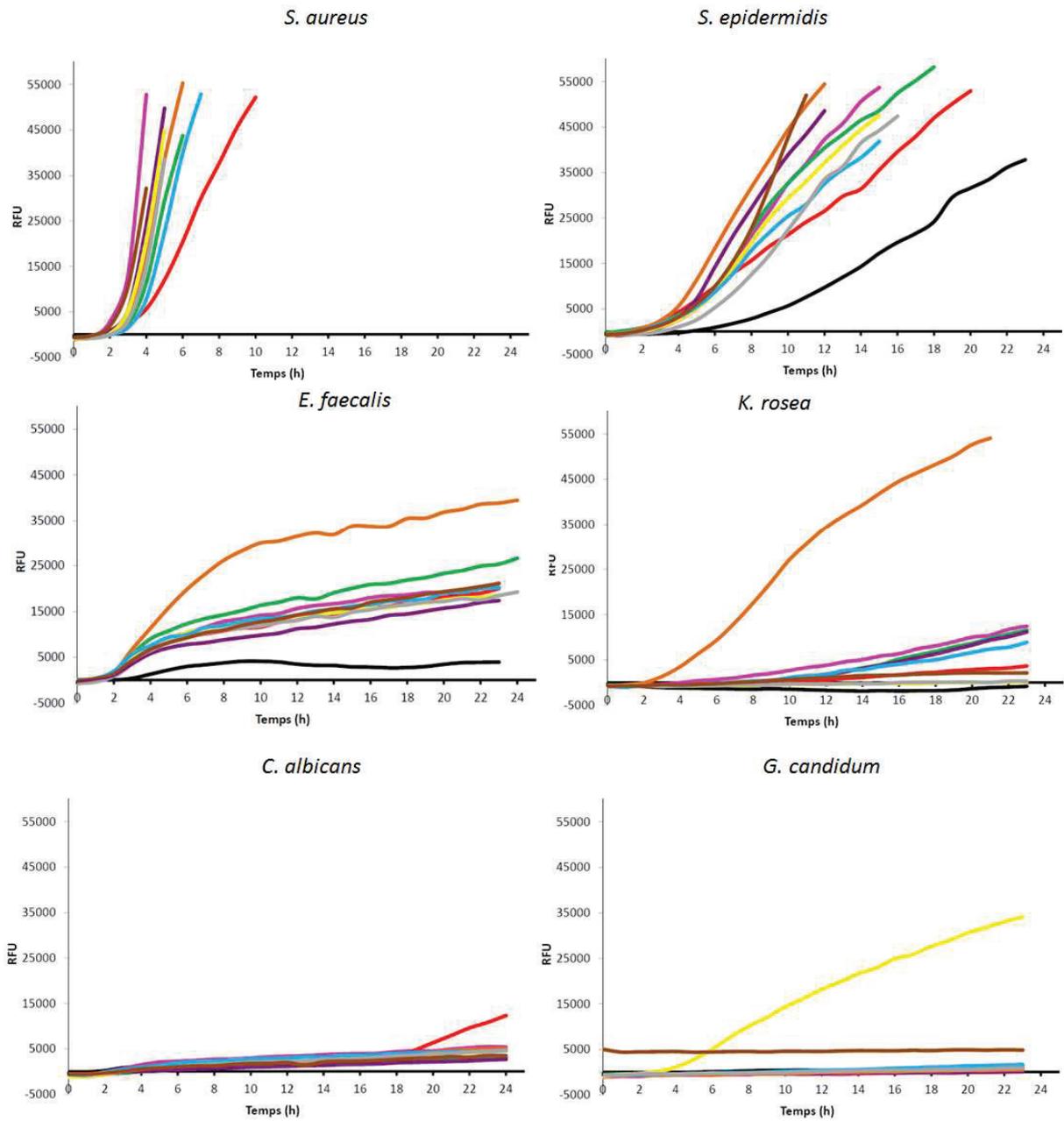


*P. aeruginosa*



Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

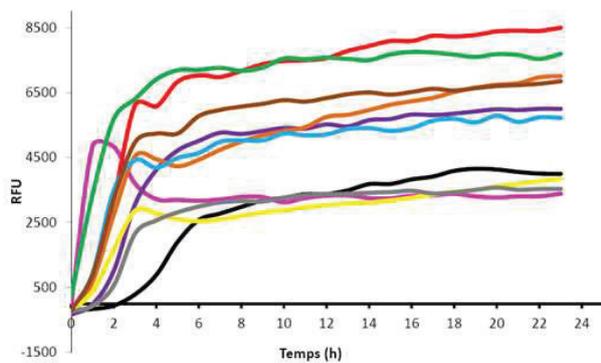
7NCCA (365nm/440nm)



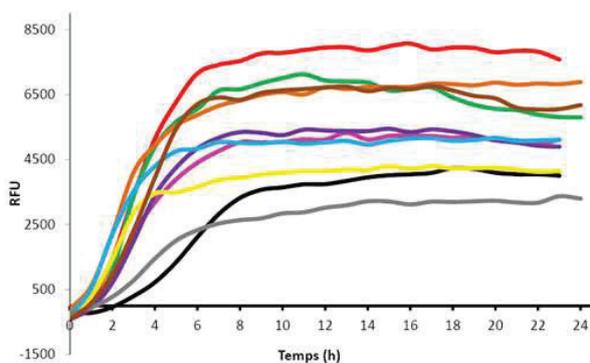
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

HABA (250nm/394nm)

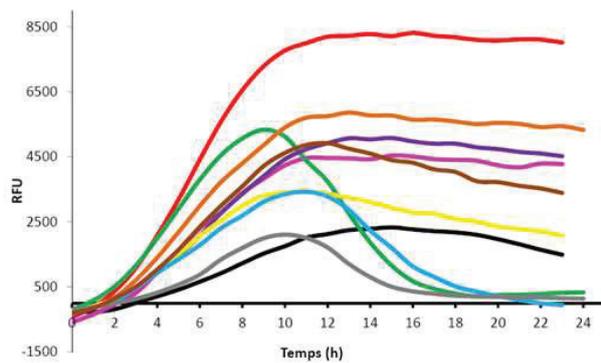
*E. coli*



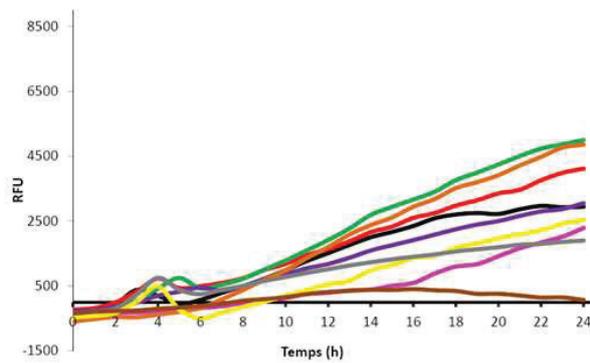
*C. sakazakii*



*A. baumannii*



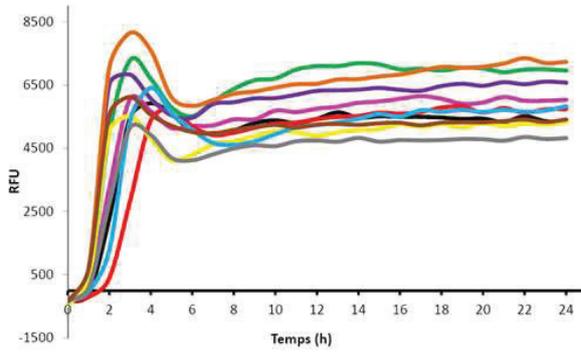
*P. aeruginosa*



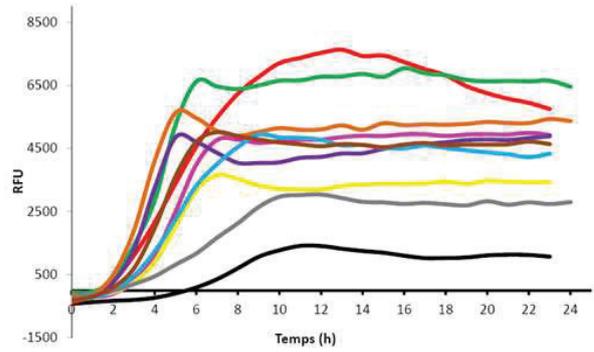
Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

HABA (250nm/394nm)

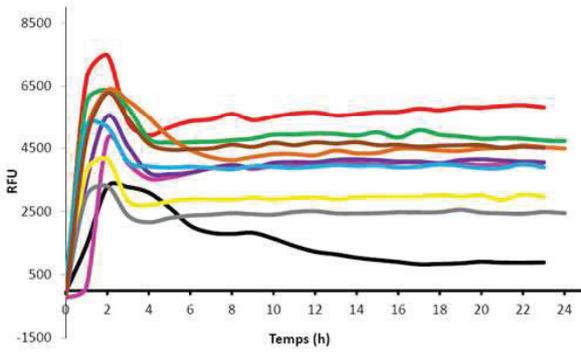
*S. aureus*



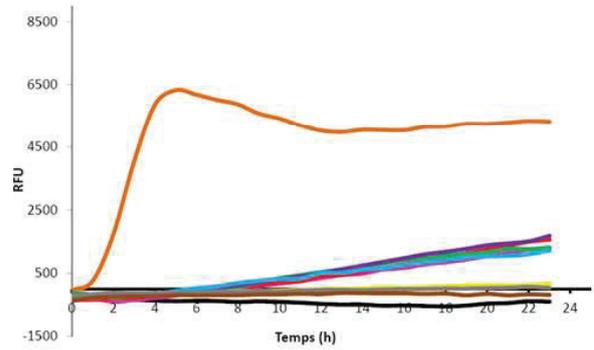
*S. epidermidis*



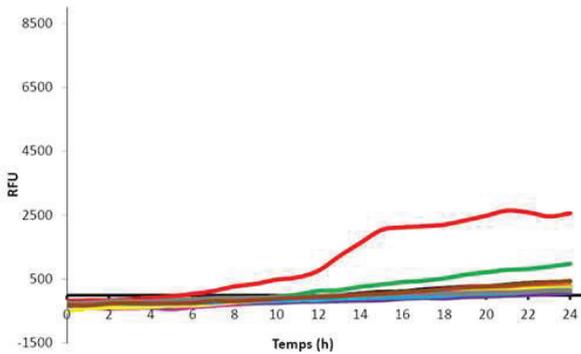
*E. faecalis*



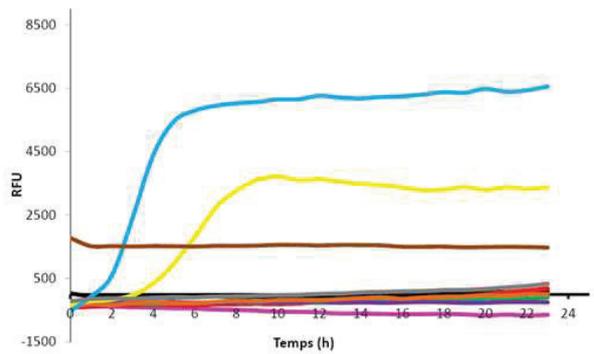
*K. rosea*



*C. albicans*



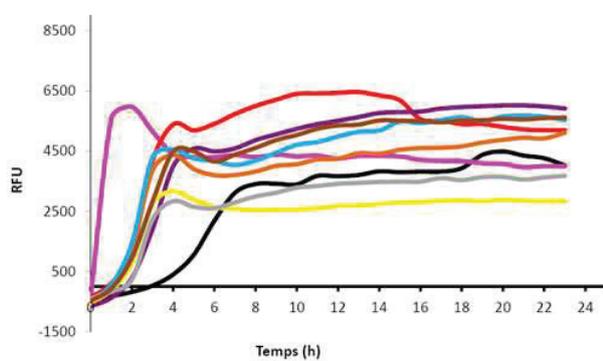
*G. candidum*



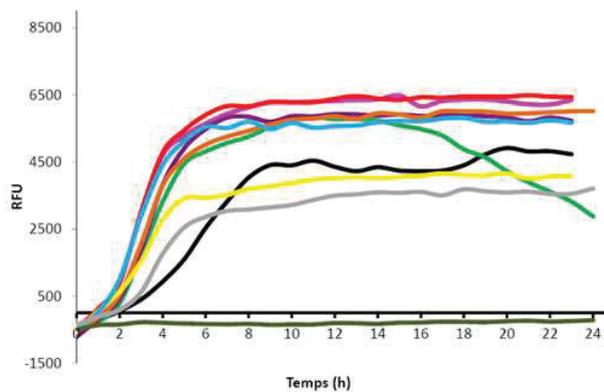
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

MR (250nm/395nm)

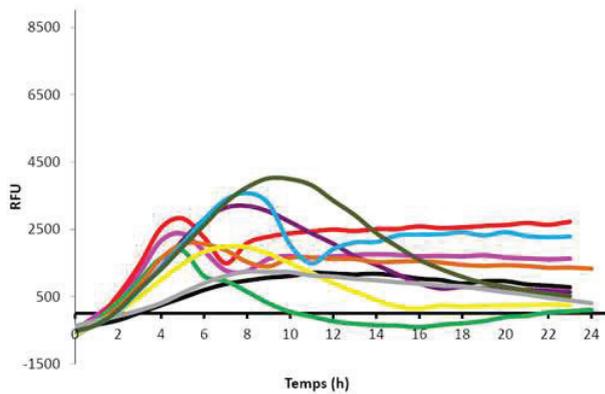
*E. coli*



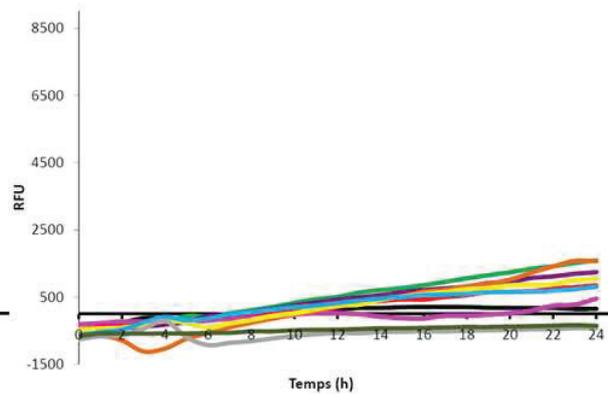
*C. sakazakii*



*A. baumannii*



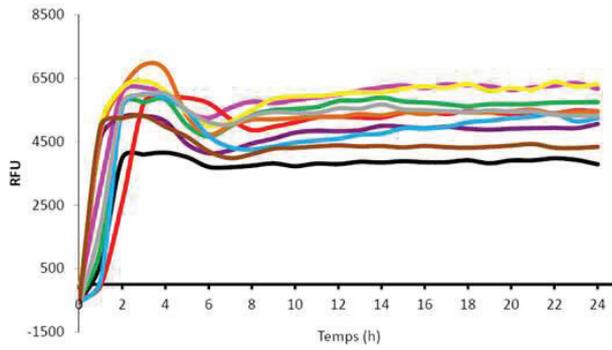
*P. aeruginosa*



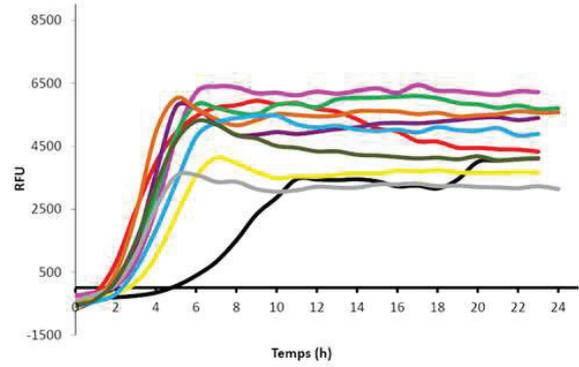
Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

MR (250nm/395nm)

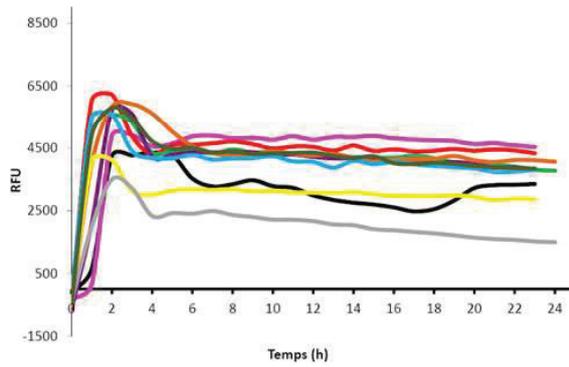
*S. aureus*



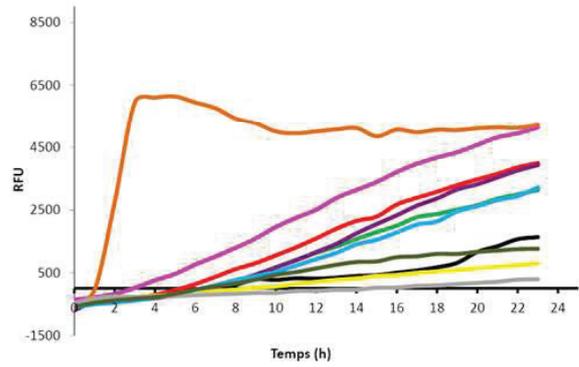
*S. epidermidis*



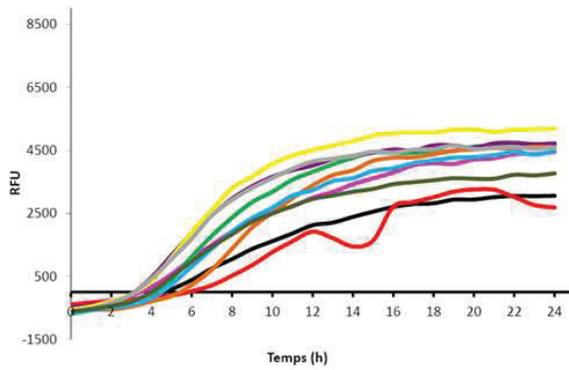
*E. faecalis*



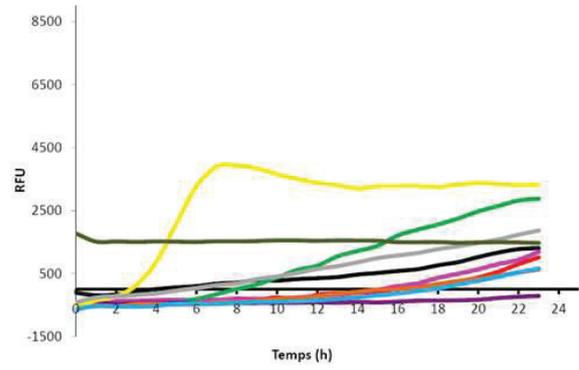
*K. rosea*



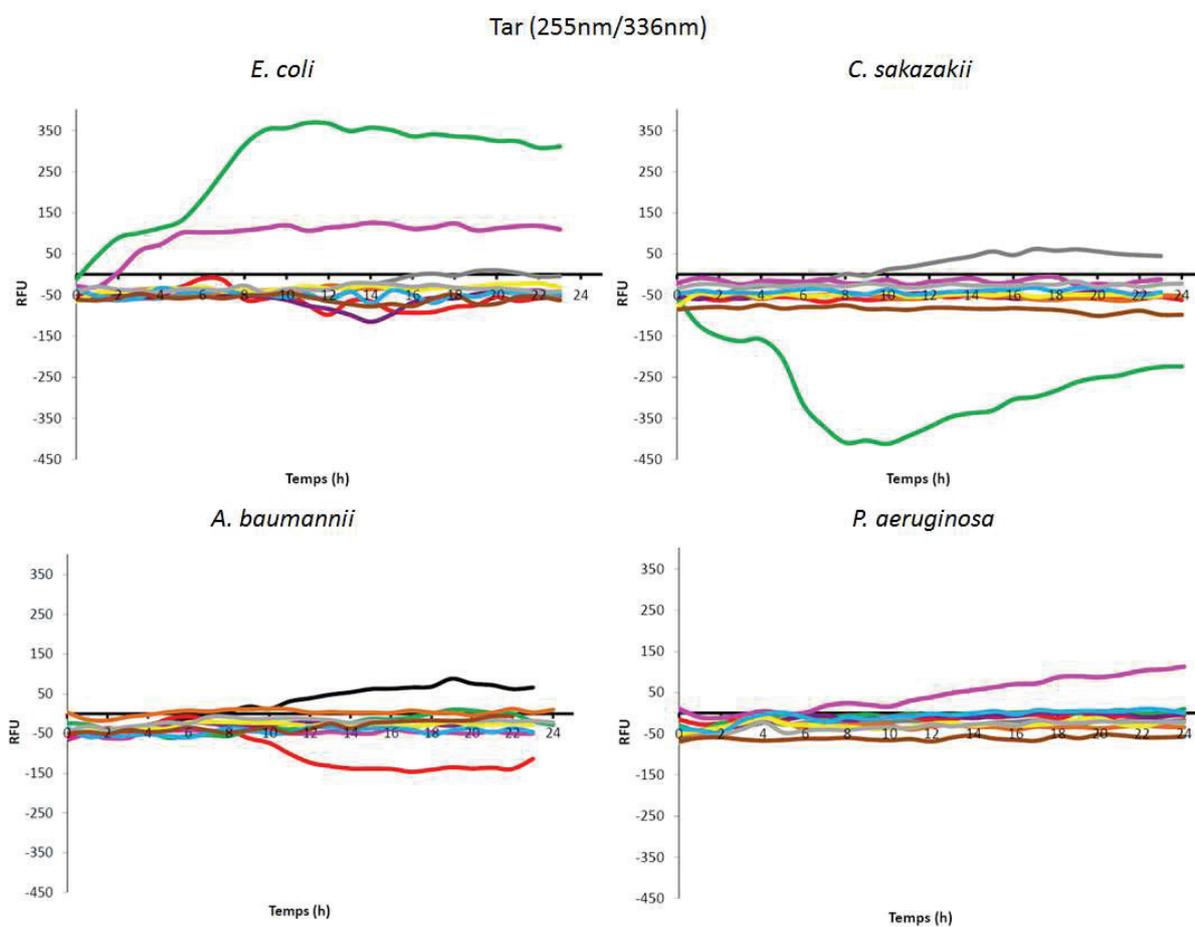
*C. albicans*



*G. candidum*



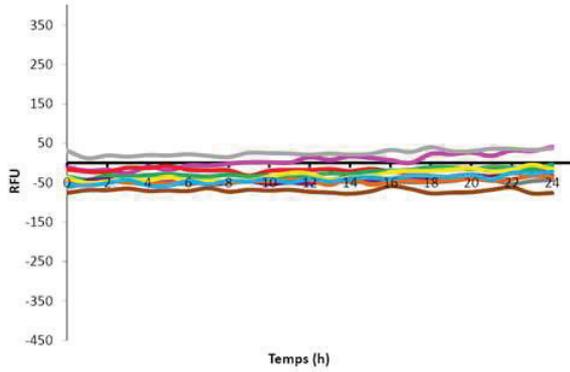
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB



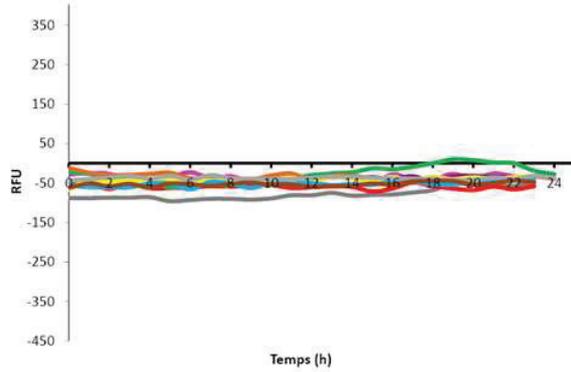
Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

Tar (255nm/336nm)

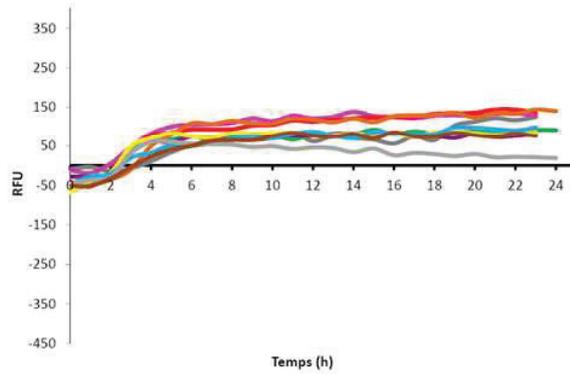
*S. aureus*



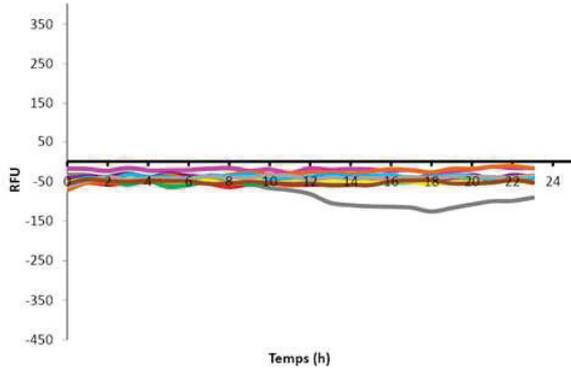
*S. epidermidis*



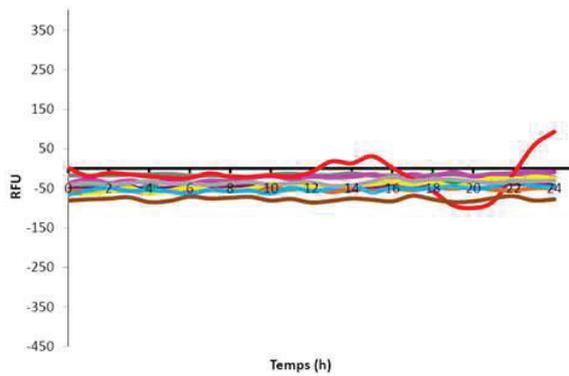
*E. faecalis*



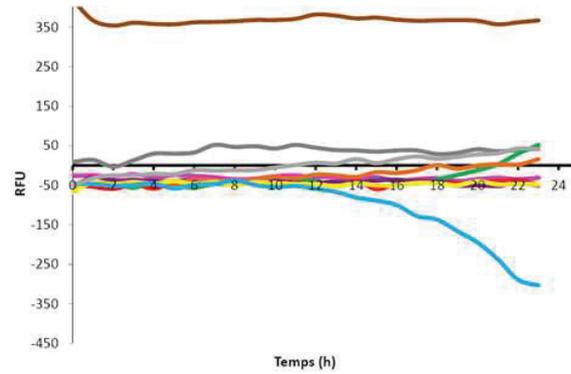
*K. rosea*



*C. albicans*



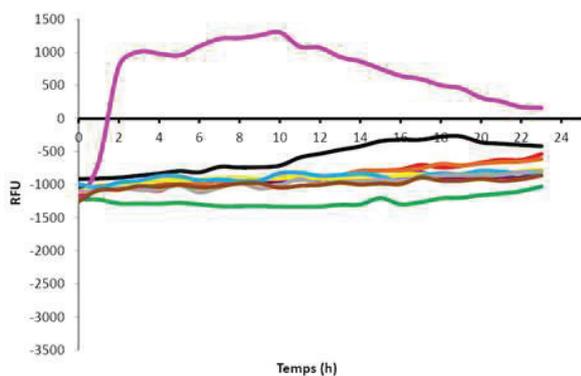
*G. candidum*



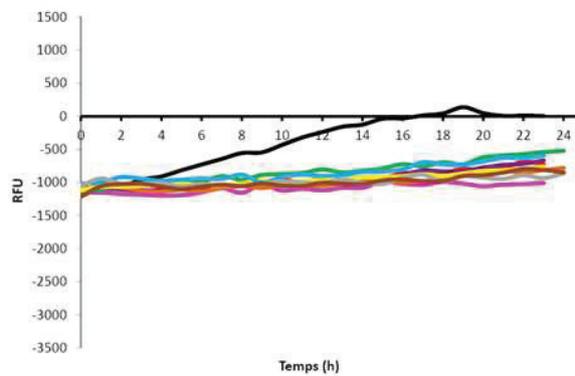
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

OrII (348nm/446nm)

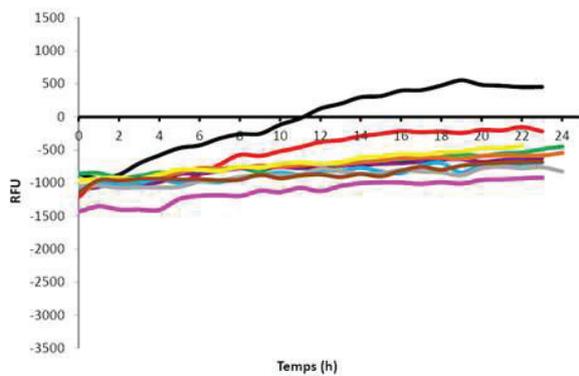
*E. coli*



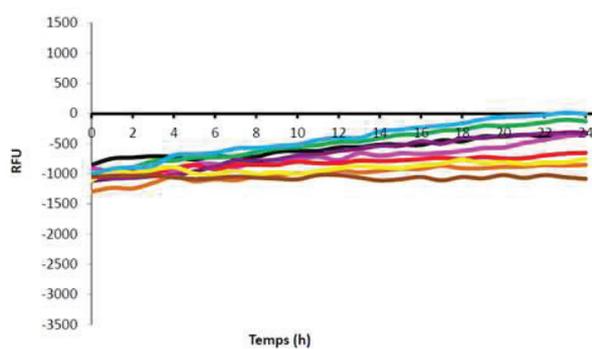
*C. sakazakii*



*A. baumannii*

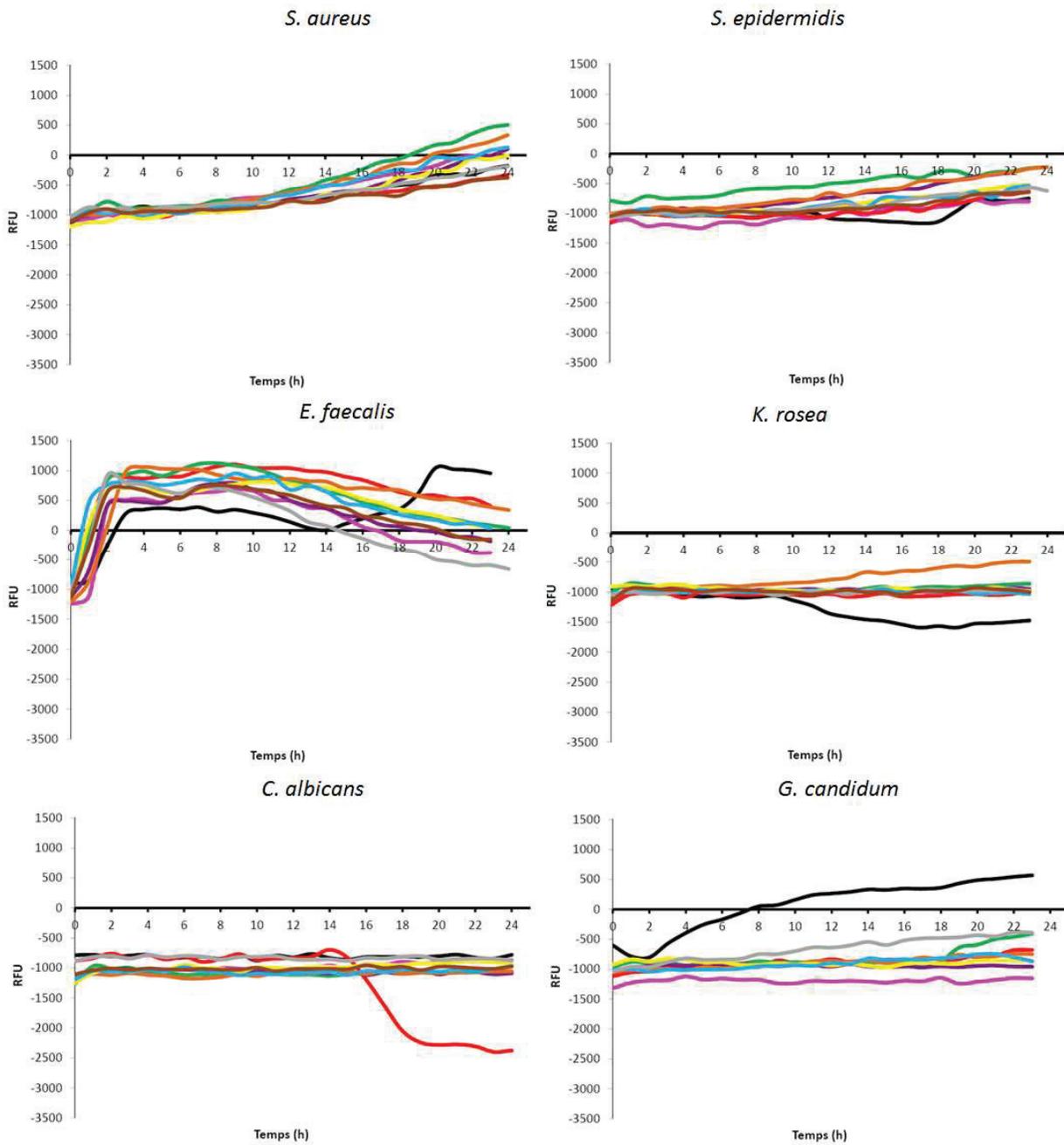


*P. aeruginosa*



Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

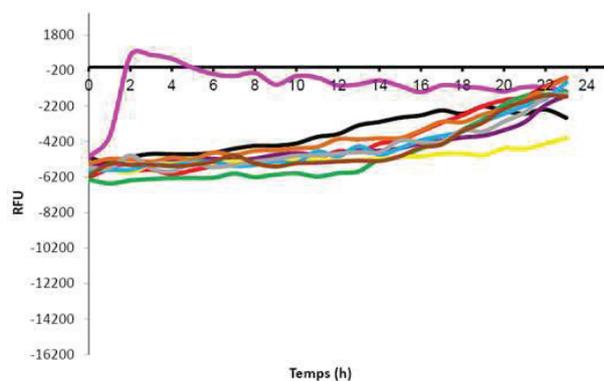
Orll (348nm/446nm)



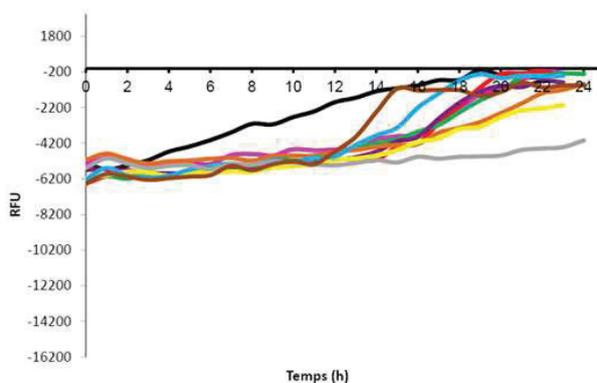
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

Orl (320nm/473nm)

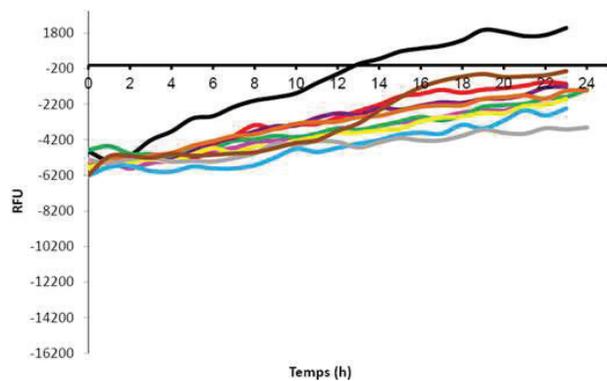
*E. coli*



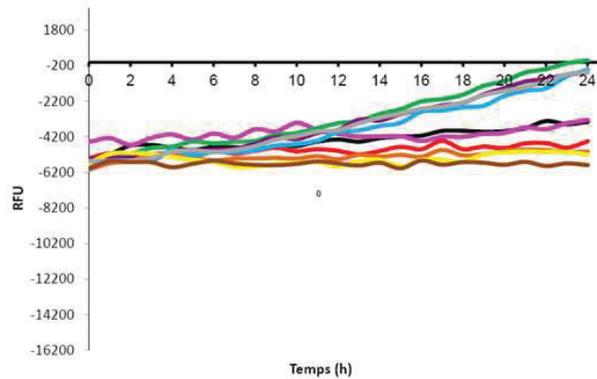
*C. sakazakii*



*A. baumannii*

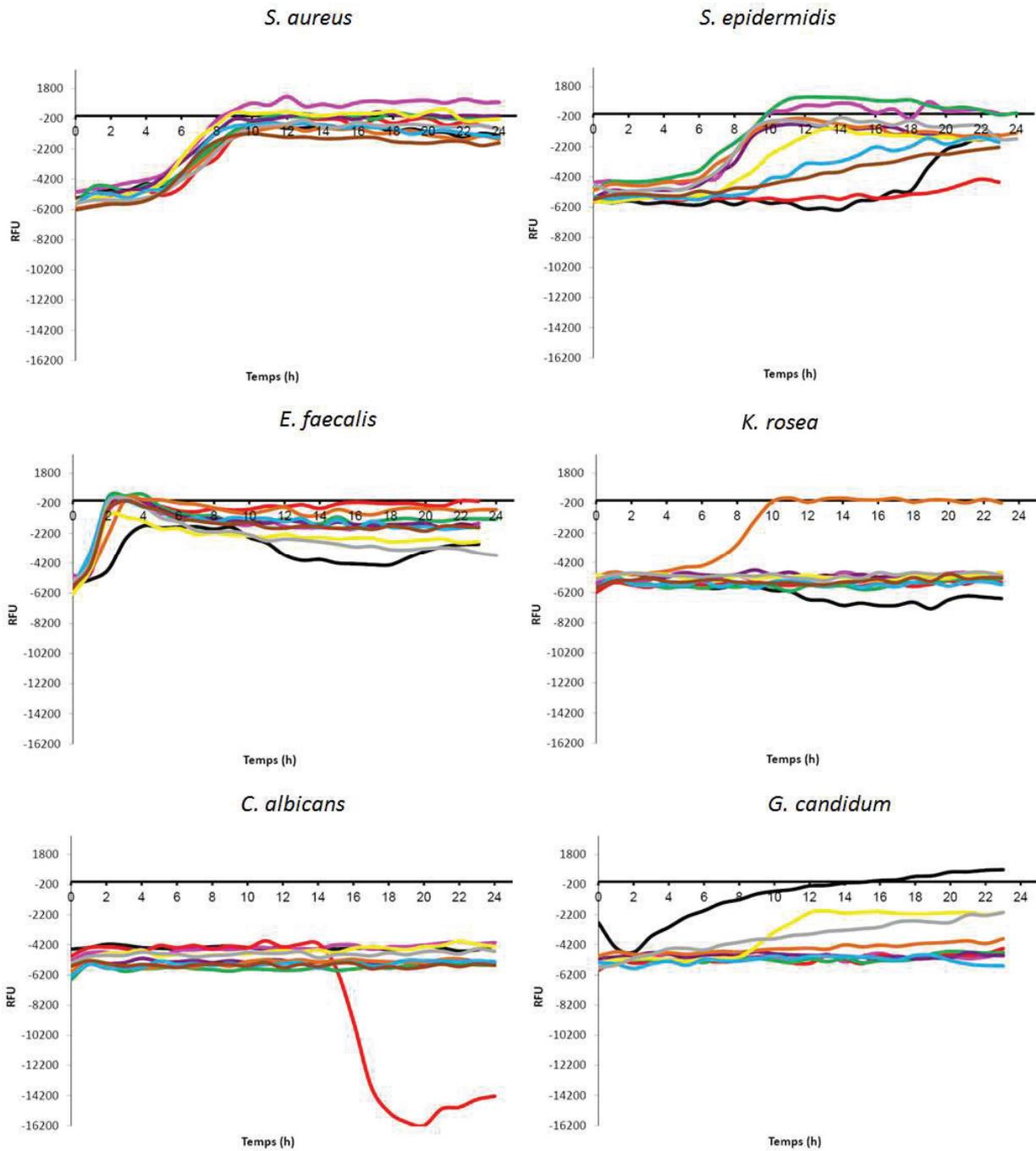


*P. aeruginosa*



Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

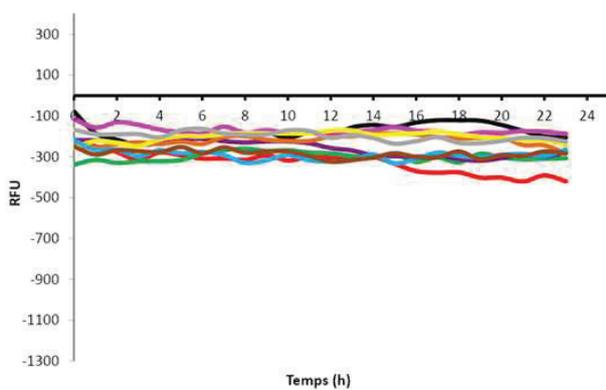
Orl (320nm/473nm)



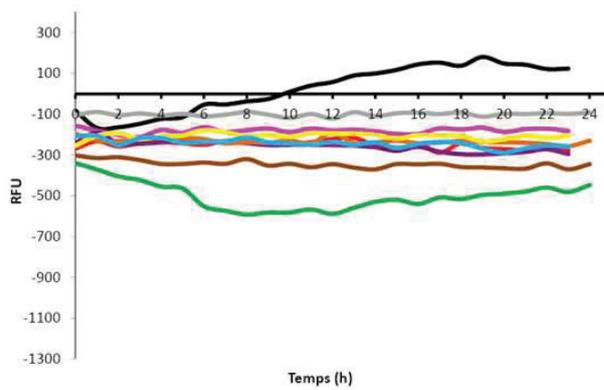
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

CMPAI (288nm/350nm)

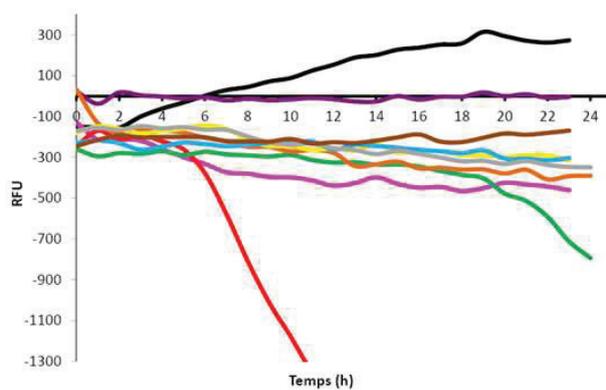
*E. coli*



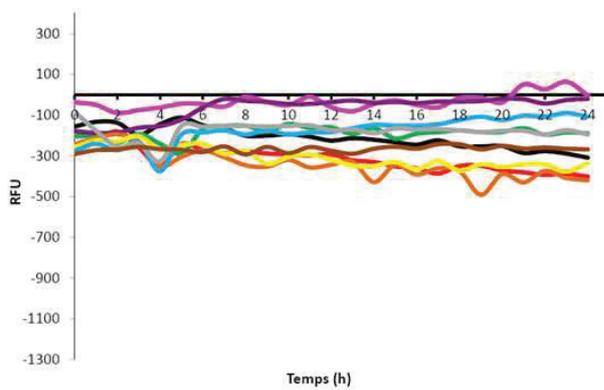
*C. sakazakii*



*A. baumannii*



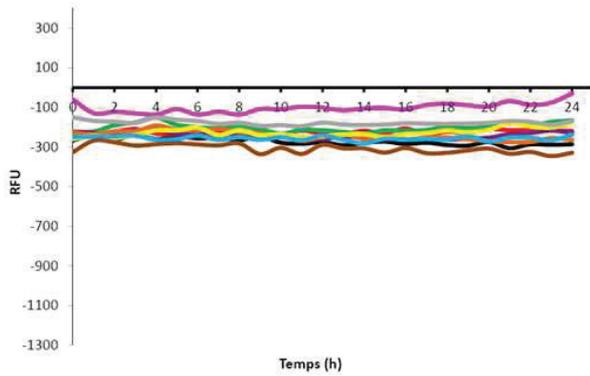
*P. aeruginosa*



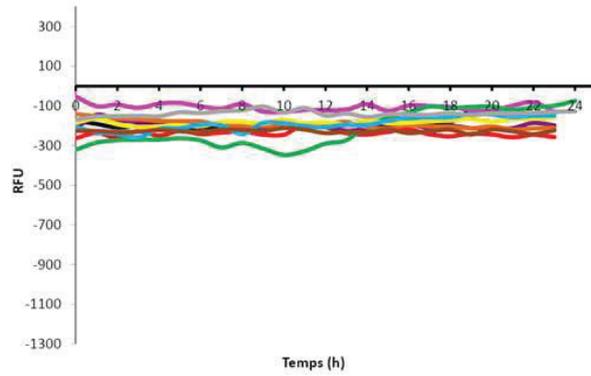
Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

CMPAI (288nm/350nm)

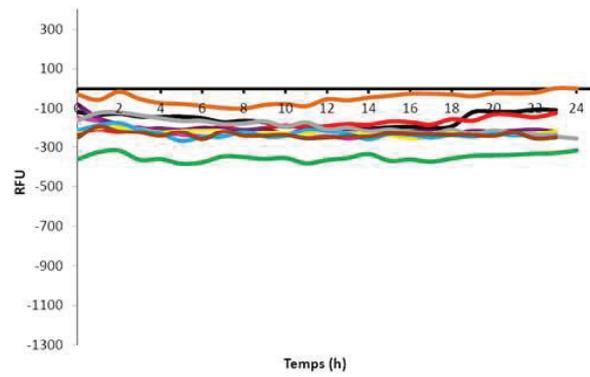
*S. aureus*



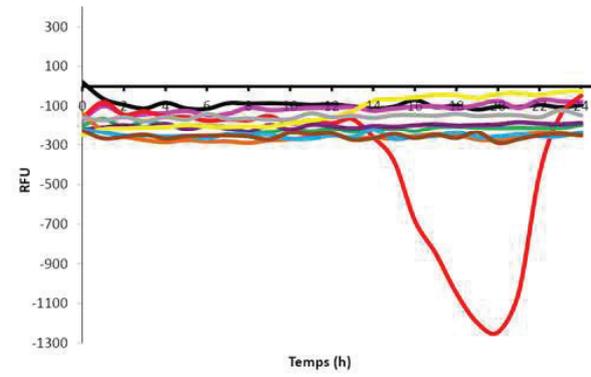
*S. epidermidis*



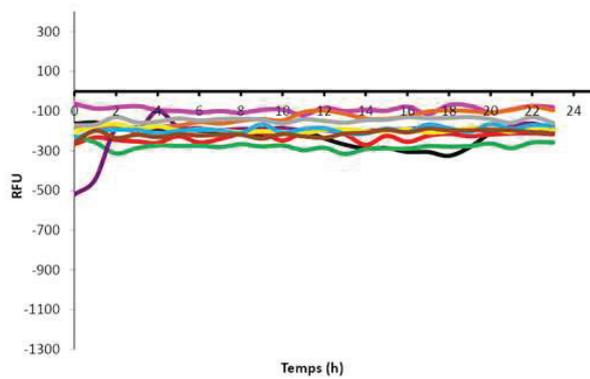
*E. faecalis*



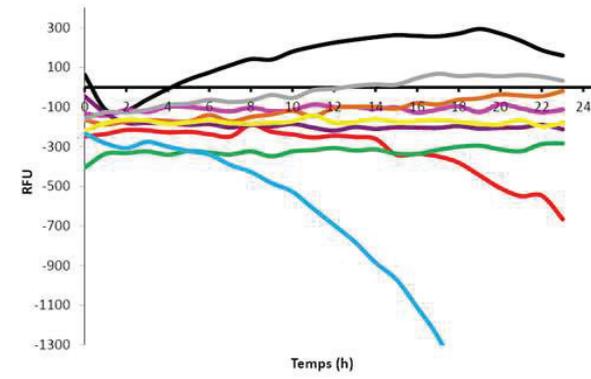
*K. rosea*



*C. albicans*

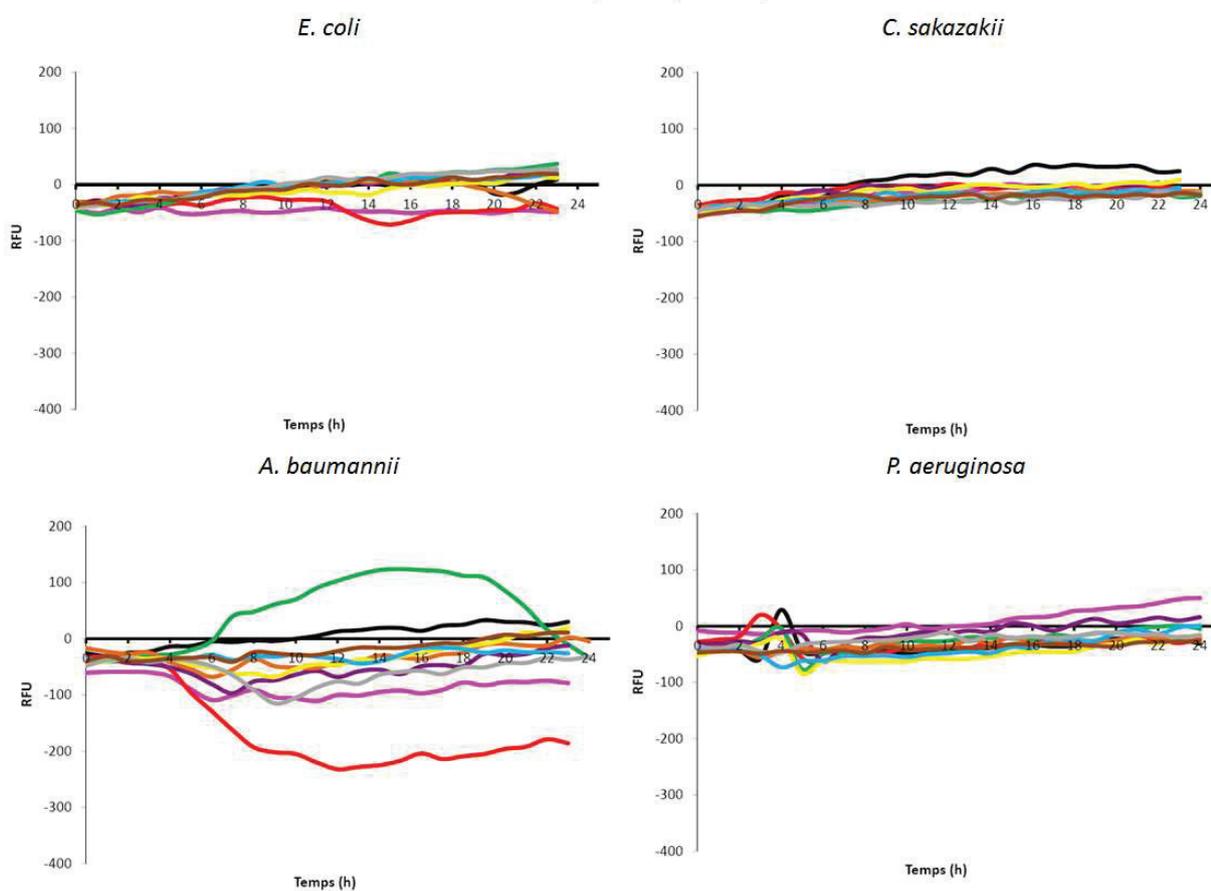


*G. candidum*



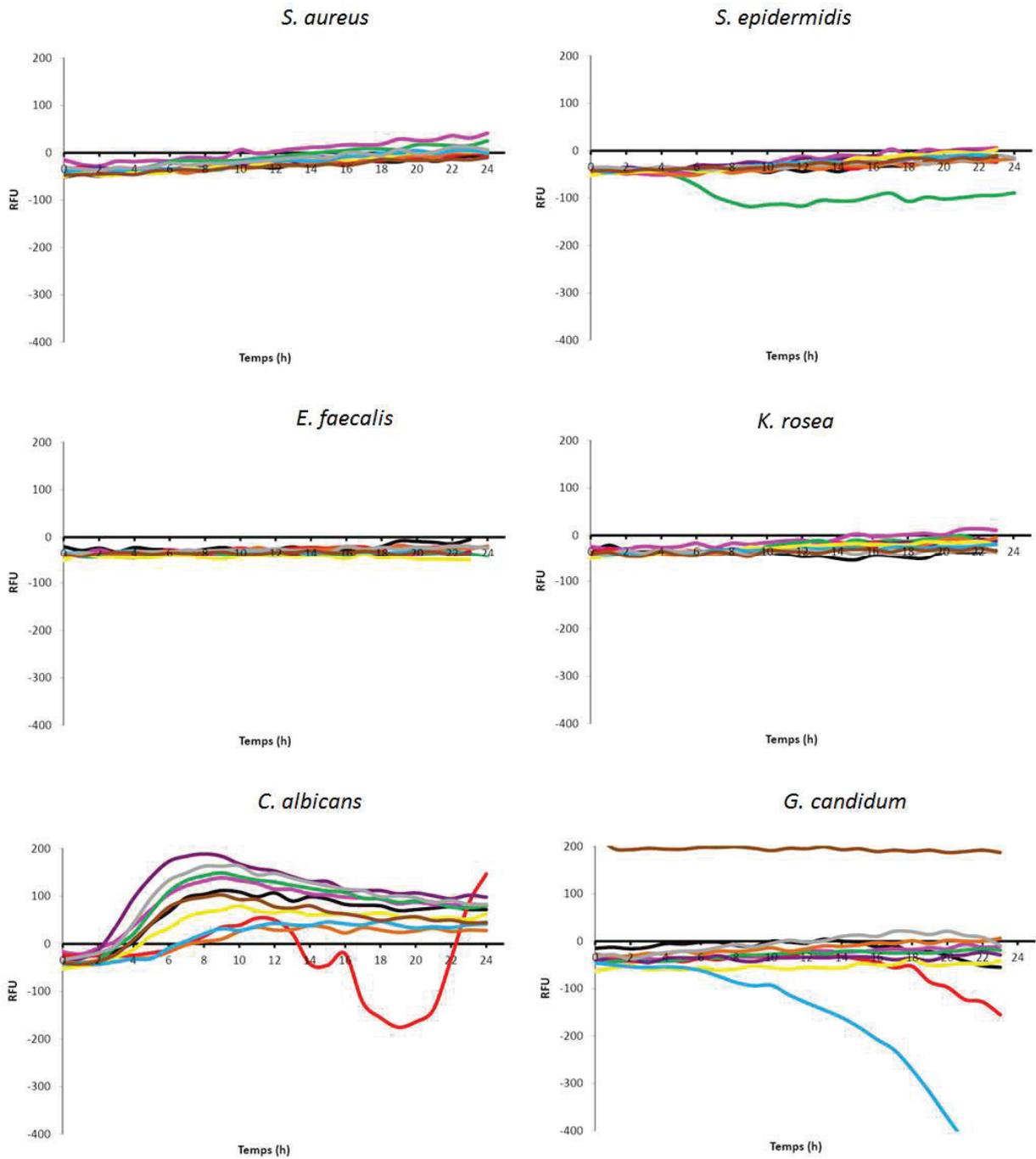
PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

PDMAC (295nm/363nm)



Annexe réduction sur 24h des 8 substrats par 4 espèces de bactérie à Gram négatif, 4 espèces de bactéries à Gram positif et 2 espèces de levures dans du TSB

PDMAC (295nm/363nm)





## Annexe Séquences peptidiques des protéines purifiées chez *E. coli*

>AzoR-gi|1787680-Escherichia\_coli-Accession number AA74494

MSKVLVLKSSILAGYSQSNQLSDYFVEQWREKHSAD EITVRDLAANPIPVLDGELVGALRPSDAPLTPRQQ  
EALALSDELIAELKAHDVIVIAAPMYNFNISTQLKNYFDLVARAGVTFRYTENGPEGLVTGKKAIVITSRG  
GIHKDGPTDLVTPYLSTFLGFIGITDVKFVFAEGIAYGPEMAAKAQSDAKAIDSIVSA

>NfsA-gi|1787075-Escherichia\_coli-Accession number AAC73938

MTPTIELICGHR SIRHFTDEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIIRITDKALREELVTLTGGQKHVA  
QAAEFWVFCADFNRLQICPDAQGLAEQLLLGVVDTAMMAQNALIAAESLGLGGVYIGGLRNNIEAVTKL  
LKLPQHVLPLFGLCLGWPADNPDLPRLPASILVHENSYQPLDKGALAQYDEQLAEYYLTRGSNNRRDTWS  
DHIRRTIIKESRPFILDY LHKQGWATR

>NfsB-gi|1786792-Escherichia\_coli-Accession number AAC73679

MDIISVALKRHSTKAFDASKKLTPEQAEQIKTLLQYSPSSTNSQPWHFIVASTEEGKARVAKSAAGNYVFN  
ERKMLDASHVVVFCAKTAMDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAKAANDKGRKFFADMHRKDLHDDAEWMAKQ  
VYLVGNFLLGVAALGLDAVPIEGFDAAILDAEFGLKEKGYTSLVVVVPVGHHSVEDFNATLPKSRLPQNIT  
LTEV

## Annexe Séquences peptidiques des protéines purifiées chez *E. faecalis*

>AzoA-gi | 81436396-Enterococcus\_faecalis-accession number Q831B2

MSKLLVVKAHPLTKEERSVRALETFLASYRETNPSEIEILDVYAPETNMPEIDEELLSAWGALRAGAAF  
ETLSENQQQKVARFNELTDQFLSADKVVIANPMWNLNVPTRLKAWVDTINVAGKTFQYTAEGPKPLTSGKK  
ALHIQSNGGFYEGKDFASQYIKAILNFIGVDQVDGLFIEGIDHFPDRAEELLNTAMTKATEYGKTF

>EF0404-gi | 29375040-Enterococcus\_faecalis

MTTYTTNDFSEIVFGRKSVRVYDETHKISHEEMLTMIQEATTAPSSVNMQPWRVVESEAGKEKPKPLIR  
FNTRQNETSSAMLLIFGDLNCHERGEIYINQAYASGKMPKEVRDQQLAAIIPHYESLSREQMNDIVKIDAS  
LAAMQFMLVARAHGYETNPIGGFEAEKLAETFGLDQERYVPMILSVGKGMETGYESVRLAPEKITTFE

>EF0648-gi | 29375249-Enterococcus\_faecalis

MMYQDVVRSRRSVDMPDVEIPKEELMAIIIEAMFAPNSTNLNSWRFLIVTEKEQKEALYEVSMQQPAVK  
GAAAVIILLGDLTAYTVANADEISAKAVAQGTMTTEEIRQGINENVSWYYDVSEEQKREWLMLDQGLVAMQL  
MLSAKDRGYDTVAMSGFETEAVRKLFNIEDHLVNGLIIPIGKAQTPGFETVRRDVSSEVVTWLD

>EF0655-gi | 29375254-Enterococcus\_faecalis

MSKFTEMMKNRRSIYALGENLPISKEEVTALVKEVVRESPTAFNSQTQRVVFLFGDAHKKLWAMTEDALKP  
LTPAEAFPNTQAKLQGFAAGAGTILFFEDTDIVKNLQDSFPLYADNFPVWSEQATGLTQANVWTALAQENI  
GANLQHYNPVIDEAVAAEWSIPANWNLRAQMVIIGSIEAPAGEKEYMEDSARFKEFN

>EF1181-gi | 29375756-Enterococcus\_faecalis

MNQTIEQLLSHRSVRHFKKQALTDKQKQQLITAAQAGSSSNFLQAYTIIIEIKDPELRRELGRLANCEDYVV  
NTGVFYVADVADLYRHATILSKEGQSLEPLKTPESLLVAADVTTIAAQNMAIAAESMDLGICYIGGIRNDLD  
TVAKRLSLPELTVPLFGLTIGVPETLNGVKPRMPFENILSENHYQSDKLTDMHTYDELLKDYASRSSNAQ  
TADWSQKSLSYFSYNRRPEVKIFLQKQGFVD

## Annexe séquençage des gènes clonés dans le vecteur pQE30.

Les séquençages ont été réalisés par la société GATC Biotech. Chaque séquence obtenue a été alignée avec la séquence du gène d'une souche entièrement séquencée de *E. coli* (souche K12 MG1655) et de *E. faecalis* (souche V583)

### Alignement nucléotidique de AzoR de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle

```

1
azoR_K12_MG1655 ATG-AGCAAG GTATTAGTTC TTAAATCCAG CATCCTGGCA GGGTACTCTC AGTCTAATCA
azoR87          ATGCAGCAAG GTATTAGTTC TTCAATCCAG CATCCTGGCA GGGTACTCTC AGTCTAATCA

61
azoR_K12_MG1655 GTTGTCCGAT TATTTTGGTG AACAAATGGCG CGAAAAGCAC TCCGCTGATG AAATCACCGT
azoR87          GTTGTCCGAT TATTTTGGTG AACAAATGGCG CGAAAAGCAC TCCGCTGATG AAATCACCGT

121
azoR_K12_MG1655 TCGCGACCTG GCTGCAAAATC CGATTCCGGT ACTGGATGGC GAACTGGTTG GCGCTCTGCG
azoR87          GCGTGACCTG GCTGCAAAATC CGATTCCGGT CCTGGATGGC GAACTGGTTG GTGCACTGCG

181
azoR_K12_MG1655 TCCGAGCGAT GCGCCGCTGA CTCGCGTCA GCAGGAAGCT CTGGCACTTT CCGATGAGTT
azoR87          TCCGAGCGAT GCGCCGCTGA CTCGCGTCA GCAGGAAGCT CTGGCGCTTT CCGATGAGCT

241
azoR_K12_MG1655 GATTGCCGAG CTGAAAGCCC ACGACGTTAT CGTTATTGCG GCACCGATGT ATAACITCAA
azoR87          GATTGCCGAG CTGAAAGCCC ACGACGTTAT CGTTATTGCG GCACCGATGT ATAACITCAA

301
azoR_K12_MG1655 CATCTCGACT CAGTTGAAAA ACTATTTTGA CCTGGTTGCC CGCGCAGGCG TTACTTTCCG
azoR87          TATCTCGACC CAGTTGAAAA ACTATTTTGA CCTGGTTGCA CTGCGAGGCG TTACTTTCCG

361
azoR_K12_MG1655 CTATACCGAG AACGGTCCGG AAGGTCTGGT AACGGGTAAA AAAGCCATCG TTATTACCAG
azoR87          CTATACCGAG AACGGTCCGG AAGGCCTGGT CACCGGTAAA AAAGCCATCG TTATCACCAG

421
azoR_K12_MG1655 CCGCGGCGGG ATCCACAAAG ATGGACCAAC GGACCTGGTG ACGCCGTATC TGTCCACGTT
azoR87          CCGCGGTGGG ATCCATAAAG ATGGCCCAAC GGATCTGGTG ACGCCGTATC TGTCCACATT

481
azoR_K12_MG1655 CCTCGGCTTT ATCGGCATTA CCGATGTGAA ATTTGTCTTC GCCGAAGGGA TCGCATACGG
azoR87          CCTGGGCTTT ATCGGCATTA CCGATGTGAA ATTTGTCTTC GCCGAAGGGA TCGCGTACGG

541
azoR_K12_MG1655 TCCGAAATG GCAGCGAAAG CACAGTCTGA CGCAAAGCA GCCATOGACA GCATTGTTTC
azoR87          CCGGAAATG GCAGCGAAAG CCGAGTCTGA CGCGAAAGCA GCCATOGACA GCATTGTTTC

601
azoR_K12_MG1655 TGCATAA--
azoR87          TGCATAA--
    
```

### Alignement protéique de AzoR de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle

```

1
AzoR_K12_MG1655 MSKVLVLKSS ILAGYSQSNQ LSDYFVEQWR EKHSADEITV RDLAANPIPV LDGELVGLR
AzoR_87         MSKVLVLQSS ILAGYSQSNQ LSDYFVEQWR EKHSADEITV RDLAANPIPV LDGELVGLR

61
AzoR_K12_MG1655 PSDAPLTPRQ QEALALSDEL IAEKHAHDVI VIAAPMYNFN ISTQLKNYFD LVARAGVTFR
AzoR_87         PSDAPLTPRQ QEALALSDEL IAEKHAHDVI VIAAPMYNFN ISTQLKNYFD LVARAGVTFR

121
AzoR_K12_MG1655 YTENGPEGLV TGKKAIVITS RGGIHKDGPT DLVTPYLSLF LGFIGITDVK FVFAEGIAYG
AzoR_87         YTENGPEGLV TGKKAIVITS RGGIHKDGPT DLVTPYLSLF LGFIGITDVK FVFAEGIAYG

181
AzoR_K12_MG1655 PEMAAKAQSD AKAAIDSIVS A
AzoR_87         PEM----- -
    
```

**Alignement nucléotidique de AzoA de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12  
selon l'algorithme Muscle**

1  
 azoA\_V583 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA\_ATCC19433 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA95 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA76 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA80 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA83 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA86 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA9501 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA98 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA00 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA04 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT  
 azoA07 ATGTCAAAAT TATTAGTTGT TAAAGCACAT CCATTAACAA AAGAAGAATC ACGCTCAGTT

61  
 azoA\_V583 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA\_ATCC19433 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA95 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA76 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA80 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA83 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA86 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA9501 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA98 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA00 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA04 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA  
 azoA07 CGTGC GTT AG AACATTTT AGCTTCATAC CGTGAAACAA ATCCATCAGA CGAAATCGAA

121  
 azoA\_V583 ATTTTAGATG TTTATGCCCC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA\_ATCC19433 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA95 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA76 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA80 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA83 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA86 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA9501 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA98 ATTTTAGATG TTTATGCCCC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA00 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA04 ATTTTAGATG TTTATGCCCC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT  
 azoA07 ATTTTAGATG TTTATGCACC AGAAACAAAC ATGCCGGAAA TCGATGAAGA ATTATTATCT

181  
 azoA\_V583 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA\_ATCC19433 GCTTGGGGTG CACTTCGAGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA95 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCG TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA76 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGTGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA80 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGTGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA83 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA86 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCG TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA9501 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA98 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA00 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGTGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA04 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA  
 azoA07 GCTTGGGGTG CACTTCGCGC TGGCGCAGCA TTTGAAACAT TAAGCGAAAA CCAACAACAA

241  
 azoA\_V583 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA\_ATCC19433 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA95 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA76 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA80 AAAGTAGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT TAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA83 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA86 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA9501 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA98 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA00 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA04 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT  
 azoA07 AAAGTGGCTC GTTTTAATGA ATTAAGTAT CAATTTTTAT CTGCAGACAA AGTAGTAATT

Annexe séquençage des gènes clonés dans le vecteur pQE30

301

azoA_V583	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA_ATCC19433	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA95	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA76	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCA	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA80	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA83	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA86	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA9501	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA98	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCA	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA00	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCA	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA04	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC
azoA07	GCTAATCCAA	TGTGGAACCT	AAACGTACCG	ACACGCTTAA	AAGCTTGGGT	AGATACAATC

361

azoA_V583	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA_ATCC19433	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA95	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA76	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGC
azoA80	AACGTTGCTG	GAAAAACCTT	CCAATATACA	GCAGAAGGAC	CAAAACCGCT	AACAAGTGGT
azoA83	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA86	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA9501	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA98	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA00	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGC
azoA04	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT
azoA07	AACGTTGCTG	GAAAAACATT	CCAATATACT	GCAGAAGGAC	CAAAACCTCT	AACAAGTGGT

421

azoA_V583	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA_ATCC19433	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA95	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA76	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA80	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGT	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA83	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA86	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA9501	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA98	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA00	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA04	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT
azoA07	AAAAAAGCCT	TACACATCCA	ATCAAATGGC	GGCTTCTACG	AAGGAAAAGA	TTTTGCTTCT

481

azoA_V583	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA_ATCC19433	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA95	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA76	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGTGTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA80	CAATATATTA	AAGOCATTCT	AAACTTCATT	GGTGTGATC	AAGTTGACAG	TTTATTCATC
azoA83	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGTGTGAGC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA86	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGTGTGAGC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA9501	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGTGTGAGC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA98	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA00	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGTGTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA04	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC
azoA07	CAATACATTA	AAGOGATTCT	AAACTTTATT	GGCGTTGATC	AAGTTGACGG	ATTATTCATC

541

azoA_V583	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA_ATCC19433	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA95	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA76	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGTGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	TATGACCAAA
azoA80	GAAGGAATTG	ATCATTCCC	TGATCGTGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACTAAA
azoA83	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA86	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA9501	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA98	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA00	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGTGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	TATGACCAAA
azoA04	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA
azoA07	GAAGGAATCG	ATCATTCCC	TGATCGCGCG	GAAGAACTTT	TAAACTACTGC	CATGACCAAA

PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe séquençage des gènes clonés dans le vecteur pQE30

```
601
azoA_V583      GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA_ATCC19433 GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCT--
azoA95         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA76         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA80         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA83         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA86         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA9501       GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA98         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA00         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA04         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
azoA07         GCAACTGAAT ACGGTAAAAC ATTCTAA
```

**Alignement nucléotidique de nfsA de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12  
selon l'algorithme Muscle**

```

1
nfsA_K12_MG1655 ATGACG-CCA ACCATTGAAC TTATTTGTGG CCATCGCTCC ATTCGCCATT TCACTGATGA
nfsA            ATGACGCCCA ACCATTGAAC TTATTTGTGG CCATCGCTCC ATTCGCCATT TCACTGATGA

61
nfsA_K12_MG1655 ACCCATTTCC GAAGCGCAGC GTGAGGCGAT TATTAACAGC GCCCGTGOGA CGTCCAGTTC
nfsA            ACCCATTTCC GAAGCGCAGC GTGAGGCGAT TATTAACAGC GCCCGTGOGA CGTCCAGTTC

121
nfsA_K12_MG1655 CAGTTTTTTG CAGTGCAGTA GCATTATTCG CATTACCGAC AAAGCGTTAC GTGAAGAACT
nfsA            CAGTTTTTTG CAGTGCAGTA GCATTATTCG CATTACCGAC AAAGCGTTAC GTGAAGAACT

181
nfsA_K12_MG1655 GGTGAOCGCTG ACCGGCGGGC AAAAACACGT AGCGCAAGCG GCGGAGTTCT GGGTGTTCGTG
nfsA            GGTGAOCGCTG ACCGGCGGGC AAAAACACGT AGCGCAAGCG GCGGAGTTCT GGGTGTTCGTG

241
nfsA_K12_MG1655 TGCCGACTTT AACCGCCATT TACAGATCTG TCCGGATGCT CAGCTCGGCC TGGCGGAACA
nfsA            TGCCGACTTT AACCGCCATT TACAGATCTG TCCGGATGCT CAGCTCGGCC TGGCGGAACA

301
nfsA_K12_MG1655 ACTGTTGCTC GGTGTCGTTG ATACGGCAAT GATGGCGCAG AATGCATTAA TCGCAGCGGA
nfsA            ACTGTTGCTC GGTGTCGTTG ATACGGCAAT GATGGCACAG AATGCATTAA CCGCAGCGGA

361
nfsA_K12_MG1655 ATCGCTGGGA TTGGGCGGGG TATATATCGG CGGCCTGCGC AATAATATTG AAGCGGTGAC
nfsA            ATCGCTGGGA TTGGGCGGGG TATATATCGG CGGCCTGCGC AATAATATTG AAGCGGTGAC

421
nfsA_K12_MG1655 GAAACTGCTT AAATTACCGC AGCATGTTCT GCCGCTGTTT GGGCTGTGCC TTGGCTGGCC
nfsA            GAAACTGCTT AAATTACCGC AGCATGTTCT GCCGCTGTTT GGGCTGTGCC TTGGCTGGCC

481
nfsA_K12_MG1655 TGCGGATAAT CCGGATCTTA AGCCGCGTTT ACCGGCCTCC ATTTTGGTGC ATGAAAACAG
nfsA            TGCGGATAAT CCGGATCTTA AGCCGCGTTT ACCGGCCTCC ATTTTGGTGC ATGAAAACAG

541
nfsA_K12_MG1655 CTATCAACCG CTGGATAAAG GCGCACTGGC GCAGTATGAC GAGCAACTGG CGGAATATTA
nfsA            CTATCAACCG CTGGATAAAG GCGCACTGGC GCAGTATGAC GAGCAACTGG CGGAATATTA

601
nfsA_K12_MG1655 CCTCACCCGT GGCAGCAATA ATCGCCGGGA TACCTGGAGC GATCATATCC GCCGAACAAT
nfsA            CCTCACCCGT GGCAGCAATA ATCGCCGGGA TACCTGGAGC GATCATATCC GCCGAACAAT

661
nfsA_K12_MG1655 CATTAAAGAA AGCCGCCCAT TTATTCTGGA TTATTTGCAC AAACAGGGTT GGGCGACGCG
nfsA            CATTAAAGAA AGCCGCCCAT TTATTCTGGA TTATTTGCAC AAACAGGGTT GGGCGACGCG

721
nfsA_K12_MG1655 CTAA
nfsA            CTAA

```

**Alignement protéique de NfsA de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12  
selon l'algorithme Muscle**

```

1
NfsA_K12_MG1655 MPTPIELICG HRSIRHFTDE PISEAQREAI INSARATSSS SFLQCSSIIR ITDKALREEL
NfsA            -MPTPIELICG HRSIRHFTDE PISEAQREAI INSARATSSS SFLQCSSIIR ITDKALREEL

61
NfsA_K12_MG1655 VTLTGGQKHV AQAABFWVFC ADFNRHLQIC PDAQLGLAEQ LLLGVVDTAM MAQNALIAAB
NfsA            VTLTGGQKHV AQAABFWVFC ADFNRHLQIC PDAQLGLAEQ LLLGVVDTAM MAQNALTAAB

121
NfsA_K12_MG1655 SLGLGGVYIG GLRNNIEAVT KLLKLPQHVL PLFGLCLGWP ADNPDLKPRL PASILVHENS
NfsA            SLGLGGVYIG GLRNNIEAVT ELLKLPQHVL PLFGLCLGWP ADNPDLKPRL PASILVHENS

181
NfsA_K12_MG1655 YQPLDKGALA QYDEQLAEYY LTRGSNNRRD TWSDHIRRTI IKESRPFILD YLHKQGWATR
NfsA            YQPLDKDALA QYDEQLAEYY LTRGSNNRRD TWSDHIRRTI IKESRPFILD YLHKQGWATR

```

**Alignement nucléotidique de nfsB de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12  
selon l'algorithme Muscle**

```

1
nfsB_K12_MG1655 ATGGATATCA TTTCTGTGCG CTTAAAGCGT CATTCCACTA AGGCATTTGA TGCCAGCAAA
nfsB            ATGGATATCA TTTCTGTGCG CTTAAACCGT TTTTCCACTA AGGCATTTGA TGCCAGCAAA

61
nfsB_K12_MG1655 AAAC TTACCC CGGAACAGGC CGAGCAGATC AAAAOGCTAC TGCAATACAG CCCATCCAGC
nfsB            AAAC TTACCC CGGAACAGGC CGAGCAGATC AAAACTCTAC TGCAATACAG CCCATCCAGC

121
nfsB_K12_MG1655 ACCAACTCCC AGCCGTGGCA TTTTATTGTT GCCAGCACGG AAGAAGGTAA AGCGCGTGTT
nfsB            ACCAACTCCC AGCCGTGGCA TTTTATTGTT GCCAGCACGG AAGAAGGTAA AGCGCGTGTT

181
nfsB_K12_MG1655 GCCAAATCCG CTGCCGGTAA TTACGTGTTT AACGAGCGTA AAATGCTTGA TGCTTCGCAC
nfsB            GCCAAATCCG CTGCCGATAA TTACGTGTTT AACGAGCGTA AAATGCTTGA TGCTTCGCAC

241
nfsB_K12_MG1655 GTCGTGGTGT TCTGTGCAA AACCOCGATG GACGATGCTT GGCTGAAGCT GGTGTGTTGAC
nfsB            GTCGTGGTGT TCTGTGCAA AACCOCGATG GACGATGCTT GGCTGAAGCT GGTGTGTTGAC

301
nfsB_K12_MG1655 CAGGAAGATG CCGATGGCCG CTTTGCCACG CCGGAAGCGA AAGCCCGGAA CGATAAAGGT
nfsB            CAGGAAGATG CCGATGGCCG CTTTGCCACG CCGGAAGCGA AAGCCCGGAA CGATAAAGGT

361
nfsB_K12_MG1655 CGCAAGTTCT TCGCTGATAT GCACCGTAAA GATCTGCATG ATGATGCAGA GTGGATGGCA
nfsB            CGCAAGTTCT TCGCCGATAT GCACCGTAAA GATCTGCATG ATGATGCAGA GTGGATGGCA

421
nfsB_K12_MG1655 AAACAGGTTT ATCTCAACGT CGGTAAC TTCGCTCGCG TGCCGGCTCT GGGTCTGGAC
nfsB            AAACAGGTTT ATCTCAACGT CGGTAAC TTCGCTCGCG TGCCGGCTCT GGGTCTGGAC

481
nfsB_K12_MG1655 GGGTACCCA TCGAAGGTTT TGACGCGCC ATCCTCGATG CAGAATTTGG TCTGAAAGAG
nfsB            GGGTGCCCA TCGAAGGTTT TGACGCGCC ATCCTCGATG AAGAATTTGG TCTGAAAGAG

541
nfsB_K12_MG1655 AAAGGCTACA CCGTCTGGT GGTGTTCCG GTAGGTCATC ACAGCGTTGA AGATTTTAAC
nfsB            AAAGGCTACA CCGTCTGGT GGTGTTCCG GTGGGTCATC ACAGCGTTGA AGATTTTAAC

601
nfsB_K12_MG1655 GCTACGCTGC CGAAATCTCG TCTGCGCAA AACATCACCT TAACCGAAGT GTAA
nfsB            GCTACGCTGC CGAAATCTCG TCTGCGCAG AACATTACCT TAACCGAAGT GTAA

```

**Alignement protéique de NfsB de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12  
selon l'algorithme Muscle**

```

1
NfsB_K12_MG1655 MDIISVALKR HSTKAPDASK KLTPEQAEQI KTL LQYSPSS TNSQPWHFIV ASTEEGKARV
NfsB            MDIISVALNR FSTKAPDASK KLTPEQAEQI KTL LQYSPSS TNSQPWHFIV ASTEEGKARV

61
NfsB_K12_MG1655 AKSAAGNYVF NERKMLDASH VVVVCAKTAM DDVWLKLVVD QEDADGRFAT PEAKAANDKG
NfsB            AKSAADNYVF NERKMLDASH VVVVCAKTAM DDAWLKLVVD QEDADGRFAT PEAKAANDKG

121
NfsB_K12_MG1655 RKFFADMHRK DLHDDAEWMA KQVYLVGNF LLGVAALGLD AVPIEGFDAA ILDAEFGLEKE
NfsB            RKFFADMHRK DLHDDAEWMA KQVYLVGNF LLGVAALGLD AVPIEGFDAA ILDEEFGLEKE

181
NfsB_K12_MG1655 KGYTSLVVVP VGHHSVEDFN ATLPKSRLPQ NITLTEV
NfsB            KGYTSLVVVP VGHHSVEDFN ATLPKSRLPQ NITLTEV

```

**Alignement nucléotidique de EF0404 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12**

```

1
EF0404_V583 ATGACAACAT ATACAAOGAA TGATTTTTC A GAGATTGTTT TTGGCOGCAA ATCGGTTCCG GTGTACGATG
EF0404_    ATGACAACAT ATACAAOGAA TGATTTTTC A GAGATTGTTT TTGGCOGCAA ATCGGTTCCG GTGTACGATG

71
EF0404_V583 AAACCCATAA AATTTCTCAT GAAGAAATGT TAACAATGAT TCAAGAAGCG ACCACCGCCC CTTCTTCTGT
EF0404_    AAACCCATAA AATTTCTCAT GAAGAAATGT TAACAATGAT TCAAGAAGCG ACCACTGCCC CTTCTTCTGT

141
EF0404_V583 TAACATGCAG CCATGGCGTT TTGTCGTAGT GGAAAGTGAA GCAGGCAAAG AAAAATTAAA ACCCTTAATT
EF0404_    TAACATGCAG CCATGGCGTT TTGTCGTAGT GGAAAGTGAA GCAGGCAAAG AAAAATTAAA ACCCTTAATT

211
EF0404_V583 CGCTTTAATA CGCGTCAAAA TGAACATCT TCTGCAATGC TCTTAATTTT TGGTGATTTA AACTGCCATG
EF0404_    CGCTTTAATA CGCGTCAAAA TGAACATCT TCTGCAATGC TCTTAATTTT TGGTGATCTA AACTGCCATG

281
EF0404_V583 AGCGAGGAGA GGAGATTTAC AATCAAGCCT ATGCTAGTGG TAAAATGCCT AAGGAAGTGC GGGACCAACA
EF0404_    AAGCAGGAGA GGAAATTTAC AATCAAGCCT ATGCTAGTGG TAAAATGCCT AAGGAAGTGC GGGACCAACA

351
EF0404_V583 ATTAGCAGCC ATTATTCCCC ATTATGAAAG TTTAAGTAGA GAACAAATGA ATGACATCGT AAAAATTGAT
EF0404_    ATTAGCAGCC ATTATTCCCC ATTATGAAAG TTTAAGCAGA GAACAAATGA ATGACATCGT AAAAATTGAT

421
EF0404_V583 GCGAGTTTAG CAGCTATGCA ATTTATGTTA GTGGCCCGAG CTCACGGATA TGAACAAAT CCAATCGGTG
EF0404_    GCGAGTTTAG CAGCTATGCA ATTTATGTTA GTGGCACGAG CTCACGGATA TGAACAAAT CCAATCGGTG

491
EF0404_V583 GTTTTGAAGC GGAAAAATTA GCCGAAACAT TTGGTTTAGA TCAAGAGCGC TATGTCCCAG TAATGATTTT
EF0404_    GTTTTGAAGC GGAAAAATTA GCCGAAACAT TTGGTTTAGA TCAAGAGCGC TATGTCCCAG TAATGATTTT

561
EF0404_V583 ATCTGTGGGT AAGGGCATGG AAACCTGGTTA TGAATCTGTT CGTTTAGCAC CAGAAAAAAT CACGACATTT
EF0404_    ATCTGTGGGT AAGGGCATGG AAACCTGGCTA TGAATCTGTT CGTTTAGCAC CAGAAAAAAT CACGACATTT

631
EF0404_V583 GAATAG
EF0404_    GAATAG

```

**Alignement protéique de EF0404 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12**

```

1
EF0404_V583 MTTYTTNDFS BIVFGRKSVR VYDETHKISH BEMLTMIQEA TTAPSSVNMQ PWRFVVVESE AGKEKLIKPLI
EF0404_    MTTYTTNDFS BIVFGRKSVR VYDETHKISH BEMLTMIQEA TTAPSSVNMQ PWRFVVVESE AGKEKLIKPLI

71
EF0404_V583 RFNTRQNETS SAMLLIFGDL NCHERGEEIY NQAYASGKMP KEVRDQQLAA IIPHYBSLSR EQMNDIVKID
EF0404_    RFNTRQNETS SAMLLIFGDL NCHERGEEIY NQAYASGKMP KEVRDQQLAA IIPHYBSLSR EQMNDIVKID

141
EF0404_V583 ASLAAMQFML VARAHGYETN PIGGFBAEKL AETPGLDQER YVPVMILSVG KGMETGYESV RLAPEKITTF
EF0404_    ASLAAMQFML VARAHGYETN PIGGFBAEKL AETPGLDQER YVPVMILSVG KGMETGYESV RLAPEKITTF

211
EF0404_V583 E
EF0404_    E

```

**Alignement nucléotidique de EF0648 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle**

```

1
EF0648_V583  ATGATGTATC AAGATGTTGT TCGCAGCCGC CGCTCAGTTC GGGATTTTAT GCCAGATGTT GAGATTCCTA
EF0648      -----
71
EF0648_V583  AAGAGGAATT AATGGCCATA ATTGAGGAAG CGATGTTTCG CCAAATAGT ACCAATTTAA ATTCATGGCG
EF0648      AAGAGGAATT AATGGCCATA ATTGAGGAAG CGATGTTTCG CCAAATAGT ACCAATTTAA ATTCATGGCG
141
EF0648_V583  TTTTAAATT  GTCACAGAAA AAGAACAAAA AGAGGCCCTT TACGAAGTTT CGATGCAACA ACCAGCAGTT
EF0648      TTTTAAATT  GTCACAGAAA AAGAACAAAA AGAGGCCCTT TACGAAGTTT CGATGCAACA ACCAGCAGTT
211
EF0648_V583  AAAGGGCAG  CGGCGGTGAT TATTTTATTA GGTGATTTGA CTGCTTATAC AGTGGCCAAT GCAGATGAAA
EF0648      AAAGGGCAG  CGGCGGTGAT TATTTTATTA GGTGATTTGA CTGCTTATAC AGTGGCCAAT GCAGATGAAA
281
EF0648_V583  TCAGTGCTAA AGCTGTCGCA CAAGGAACGA TGACGGAAGA AATTCGTCAA GGAATTAATG AAAATGTTTC
EF0648      TCAGTGCTAA AGCTGTCGCA CAAGGAACGA TGACGGAAGA AATTCGTCAA GGAATTAATG AAAATGTTTC
351
EF0648_V583  TTGGTACTAT GATGTTAGCG AAGAACAAAA AAGAGAGTGG CTAATGTTAG ACCAAGGCTT AGTTGCGATG
EF0648      TTGGTACTAT GATGTTAGCG AAGAACAAAA AAGAGAGTGG CTAATGTTAG ACCAAGGCTT AGTTGCGATG
421
EF0648_V583  CAGCTGATGC TTTCTGCAAA AGATCGAGGC TATGATACTG TGGCGATGTC TGGTTTTGAA ACAGAAGCTG
EF0648      CAGCTGATGC TTTCTGCAAA AGATCGAGGC TATGATACTG TGGCGATGTC TGGTTTTAAA ACAGAAGCGG
491
EF0648_V583  TTCGCAAGTT ATTTAATATT GAGGATCATT TAGTGAACGG ACTGATTATT CCGATTGGCA AAGCTCAAAC
EF0648      TTCGCAAGTT ATTTAATATT GAGGATCATT TAGTGAACGG ACTGATTATT CCGATTGGCA AAGCTCAAAC
561
EF0648_V583  ACCCGGCTTT GAAACAGTCC GACGAGATGT TTCAGAAGTA GTAAC TTGGT TAGATTAA
EF0648      ACCCGGCTTT GAAACAGTCC GACGAGATGT TTCAGAAGTA GTAAC TTGGT TAGATTAA

```

**Alignement protéique de EF0648 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle**

```

1
EF0648_V583  MMYQDVVRSR RSVRDFMPDV EIPKEELMAI IEBAMPAPNS TNLNSWRFLI VTEKEQKEAL YEVSMMQPPAV
EF0648      -----DFMPDV EIPKEELMAI IEBAMPAPNS TNLNSWRFLI VTEKEQKEAL YEVSMMQPPAV
71
EF0648_V583  KGAAAVIILL GDLTAYTVAN ADEISAKAVA QGTMTEBIRQ GINENVSWYY DVSEBQKREW LMLDQGLVAM
EF0648      KGAAAVIILL GDLTAYTVAN ADEISAKAVA QGTMTEBIRQ GINENVSWYY DVSEBQKREW LMLDQGLVAM
141
EF0648_V583  QLMLSAKDRG YDTVAMSGFE TEAVRKL FNI EDHLVNGLI I PIGKAQTPGF ETVRRDVSEV VTWLD
EF0648      QLMLSAKDRG YDTVAMSGFK TEAVRKL FNI EDHLVNGLI I PIGKAQTPGF ETVRRDVSEV VTWLD

```



**Alignement nucléotidique de EF1181 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle**

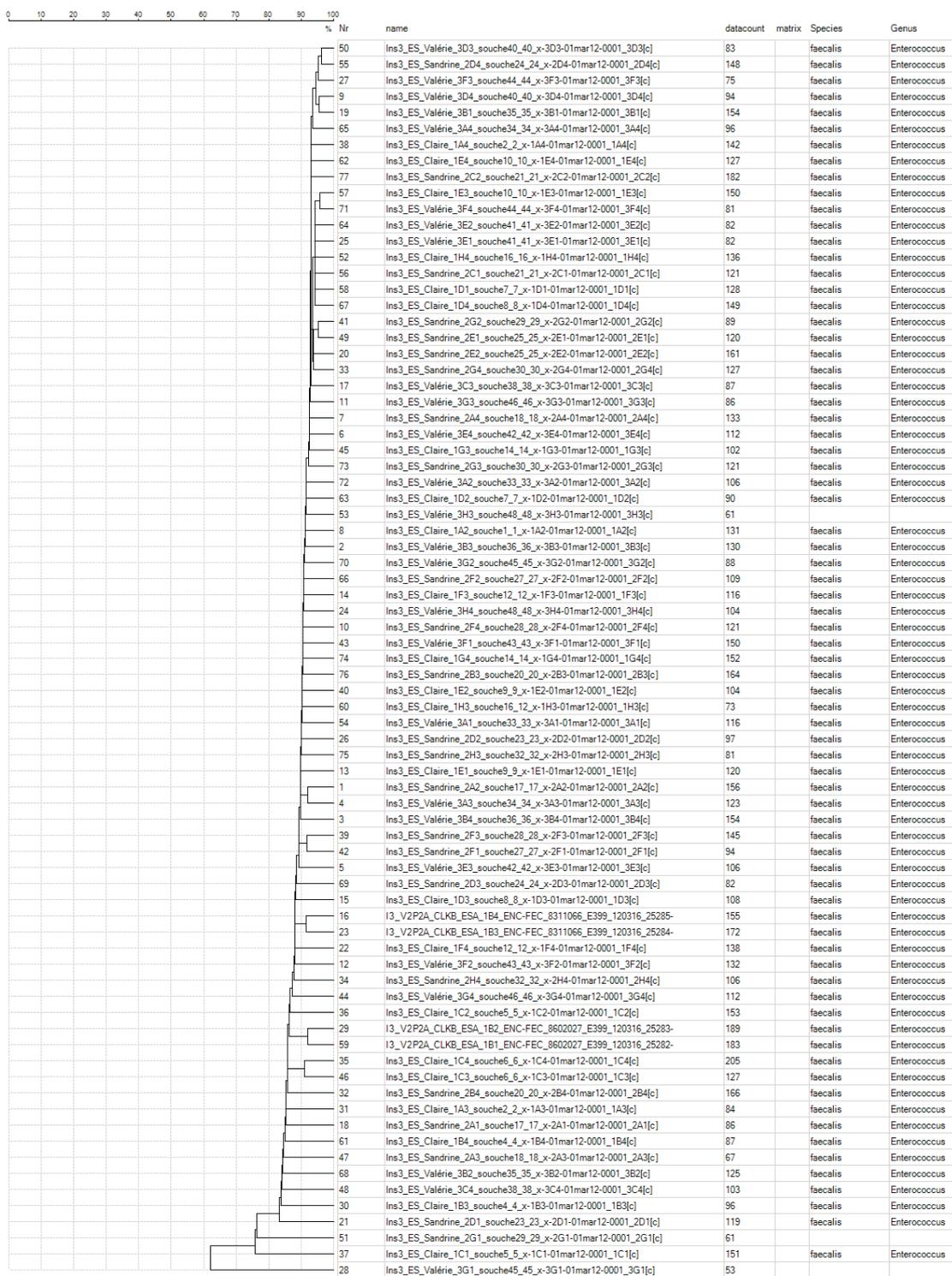
	1								
EF1181_V583	ATGAATCAAA	CAATCGAACA	ATTACTAAGT	CACCGTTCCG	TTCGTCAATT	TAAAAAGCAA	GCCTTAACGG		
EF1181	ATGAATCAAA	CAATCGAACA	ATTACTAAGT	CACCGTTCCG	TTCGTCAATT	TAAAAAGCAA	GCCTTAACGG		
	71								
EF1181_V583	ACAAGCAGAA	ACAACAGTTA	ATTACTGCAG	CTCAAGCAGG	ATCAAGCTCC	AATTTTTTAC	AAGCTTATAC		
EF1181	ACAAGCAGAA	ACAACAGTTA	ATTACTGCAG	CTCAAGCAGG	ATCAAGCTCC	AATTTTTTAC	AAGCTTATAC		
	141								
EF1181_V583	AATTATAGAA	ATCAAAGATC	CTGAGCTACG	CAGAGAATTG	GGACGTTTAG	CGAATTGTGA	AGACTATGTC		
EF1181	AATTATTGAA	ATCAAAGATC	CTGAGCTACG	CAGAGAATTG	GGACGTTTAG	CGAATTGTGA	AGACTATGTT		
	211								
EF1181_V583	GTTAAACTCTG	GTGTGTTCTA	TGTTTTTGTT	GCTGATTTGT	ATCGTCATGC	AACGATTTTG	TCAAAAGAGG		
EF1181	GTTAAACTCTG	GTGTGTTCTA	TGTTTTTGTT	GCTGATTTGT	ATCGTCATGC	AACGATTTTG	TCAAAAGAGG		
	281								
EF1181_V583	GGCAATCATT	GGAACCCCTA	AAGACACCAG	AATCATTATT	AGTAGCTGCC	GTTGATACAA	CGATTGCTGC		
EF1181	GGCAATCATT	GGAACCCCTA	AAGACACCAG	AATCATTATT	AGTAGCTGCC	GTTGATACAA	CGATTGCTGC		
	351								
EF1181_V583	GCAAAAACATG	GCCATTGCGG	CTGAATCTAT	GGATTTAGGG	ATTTGTTATA	TGGCGGCAT	TCGAAATGAC		
EF1181	GCAAAAACATG	GCCATTGCGG	CTGAATCTAT	GGATTTAGGG	ATTTGTTATA	TGGCGGCAT	TCGAAATGAC		
	421								
EF1181_V583	TTAGACACAG	TAGCCAAACG	CTTATCTTTG	CCTGAATTAA	CTGTACCACT	TTTCGGATTA	ACAATCGGTG		
EF1181	TTAGACACAG	TAGCCCAACG	CTTATCTTTG	CCTGAATTAA	CTGTACCACT	TTTCGGATTA	ACGATTGGCG		
	491								
EF1181_V583	TACCAGAAAC	GTTAAATGGT	GTAAAACCCAC	GGATGCCTTT	TGAAAATATT	TTAAGTGAAA	ATCACTACCA		
EF1181	TACCAGAAAC	GTTAAATGGT	GTAAAACCCAC	GGATGCCTTT	TGAAAATATT	TTAAGCGAAA	ATCGCTACCA		
	561								
EF1181_V583	ATCAGACAAA	TTGACAGATA	TGCACACATA	TGATGAATTA	TTAAAAGATT	ATTATGCCAG	CCGCTCAAGT		
EF1181	ACCAGACAAA	TTGACAGATA	TGCACAGCGTA	TGATGAATTA	TTAAAAGATT	ATTATGCCAG	CCGCTCAAGT		
	631								
EF1181_V583	AACGCCAAA	CAGCGGATTG	GTCACAGAAA	TCTTTGTCCT	ATTTTCTTA	TAATCGTOGC	CCAG-AAGTA		
EF1181	AACGCCAAA	CAGCGGATTG	GTCACAGAAA	TCTTTGTCCT	ATTTTCTTA	TAATCGTOGC	CCAGAAAGTA		
	701								
EF1181_V583	AAAATTTTCT	TGCAAAAACA	AGGATTTGAT	GTCTAA					
EF1181	AAAATTTTCT	TGCAAAAACA	AGGA-TTGAT	GTCTAA					

**Alignement protéique de EF1181 de la souche ECO87 sur celle de la souche ECOK12 selon l'algorithme Muscle**

	1							
EF1181_V583	MNQTIQQLS	HRSVRHFQKQ	ALTDKQKQQL	ITAAQAGSSS	NFLQAYTIIE	IKDPELRREL	GRLANCBYV	
EF1181	-----	----RHFKQ	ALTDKQKQQL	ITAAQAGSSS	NFLQAYTIIE	IKDPELRREL	GRLANCBYV	
	71							
EF1181_V583	VNTGVFVYFV	ADLYRHATIL	SKEGQSLEPL	KTPESLLVAA	VDTTIAAQN	AIAAESMDLG	ICYIGGIRND	
EF1181	VNTGVFVYFV	ADLYRHATIL	SKEGQSLEPL	KTPESLLVAA	VDTTIAAQN	AIAAESMDLG	ICYIGGIRND	
	141							
EF1181_V583	LDTVAKRLSL	PELTVPLFGL	TIGVPETLNG	VKPRMPFENI	LSENHYQSDK	LTDHMYDEL	LKDYASRSS	
EF1181	LDTVAQRLSL	PELTVPLFGL	TIGVPETLNG	VKPRMPFENI	LSENRYQPK	LTDHMYDEL	LKDYASRSS	
	211							
EF1181_V583	NAQTADWSQK	SLSYFSYNRR	PEVKIFLQKQ	GFDV				
EF1181	NAQTADWSQK	SLSYFSYNRR	PEVKIFLQKQ	GFDV				

Annexe arbre phylogénétique des souches d'*E. faecalis* obtenus d'après l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

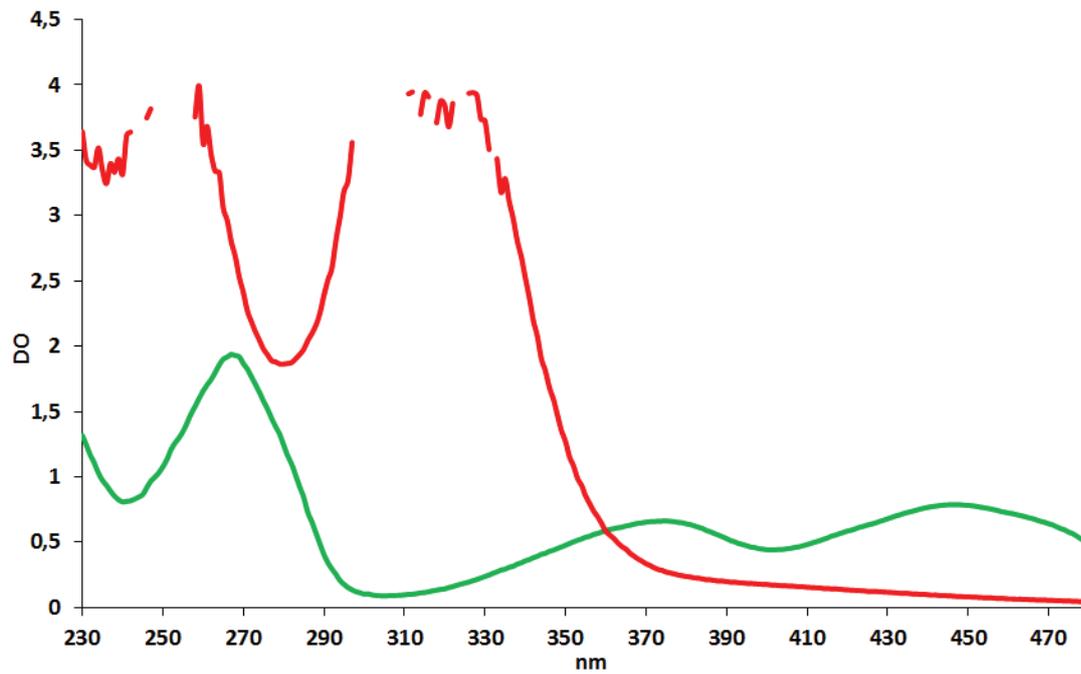
Annexe arbre phylogénétique des souches d'*E. faecalis* obtenus d'après l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF





## Annexe Spectres d'absorbance du FMN et FMNH<sub>2</sub>

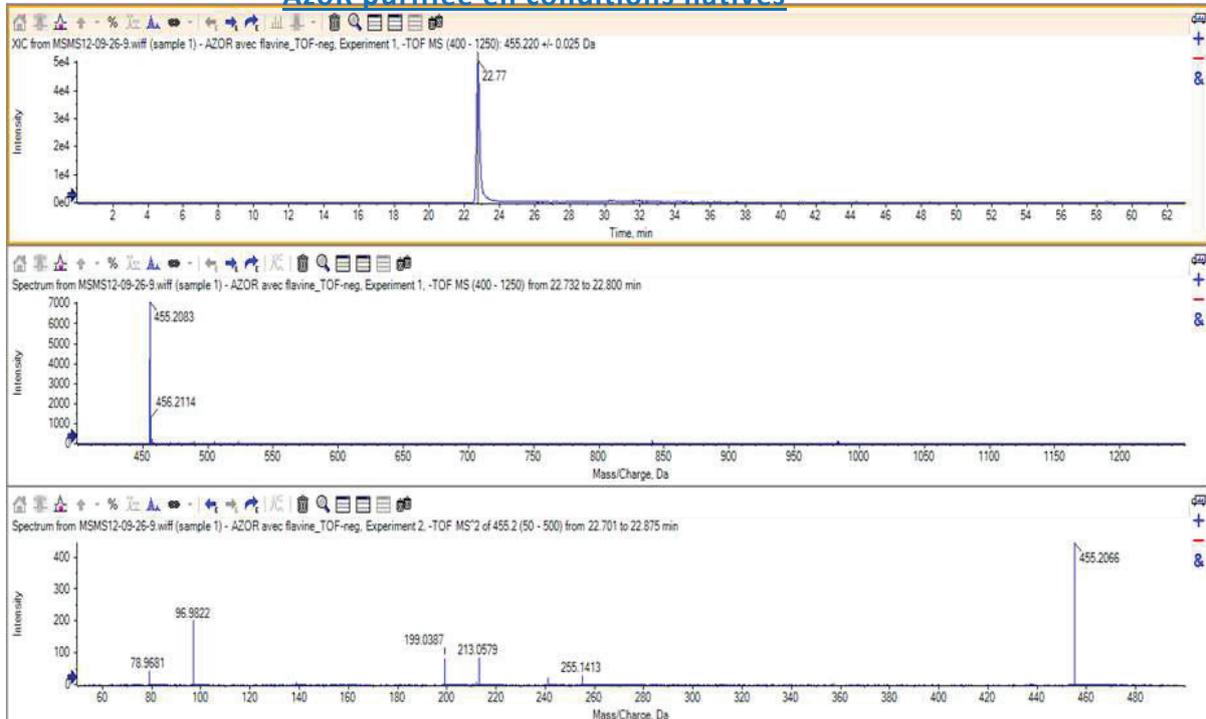
Les spectres d'absorbance du FMN (vert) et FMNH<sub>2</sub> (rouge) ont été obtenus avec 100μM de chaque molécules. Le spectre du FMNH<sub>2</sub> est en saturation, la concentration utilisée était trop importante.



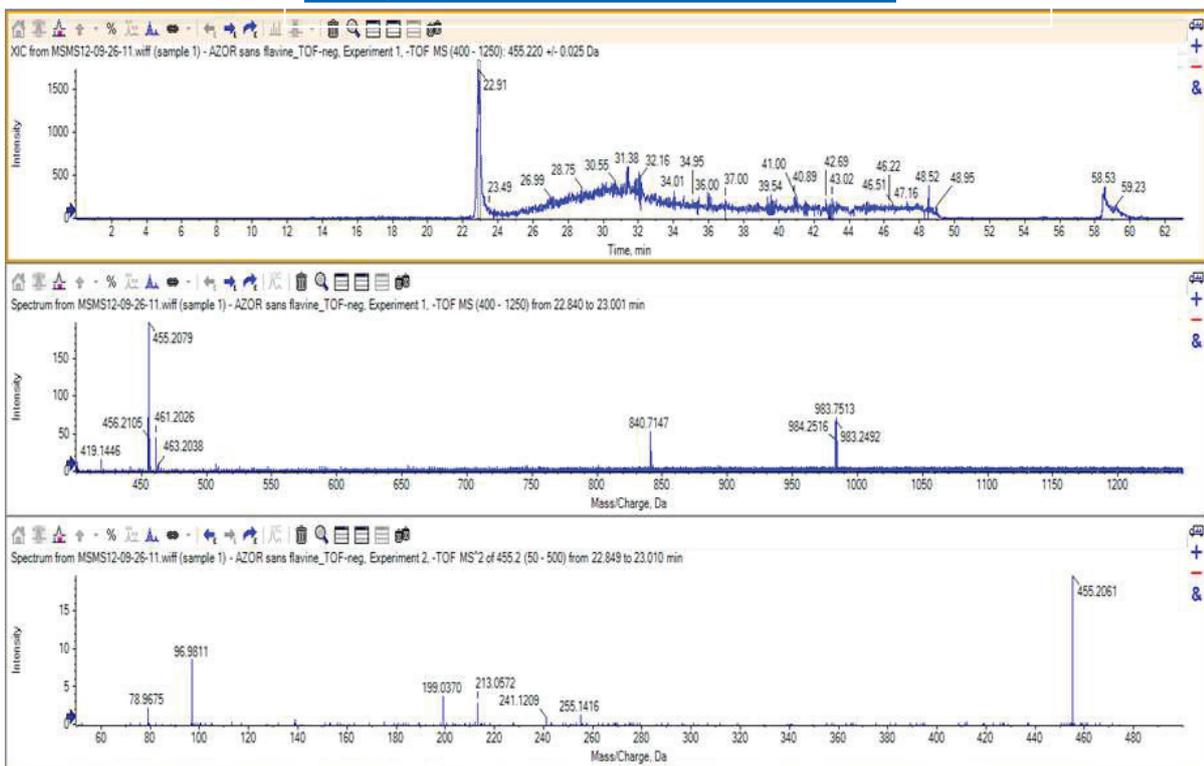


## Annexe Spectres LC-ESI-MS des échantillons de protéines purifiées en conditions natives et dénaturantes

### AzoR purifiée en conditions natives

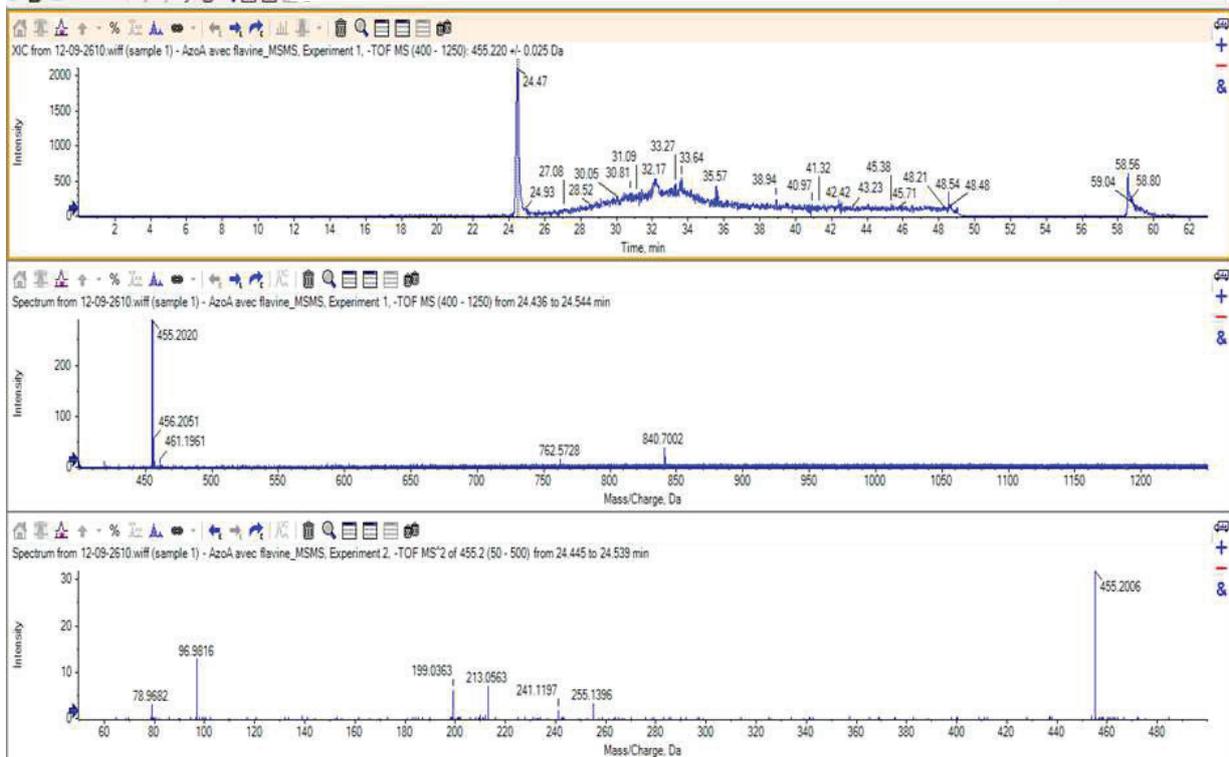


### AzoR purifiée en conditions dénaturantes

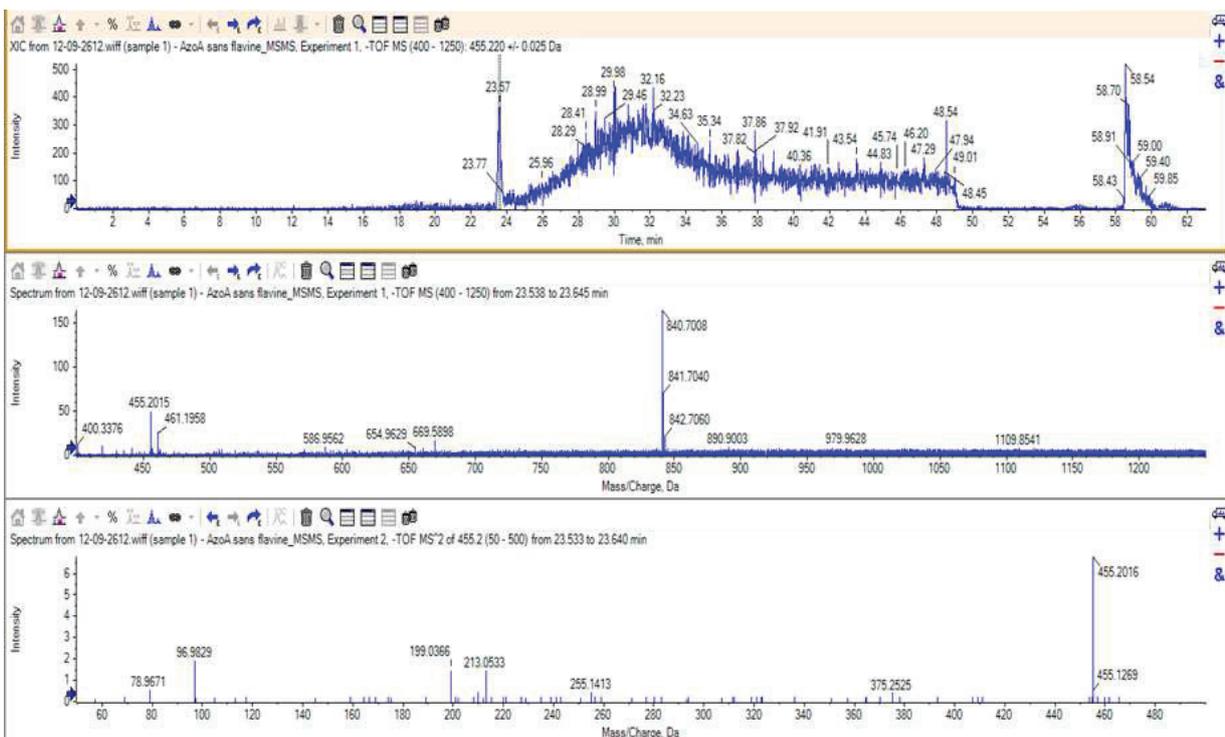


PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe Spectres LC-ESI-MS des échantillons de protéines purifiées en conditions natives et dénaturantes

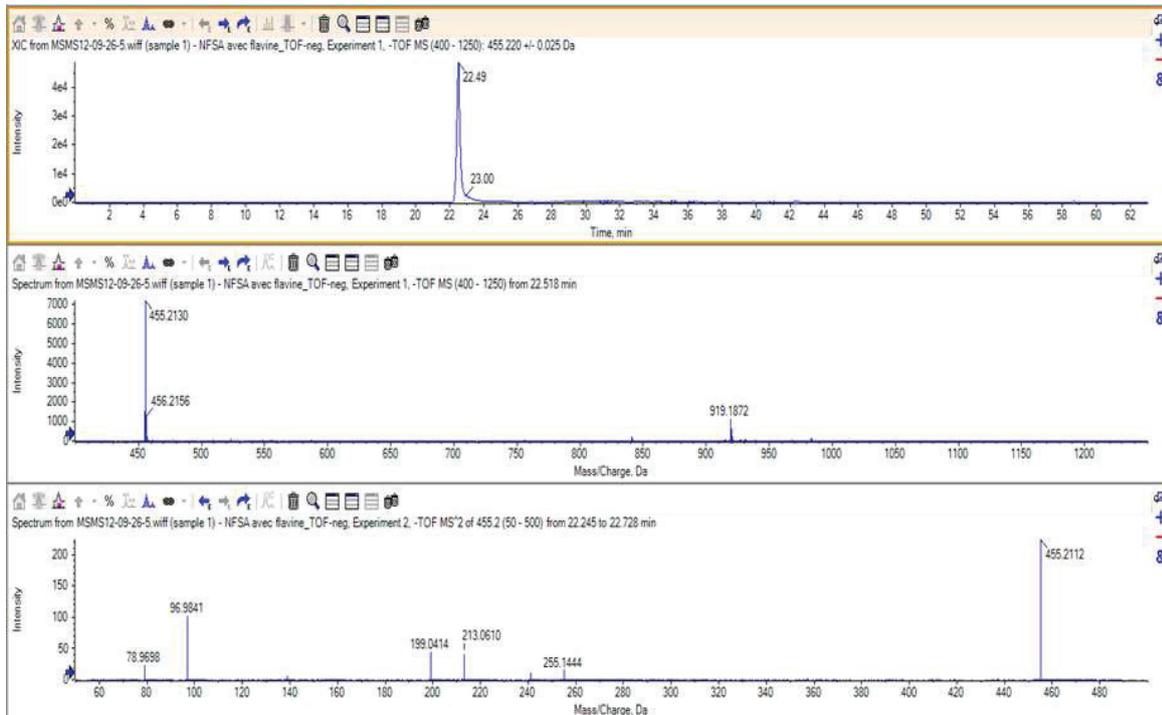
**AzoA purifiée en conditions natives**



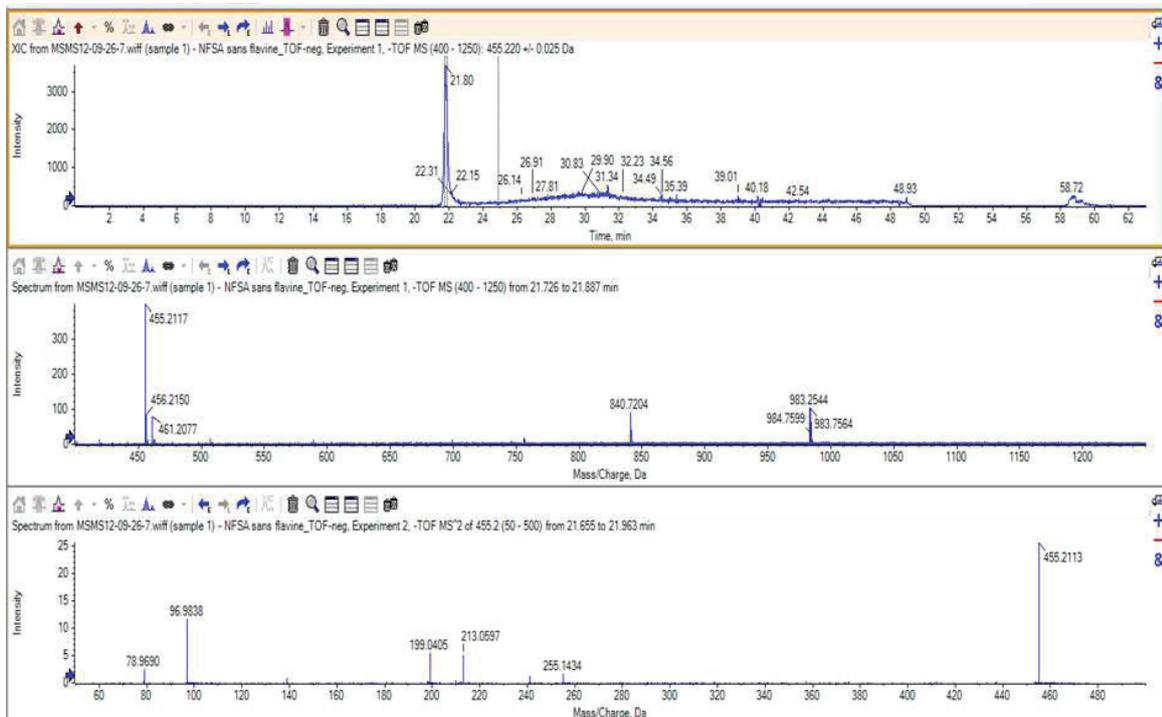
**AzoA purifiée en conditions dénaturantes**



**NfsB purifiée en conditions natives**



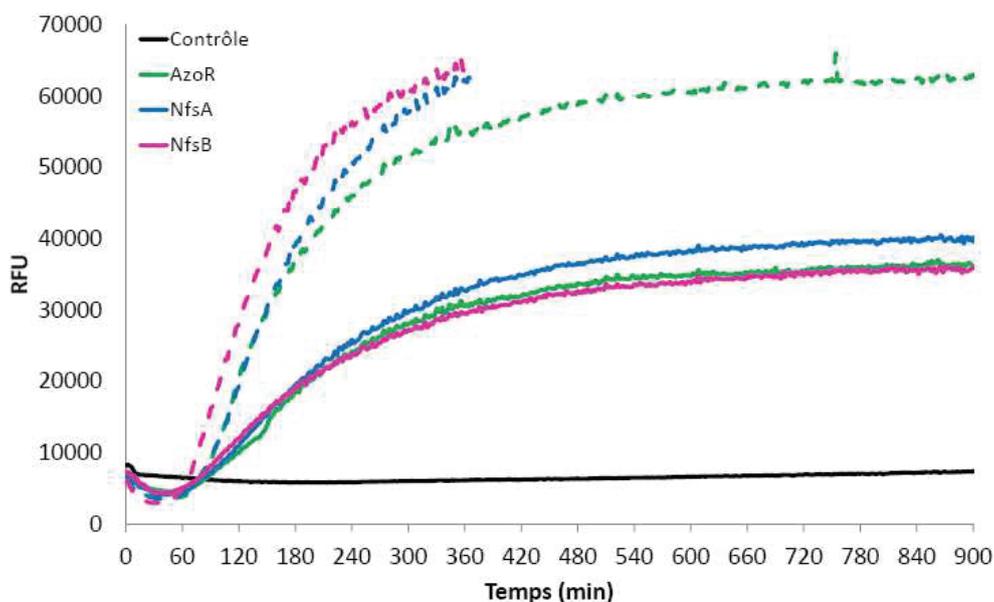
**NfsB purifiée en conditions dénaturantes**



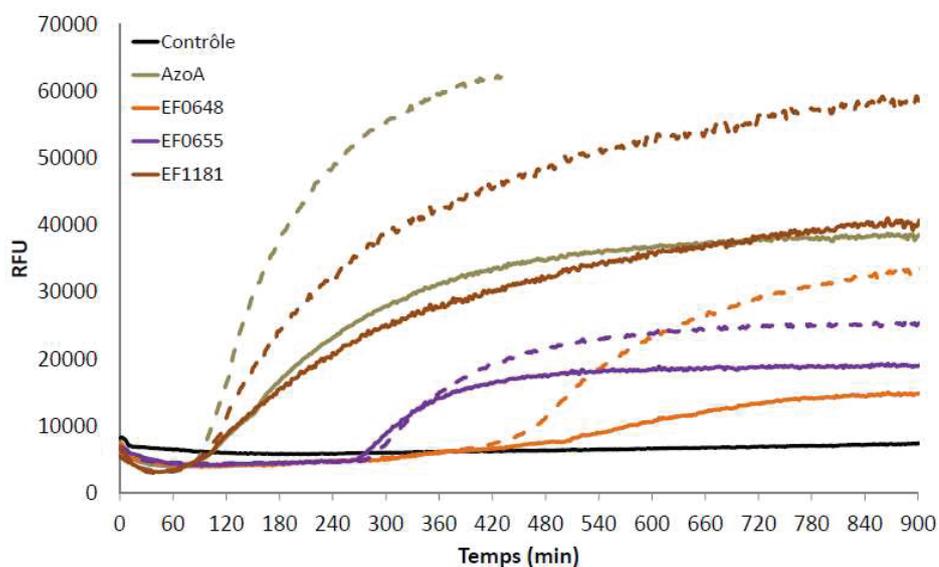


## Annexe Effet de la glutamine sur l'activité nitroréductase des enzymes pures

**Enzymes de *E. coli*.** Le milieu réactionnel contient 100 $\mu$ M 7NCCA, 1mM NADPH, 5 $\mu$ M FMN dans du tampon phosphate de sodium pH7 50mM (trait plein) ou dans une solution de glutamine pH7 50mM (pointillés) avec 1 $\mu$ g d'enzyme.



**Enzymes de *E. faecalis*.** Le milieu réactionnel contient 100 $\mu$ M 7NCCA, 1mM NADPH, 5 $\mu$ M FMN dans du tampon phosphate de sodium pH7 50m (trait plein) ou dans une solution de glutamine pH7 50mM (pointillés) avec 1 $\mu$ g d'enzyme.





## Annexe séquençage des zones délétées des souches mutantes

Les séquençages ont été réalisés par la société GATC Biotech. Le code couleur utilisé correspond à la légende suivante :

**ATGC** : Amorces amont/aval

**ATGC** : sequence en amont du gene

**ATGC** : séquence en aval du gène

**ATGC** : Amorce FRT-gène S

**ATGC** : Amorce FRT-gène R

**ATGC** : cicatrice FRT

### Région du gène azoR

FRAGMENT ATTENDU SOUCHE SAUVAGE : 1724bp

```
AACAACAGGGAAAGATAGTCAGGGGAAACTACCGCCCGCCGTTTACTGGCTGACATTGCCCTGCCGCATCGGGATGTGGCTGTCTATGCGTTGGTTTTGTCGTC
GCCTGGAGCCGGTGAGCAAAATGACTGCTGGTGTATTTAGGGGCGTTTCCACGACATATCCGGCACAGAATGCGGTTCTGGACGTACCTTTGAATCCCTC
GCGGACGAGCCACAAAAGATCGACTCTATTTTGTGTACCGATGCTGGATCTGGTGGTTCCGGAAGAGGGGAGCTCCGACAGGCCGTGGCGATGCTGAAAC
ATTACGCGAAGAGCAAGGCAGCGTTCTGGTCCATTGTGCATTGGGATTATCGCGCAGTGCCTGGTGGTGGCGGCATGGTTGTTATGTTACGGACACTGTAAAA
CCGTTAATGAAGCGATTAGCTATATTCGAGCCAGACGCCGCGAGATTGTGCTGACAGACGAGCACAAGCGATGCTGAGATTATGGGAAAAACAGGTAAGTGA
TTGAGATGTGGACTGAATATCTACAGTCCACATCAAGACCGTGTCCGGTTATGCAGAAACAATGCTGTGATGGCTGCTTTTGCCTCAGACTGTGCTTTCGCTGC
CATTCCGGACCGTATGCGATCCCTTCGGCGAAGACAAATTTACATCGGTAATGCCGATAAAGCCGAGGAACGTGGACAGATACGGCGTACCAGGTCGGTTG
GTCCATCTTTGGGATCCCGCCGCGGCTGGTAATAACGATGGCTTTTTACCCGTTACCAGACCTTCCGGACCGTTCTCGGTATAGCGGAAAGTAACGCTCGCGC
GGGCAACAGGTCAAAATAGTTTTCAACTGAGTCGAGATGTTGAAGTTATACATCGGTGCCGAATAACGATAACCGTGGTGGCTTTCAGCTCGGCAATCAACT
CATCGGAAAGTGCCAGAGCTTCTGCTGACGCGGAGTCAGCGCGCATCGCTCGGACGAGAGCCCAACAGTTCCGCATCCAGTACCAGGAAATCGGATTGCA
GCCAGTGCAGAACGGTATTTATCAGCGGAGTCTTTTCGCGCCATTGTTCAACAAAATAATCGGACAACGATTAGACTGAGAGTACCCTGCCAGGATGCT
GGATTAAGAATAATACCTTGCTCATGGTGTTCCTTATAGATGTTTGAATGGCGATGCCCCGTTGCTTGTGACACTTTATCACAACTCTGCCACAGAGATA
CCGCAATAAATCGAAGCCTATGTTCAATTTATTGAACAACGCATAGAAAGCCGCGATGTGGTACTCTATATCTATCTATTTAAAGAAAATTAATCAGGCAGAT
ACTCCCACTAACGTTATGACAGAACACAAAATTTGACCTTTACGGCTTGCAGCAGCGGCTGGATTGCTGATGCTGCTGACAGACTGCGTTTTTCTCGCCG
TCTGACGCGCTGAAGAAGGTTAAAAATCCTGATGCACAACAGGCCATTTCCAGGAGATGGCGAAAGAGATTGACCAGGCGCAGGAAAGTCTGCTGCGT
GAAGCGGCACGACCGGAAATTAATCTGACAAATTTACCGGTTAGTCAGAAAAAACAGGACATTCTCGAAGCGATTGCTGATCACCAGGTGGTATGCTGCGC
CGGGGAAACGGGTTCTGGTAAACGACTCAGTTACCAGAAAATCTGTATGGAGCTG
```

FRAGMENT ATTENDU SOUCHE MUTÉE 1117 bp

```
AACAACAGGGAAAGATAGTCAGGGGAAACTACCGCCCGCCGTTTACTGGCTGACATTGCCCTGCCGCATCGGGATGTGGCTGTCTATGCGTTGGTTTTGTCGTC
GCCTGGAGCCGGTGAGCAAAATGACTGCTGGTGTATTTAGGGGCGTTTCCACGACATATCCGGCACAGAATGCGGTTCTGGACGTACCTTTGAATCCCTC
GCGGACGAGCCACAAAAGATCGACTCTATTTTGTGTACCGATGCTGGATCTGGTGGTTCCGGAAGAGGGGAGCTCCGACAGGCCGTGGCGATGCTGAAAC
ATTACGCGAAGAGCAAGGCAGCGTTCTGGTCCATTGTGCATTGGGATTATCGCGCAGTGCCTGGTGGTGGCGGCATGGTTGTTATGTTACGGACACTGTAAAA
CCGTTAATGAAGCGATTAGCTATATTCGAGCCAGACGCCGCGAGATTGTGCTGACAGACGAGCACAAGCGATGCTGAGATTATGGGAAAAACAGGTAAGTGA
TTGAGATGTGGACTGAATATCTACAGTCCACATCAAGACCGTGTCCGGTGTTCCTTATAGATGTTTGAATGGCGATGCCCCGTTGCTTGTGACACTTTATT
CACAACTCTGCCACAGAGATAGCGCAATAAATCGAAGCCTATGTTCAATTTATTGAACAACGCATAGAAAGCCGCGATGTGGTACTCTATATCTATCTATTTAA
GAAAATTAATCAGGCAGACTACTGCCCACTAACGTTATGACAGAACACAAAATTTGACCTTTACGGCTTGCAGCAGCGGCTGGATTGCTGATGCTGCTGAC
AGACTGCGTTTTTCTCGCGTCTGCACGCGCTGAAGAAGGTTAAAAATCCTGATGCACAACAGGCCATTTCCAGGAGATGGCGAAAGAGATTGACCAGGCGG
AGGGAAAGTCTGCTGCTGAAGCGGCACGACCGGAAATTAATCTGACAAATTTACCGGTTAGTCAGAAAAAACAGGACATTCTCGAAGCGATTGCTGATC
ACCAGTGGTATGCTGCGCGGGAAACGGGTTCTGGTAAACGACTCAGTTACCAGAAAATCTGTATGGAGCTG
```

PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe Séquençage des zones délétées des souches mutantes

FRAGMENT SEQUENCE

CCGCGTTACTGGCTGACTTGCCCTGCCGCATCGGGATGTGGCTGTCTATGCGTTGGTTTTGTCGTCGCTGGAGCCGGTGAGCAAAATGACTGCTGGTGTATT  
TAGGGGCGTTCCACGACATATCCGGCACAGAATCGGGTCTGGACGTACCTTTGAATCCCTCGCGACGAGCCACAAAAGATCGACTCTATTTTTGTGTACC  
GATGCTGGATCTGGTGTCCGGAGAGGGGGAGCTCCGACAGGCCGTGGCGATGCTGGAACATTACGCGAAGCAAGGACGCTTCTGGTCCATTGTGC  
ATTGGGATTATCGCGCAGTGCCTGTTGGTGGCGGCATGGTGTATGTTACGGACACTGTAAAACCGTTAATGAAGCGATTAGCTATATTCGAGCCAGACGCC  
CGCAGATTGTGCTGACAGACGAGCACAAGCGATGCTGAGATTATGGAAAACAGGTAAGTGGATTGAGATGTGGA**CTGAATATCTACAGTCCACATCAAGAC**  
**CGTGTCCG**GTCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTCGAAGCAGCTCCAGCCTAC**GGTGTTCCTTATA**  
**GATGTTTTGAATGGGCGATG**CCCCGTGCTTGTGACACTTTATCACAATCCTGCCACAGAGATAGCGCAATAAATCGAAGCCTATGTTCAATTTATTGAACAA  
GCATAGAAAAGCCGCGATGTGGTAGCTATATCATTAAAAGAAAATAACTCAGGCAGACTACTGCCACTAACGTTATGACAGAACAACAAAATTGACC  
TTTACGGCCTTCGACGAGCGCTGGATTTCGCTGATGCTGCGTGACAGACTGCGTTTTCTCGCCGCTCGCACGCGTGAAGAAGTTAAAATCTCATGACAAA  
CAGGCCATTTCCAGGAGATGGCGAAAAGAGATTGACCAGCGGAGGAAAGTCTGCTGCTGAAAGCGGCACGACCGGAAATCTTATCTGACAATTTACC  
GGTTAGTCAGAAAAACAGGACATTCTCGAAGCGATTCTGTATCACCAGGTGGTATCGTCCCGAGGAAACCGGGTCTGGTAAAC

Région du gène nfsA

FRAGMENT ATTENDU SOUCHE SAUVAGE : 2498 bp

CAGCGTAGAGAAGTCTGAAACC**TCTGTTTGGCGCAATGCTGGCGGCACCTGTTTCGATGCTCATTATGCGGCTGTTTTTTCCACGACGCGCTCATTCTGGCAAG**  
AGCTGGCATGGTTACTAAGCGCGGTGTTCTGGTGTGCGTGGGGCACTGTGTTCTATTTATCAGTAGTTTGTAAACACAGCACAGAAAAATCAGTAAA  
GCCCTCAACGCGAGGGCTGTGACAGCATCAGGCGTCCAGATTTCTTCCACCATGCAGCAAAATCGGTATAGCCGCGATATGTTGCTGATCGACAAAATCT  
GCGGCACGGTTCTACGGGTTACCTGCCTTTGTTGTAGATCTTCTTAGTGATCCCTCCGACGAATATCTACATACTGATACTGAAAATCATCGGTTCTATTG  
CTCAATTTCTCAGCCAGATCTTTGCACGCACACAGTAAGGGCAACCCGAACGACCAAAAATAACGGTTTGCATTATTTCTCTCCTCATAGATTATGCTCTGAATG  
ATCAGCTAAAATGTATTCGCTGAAAGTAGGTTAACCTGTTGCATTAATTGCTAAAAGCTATACTGTTAAACACAATACAGTGAAAAGTTTAGACTGAAGGCT  
CACTTTGCAGAGGGAAGCGTATGCGCGCGATCGGTAATTCCTAAAGCGGTGTTGATACTGGAATTTATCGAATGATGCTACTGCGGTGGCGCTGCTGCG  
GTAAGCGACTCCCTGCTGCTGCTGAGCATTCTCGGCCAGAAGTGCAATTTCTGATGATTTTCTCGGTGTTTTGCTCATGCTCCCGTGGTGGTGTGTTA  
TTCTCAGGTGGCAAAACGTCTT**GGCCACAGCTGATGAACCGTCCACCGCAATTT**CAGTTCAGAAAGAGAAAAAGATA**ATGACGCCAACCATGAACTTAT**  
**TGTGGCCATCGCTCCATTCCGCAATTTCACTGATGAACCCATTTCCGAAGCGCAGCGTGAGGCGATTATAACAGCGCCCGTGCAGCTCCAGTTCAGTTTTTGC**  
**AGTGCAAGTACATTATCGCATTACCGACAAGCGTTACGTGAAGAACTGGTACGCTGACCGCGGGCAAAAACAGTAGCGCAAGCGCGGAGTTCTGGGT**  
**GTTCTGTGCCGACTTAAACCGCATTACAGATCTGTCGGATGCTCAGCTCGGCTGGCGGAACAATGTTGCTCGGTGCTGTTGATACGGCAATGATGGCGCA**  
**GAATGCATTAATCGCAGCGAATCGCTGGGATGGCGGGGTATATCGCGGCCCTGCGCAATAATATTGAAGCGGTGACGAAAAGTCTTAAATACCGCAG**  
**CATGTTCTGCCGCTGTTGGGCTGTGCTTGGCTGGCTGCGGATAATCCGATCTTAAGCCGCTTACCGGCTCCATTTGGTGCATGAAAACAGCTATCAAC**  
**CGCTGGATAAAGCGCACTGCGCAGTATGACGAGCAACTGGCGGAATATTACCTCACCCGTGGCAGCAATAATCGCCGGGATACCTGGAGCGATCATATCCG**  
**CGAACCAATCATTAAAGAAAGCCGCCATTTATTCTGGATTATTGCACAACAGGGTGGGGCAGCGCTAA**AACCGCCACGTCGATGATGATACGCGGGCTT  
TGACCAGGTCT**GACAGAGAGGTGACGGGTGAAA**ATTGCCATATTGTCGGGGATGGAACGCTCTATTCTGTAAGCGGTGCGTGAAGCCGCTATACAGCGCG  
GTACCTGGTTGAAATCTTGATCCGCTTCTGCTACATGAACATAAATCTGCGCGCTTCTATTCACTACAAAGCCGCAAGTTACCCATTTGACGCAAGT  
ATCCCGTATTGGCACCCTACCTTTATGGACGCGGCACTGCGCAGTTCGAGATGCTGGGAGCTATCCGCTCAATGATCGGTGCCATTGCCCG  
GCGCGTGACAAATTGCGTCCATGCAACTGCTGCGCGTCAAGGCAATGCTGACCTGCTGACGCGGCAATTGCGCATTGCGCGGATGATACACAGCATTAATCGA  
CATGGTGGTGGTGGCGCGTGGTCAAGTTGGTGAAGGCACGCAAGGAAATGGCTGCTGCTGCGGAGACGCGTCAAGCGCGGAAAGCGTGAATGA  
CGTTTTCCGCGTGAACGCGCATATTCTGGTGCAGGAATATCAAAGAGCGCAAGGGTGCAGATATCCGCTGCTGTTGTTGGCGATGAAGTGGTGGCTG  
CGATTGAACGCGGGGCAAGAGAGGGGATTTCTGTTCAATTTGCATCTGGCGCGCGGCAAGCGTCCAGTATCACACCACAGGAGCGTGAATCGCGAT  
AAAAGCCGCGCAACGATGGCGCTGGACGTTGCTGGTGGATATTCTGCTGCTAATCGCGGCC**GTTGGTATGGAGGTGAATGC**.

FRAGMENT ATTENDU SOUCHE MUTEE : 1708bp

CAGCGTAGAGAAGTCTGAAACC**TCTGTTTGGCGCAATGCTGGCGGCACCTGTTTCGATGCTCATTATGCGGCTGTTTTTTCCACGACGCGCTCATTCTGGCAAG**  
AGCTGGCATGGTTACTAAGCGCGGTGTTCTGGTGTGCGTGGGGCACTGTGTTCTATTTATCAGTAGTTTGTAAACACAGCACAGAAAAATCAGTAAA  
GCCCTCAACGCGAGGGCTGTGACAGCATCAGGCGTCCAGATTTCTTCCACCATGCAGCAAAATCGGTATAGCCGCGATATGTTGCTGATCGACAAAATCT  
GCGGCACGGTTCTACGGGTTACCTGCCTTTGTTGTAGATCTTCTTAGTGATCCCTCCGACGAATATCTACATACTGATACTGAAAATCATCGGTTCTATTG  
ATCAGCTAAAATGTATTCGCTGAAAAGTAGTTAACTGTTGATTAATGCTAAAAGCTATAACTGTTAAACACAATACAGTGAAAAGTTTAGACTGAAGGCT  
CACTTTGCAGAGGGAAGCGTATGCGCGCGATCGGTAATTCCTAAAGCGGTGTTGATACTGGAATTTATCGAATGATGCTACTGCGGTGGCGCTGCTGTC  
GTAAGCGACTCCCTGCTGCTGAGCATTCTCGGCCAGAAGTGCAATTTCTGATGATTTTCTCGGTGTTTTGCTCATGCTCCCGTGGTGGTGGTGTGTTA  
TTCTCAGGTGGCAAAACGTCTT**GGCCACAGCTGATGAACCGTCCACCGCAATTT**GACAGAGAG**GGTGCAGGGTGA**ATTGCCATATTGTCGGGGATGG  
AACGCTCTATTCTGTAAGCGGTGCGTGAAGCCGCTATACAGCGCGGTACCTGTTGAAATCTGATCCGCTTCTGCTACATGAACATAAATCTGCGGCG  
TCTTCTATTCACTACAAAGCCGCAAGTTACCCATTTGACGCAAGTATCCCGCTATTGGCACCGCCATTACCTTTATGGGACGGCGCACTGCGCCAGTTCC  
AGATGCTGGGAGCTATCCGCTCAATGAGTGGTGGCATTGCCGGGCGCGTGACAAATGCGTTCCATGCAACTGCTGGCGGTGACGGCATCGACCTGCCT  
GTCAGGGCATTGCGCATTGCCGGATGATACAGCGATTAATCGACATGTTGGTGGTGGCGCGTGGTGGTCAAGTGGTGAAGGCACGCAAGGAAATG

## Annexe Séquençage des zones délétées des souches mutantes

```
GCGTCGTGCTGGCGGAGACGCGTCAGGCGGCGGAAAGCGTGATTGACGCTTTCCGCGGTCTGAACGCGCATATTCTGGTGCAGGAATATATCAAAGAGGCGCA  
AGGGTGCATATCCGCTGTCTGTTGTTGGCGATGAAAGTGGTGCCTGCGATTGAACGCGGGCGAAAGAGGGCGATTTTCGTTCCAATTTGCATCTGGCGGC  
GCGGCAAGCGTCCAGATACACACCAGGAGCGTGAAATCGCGATAAAAGCCGCGCAACGATGCGCTGGACGTTGCTGGTGTGGATATTCTGCGTGTCA  
ATCGCGGGCCGTTGGTGTATGGAGGTGAATGC
```

### FRAGMENT SEQUENCE

```
GCTCATTATGCGGCTGTTTTTCCGACGCGCTCATTCTGGCAAGAGCTGGCATGGTTACTAAGCGGGTGTCTGGTGTGCGCTGGGGGCACTGTGTTTCTTAT  
TTATCAGTAGTTTGTAAACCACAGCACAGAAAAATCAGTAAAGCCCTCAACGCGAGGGCTTGTACAGACGATCAGGCGTCCAGATTTCTTTACCCATGCAG  
CAAAATCGGTATAGCCGCGATATGTTGCTGATCGACAAAAATCTGCGGCAGGTTTCTACGGGTTTACCTGCCTTTTGTGTAGATCTCTTTAGTGATCCCTCC  
GCACGAATATCTACATACTGATACTGAAAAATCATCGCGTTCAATTGCTCAATTTCTAGCCAGATCTTTGCACGCACACAGTAAGGGCAACCCGAAACGACAAAA  
TAACGGTTTGCATTTTCTCTCTCATAGATTTATGCCTGTAATGATCACGCTAAAATGATTGCTGAAAGTAGGTTTAACTGTTGCATTAATTGCTAAAAGCT  
ATAACTGTTAAACACAATACAGTAAAAAGTTTAGACTGAAGGCTCCTTTCAGAGGGAAGCGTATGCGCGCATCGGTAATTGCCTAAAGCGGTGTTGATA  
CTGGAATTTATCGAATGATGCTACTGGCGGTGGCGCTGCTGTCGGTAAGCGACTCCCTGTCGCTGCCTGAGCCATTTCTCGGCCAGAAGTGCAGATTCTGATG  
ATTTTCTCGGTGTTTGTCTCATGCTTCCGCTGCGGTGGTGTATTCTCAGTGGCAAAACGCTTGGCCACAGCTGATGAACCGTCCACCGCAATATTCG  
AGGCTGGAGCTGCTCGAAGTCTCTATACTTTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAACCTAAGGAGGATATTCATATGGAACGACAGAGAGGTGCAGGGTGA  
AAATTGCCATATTGCCCGGATGGAACGCTCTATTCTGTAAGCGGCTGCTGTAAGCCGCTATACAGCGCGGTACCTGTTGAAATCTTGATCCGCTTTCTT  
GCTACATGAACATAAATCTGCGGCTCTTCTATTCACTAC
```

### Région du gène *nfsB*

#### FRAGMENT ATTENDU SOUCHE SAUVAGE :2248bp

```
AAGGAGTCAGAAACCAGAGACCAGGTGGGAATAGTGGTAATGGTATTGTCCAGTTACGCACTTTGACGGTGGTTAACCCAATATCGATCACCAGCCATCCG  
GCCGATTTTCGGCATCTCCAGCCAGTCGCCAGTTTCAGCATATCGTTCGCGGAAAGCTGAATACCTGCCACCAGACCAAGAATCGGATCTTTAAATACCAACATC  
AGCACGGCAGCATTGCACCAAGACCCTGATCAGAATCGTGGCGACTGACCAATCAGCAGCGAGATCATCAAAATGCCAGCAGAATCGCGCCGATCAGTTT  
AATCCCCTGAAATATCCCTTTAGCGGTAAGTGAAGTGTGCGGGAATTTCTGCGCCAGATTCAAAATAACATCCAGCAACGAGAAGACTGAAAGCAGCGCATA  
CATCATGATCCACAACGCGCGCAGGTAGTCAAGATATCTGCCGCTTTCGTTGTCCTTTTGCAGCCAGAATACCGCTGAATATTGACGATAATCCCTGCAGGGT  
AAAAGCTAAACGGTGAAGAGTTTATTCTGGGTAATGATTGCAACCAAGCCGTAAGTGGCGATGGCACGTTTTTCGAAGGTCCGAGTACCACCAATGCA  
AAATAATATGCACCAGCAGCGGGTGCAGAAAAATAACCGAAAATCATCACCATCGAGGTGGTGTGATCGATCTCAATACCGCTAAATCTTCACTGGGATA  
TTAAATCTGCATAACGCTCTCTTTATACAACAGCAGCCTATGATGACGGTGAACAGGGTATGCAAATCAGGAGAATCTGAGAGGAAATAGCCGGGAGAG  
TGCCCGGCAAGAGAGAAATACACTTCGTTAAGGTGATGTTTTGCGGCAGACGAGATTCGGCAGCGTAGCGTTAAATCTTCAACGCTGTGATGACCTACCGG  
AACAAACCACGACTGGTGTAGCCTTTCTTTTTCAGACCAAAATCTGCATCGAGGATGGCGGCGTCAAAACCTTCGATGGGTACCAGCTCCAGACCCAGAGCCG  
CACGCCGAGCAGGAAGTTACCGACGTTGAGATAAACCTGTTTGCATCCACTCTGCATCATATGAGATCTTTACGGTGCATATCAGCGAAGAATTGCGACC  
TTTATCGTTTCGCGCTTTCGCTTCCGCGGTGGCAAAGCGGCATCGGCATCTTCTGGTCAACAACCAGCTTACGCCAGACATCGTCCATCGCGGTTTTGCACAG  
AACACCAGCAGTGGAGGCATCAAGCATTTACGCTCGTGAACACGTAATTACCGGCAGCGGATTTGGCAACACGCGCTTTACCTTCTTCGTTGCTGGCAACA  
ATAAAATGCCAGCTGGGAGTTGGTGTGATGGGCTGATTGACAGTGGTGTGATCTGCTCGCGCTGTTCCGGGGTAAGTTTTTGTGGCATCAAAATGCG  
TTAGTGGAAATGACGCTTAAAGGCGACAGAAATGATATCCATAAAGACTCCATGTGAAAGTAATTTGCGTGCAGCAGATTACAAGGTTCAACGAGAAATG  
AAGCGAGAAAAATGCGCTATAGATTTCCGCTTTAGCCTGGACGCACTTTTTTGTATCGCGTTTAGCCAGACCATCAACCACAGATTCCACGAATCGTTGATCAG  
ATCGCGAAGTAACGCTTCGAGATTTCTCGCCGGGATACACTGAAATCCAGTGTCTTTTATTATGATGATACCCTGGCTTAATGCTTGGGTATATTTGCTGATTTA  
ACAGGGATTTTTGTGGATCGACTTCAGATTGATAAAGGGGACGCCGCTAGCTCCGACGACAGCATAAAAAATCTTCCGCAATTTTAAAAACATCGAACTCCG  
GGCCAAAAGCCAGCAAAGCTGCACAAAGGTAAGTCAAGGGCCAGGCGTTTCGCCGTTTCGTCAGTGATTGCTTATCCATAAACGTTCTTTAGGCGAAGGA  
GAATAAGCAAAGTATGCCCGGAAGTACGGCGATAATCGAGCTTTAATCCGCCAGCGAGAACAGCGTCCGAGATAAAGCGCAGAAACAAATACTCAATAGCG  
CCAGCACTAAAAACCAAGCAAAACAATAAAGTGAAGGCTGACTAAGATCCATCAGATGGAACATGGTACCAGTTTTTGTCCAGCGCCAGCCCAAGTGC  
GGGGCGGGCAGCAGCAGGCAAGAGAGGAAAATGCCATCAGCAAATGCCTG
```

#### FRAGMENT ATTENDU SOUCHE MUTEE : 1521bp

```
AAGGAGTCAGAAACCAGAGACCAGGTGGGAATAGTGGTAATGGTATTGTCCAGTTACGCACTTTGACGGTGGTTAACCCAATATCGATCACCAGCCATCCG  
GCCGATTTTCGGCATCTCCAGCCAGTCGCCAGTTTCAGCATATCGTTCGCGGAAAGCTGAATACCTGCCACCAGACCAAGAATCGGATCTTTAAATACCAACATC  
AGCACGGCAGCATTGCACCAAGACCCTGATCAGAATCGTGGCGACTGACCAATCAGCAGCGAGATCATCAAAATGCCAGCAGAATCGCGCCGATCAGTTT  
AATCCCCTGAAATATCCCTTTAGCGGTAAGTGAAGTGTGCGGGAATTTCTGCGCCAGATTCAAAATAACATCCAGCAACGAGAAGACTGAAAGCAGCGCATA  
CATCATGATCCACAACGCGCGCAGGTAGTCAAGATATCTGCCGCTTTCGTTGTCCTTTTGCAGCCAGAATACCGCTGAATATTGACGATAATCCCTGCAGGGT  
AAAAGCTAAACGGTGAAGAGTTTATTCTGGGTAATGATTGCAACCAAGCCGTAAGTGGCGATGGCACGTTTTTTCGAAGGTCCGAGTACCACCAATGCA
```

PROPRIETE BIOMERIEUX SA Annexe Séquençage des zones délétées des souches mutantes

AAATAATATGCACCACGACGGCGGTGAGAAAAATAATACCGAAAATCATCACCATCGAGGTGGTGTGATCGATCTCAATACCCGCTAAATCTTCAACCTGGGATA  
TTAAATCCTGCATAACGTCTCCTTTATACAACAGCA **GCCTATGATGACGGCTGAAACAGGGTTATGCAAATC**CGGTGCCAGCAGATTACAAGGTTCAACGAGA  
AATG **GTAAGCGAGAAAAATGCGCTATAGATTTCCGCTTTAGCCTGGACGCACTCTTTTTGATCGCGTTTAGCCAGACCATCAACCACCAGATTCCACGAATCGTT**  
**GATCAGATCGCGAAGTAACGCTTCGGAGATTTCTTCGCCGGGATACACTGAAATCCAGTCTTTTTATTATCATGTGATACCCTGGCTTAATGCTTGGGTATATTTGC**  
**TGATTTAACAGGGATTTTGTGGATCGGACTTCAGATTGATAAAGGGGACGCCGCTAGCTCCGACGACAGCATAAAAAATCTTGCCGCAATTTAAAAACATCG**  
**AACTCCGGGCCAAAAGGCCAGCAAAGCTCGACAAAGGGTAACTCAAGGGCCAGGCGTTTCGCCGTTTCGTGCAGTGATTGCTTATCCATAAACGTTCTTTAGG**  
**CGAAGGAGAATAAGCAAAGTATGCCGCGAAGTACGGCGATAATCGACGTTTAAATCCGCCAGCGAGAACCAGCGTCGCCAGATAAAGCGCAGAACAAAATACTC**  
**AATAGCGCCAGCACTAAAAACCACAGACAAAACAATAAAGTGTAAGCTGACTAAGATCCATCAGATGGAACATGGTCACCAGTTTTTGTCCAGCGCCAGCC**  
**CCAGTGCGGGGCGGGCAGCAGCAAGAGAGGAAA **GCCATCAGCAAAATGCCTG****

FRAGMENT SEQUENCE

ATATCGATTTTCGCGTGATCCGCGCCGATTTTCGGCATCTCTCCCGTCGTCCAGTTACCCCTGTCATTGCGGAAAGCTGAGTCCCTGCCACCAGACCTAGAATC  
GGATCTTTAAATACCAACATCAGCACGGCAGCCATTGCACCAAGACCCGCTGATCAGAATCGCTGGCGACTGACCAATCAGCAGCGAGATCATAAAAATGCCGAC  
CAGAATCGCGCCGATCAGTTTAAATCCCTGAAATATCCCTTTAGCGGTAAGTGAAGTCTGCCGGAAATTTCTGCCAGATTCAAATAACATCCAGCAACGA  
GAAGACTGAAACAGCGCATAATCATGATCCACAAGTGCAGCGAGGTAGTCAGAATATCTGCCCTTCGTGCCTTTTTGCAGCCAGAATACCGCCTGAATATTGA  
CGATATCCCCTGCAGGGTAAAAGCTAACGGTGAAGAGTTTATTCTGGGTAATGATTTGCAACCAAAGCCGTGAAGTGGCGATGGCACGTTTTTGAAGGTCC  
GCAGTACCACCAATGCAAATAATATGCACCACGACGGCGGTGAGAAAAATAATACCGAAAATCATCACCATCGAGGTGGTGTGATCGATCTCAATACCCGCT  
AAATCTTCAACCTGGGATATAAATCCTGCATAACGTCTCCTTTATACAACAGCA **GCCTATGATGACGGCTGAAACAGGGTTATTGCAAATC**GTAGGCTGGAGCTG  
**CTTCGAAGTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAGGAATAAGGAGGATATTCATATGGAC**CGGTGCCAGCAGATTACAAGGTTCAACGAAAGAA  
TG **GTAAGCGAGAAAAATGCGCTATAGATTTCCGCTTTAGCCTGGACGCACTCTTTTTGATCGCGTTAGCCAGAACCATCACCACCAGAATCCACGAAATCGTG**  
**ATCAGATCGCGAAAGTACG**

# REFERENCES



1. **Ackerley, D. F., C. F. Gonzalez, C. H. Park, R. Blake, M. Keyhan, and A. Matin.** 2004. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **70**:873-882.
2. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2067-2075.
3. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends in Microbiology* **7**:410-413.
4. **Alexander, J. C.** 1981. Chemical and biological properties related to toxicity of heated fats. *Journal of toxicology and environmental health* **7**:125-138.
5. **Anlezark, G. M., R. G. Melton, R. F. Sherwood, B. Coles, F. Friedlos, and R. J. Knox.** 1992. The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*--a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem Pharmacol* **44**:2289-2295.
6. **Anlezark, G. M., T. Vaughan, E. Fashola-Stone, N. P. Michael, H. Murdoch, M. A. Sims, S. Stubbs, S. Wigley, and N. P. Minton.** 2002. *Bacillus amyloliquefaciens* orthologue of *Bacillus subtilis* *ywrO* encodes a nitroreductase enzyme which activates the prodrug CB 1954. *Microbiology* **148**:297-306.
7. **Annuar, M. S. M., S. Adnan, and S. Vikineswary.** 2009. Kinetics and Energetics of Azo Dye Decolorization by *Pycnoporus sanguineus*. *Water, Air, and Soil Pollution* **202**:179-188.
8. **Atwell, G. J., S. Yang, F. B. Pruijn, S. M. Pullen, A. Hogg, A. V. Patterson, W. R. Wilson, and W. A. Denny.** 2007. Synthesis and structure-activity relationships for 2,4-dinitrobenzamide-5-mustards as prodrugs for the *Escherichia coli* *nfsB* nitroreductase in gene therapy. *J Med Chem* **50**:1197-1212.
9. **Bafana, A. and T. Chakrabarti.** 2008. Lateral gene transfer in phylogeny of azoreductase enzyme. *Comput. Biol Chem* **32**:191-197.
10. **Bafana, A., T. Chakrabarti, and S. S. Devi.** 2008. Azoreductase and dye detoxification activities of *Bacillus velezensis* strain AB. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:1139-1144.
11. **Bafana, A., S. S. Devi, K. Krishnamurthi, and T. Chakrabarti.** 2007. Kinetics of decolourisation and biotransformation of direct black 38 by *C. hominis* and *P. stutzeri*. *Applied microbiology and biotechnology* **74**:1145-1152.
12. **Barbosa, T. M. and S. B. Levy.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of *MarA*. *J Bacteriol* **182**:3467-3474.
13. **Bayramoglu, G., G. Celik, and M. Y. Arica.** 2006. Biosorption of Reactive Blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: Batch and continuous flow system studies. *Journal of hazardous materials* **137**:1689-1697.

14. **Ben, M. H., R. Mosrati, D. Corroler, K. Ghedira, D. Barillier, and L. Chekir.** 2009. In vitro mutagenicity of Acid Violet 7 and its degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2: Correlation with chemical structures. *Environ Toxicol Pharmacol* **27**:231-236.
15. **Bin, Y., Z. Jiti, W. Jing, D. Cuihong, H. Hongman, S. Zhiyong, and B. Yongming.** 2004. Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737. *FEMS Microbiol Lett.* **236**:129-136.
16. **Blasco, R. and F. Castillo.** 1993. Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl Environ Microbiol* **59**:1774-1778.
17. **Blattner, F. R., G. Plunkett, III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N. Y.)* **277**:1453-1462.
18. **Blumel, S., H. J. Knackmuss, and A. Stolz.** 2002. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. *Appl Environ Microbiol* **68**:3948-3955.
19. **Blumel, S. and A. Stolz.** 2003. Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:186-190.
20. **Bryant, C. and M. DeLuca.** 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J Biol Chem* **266**:4119-4125.
21. **Bryant, D. W., D. R. McCalla, M. Leeksa, and P. Laneuville.** 1981. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J Microbiol* **27**:81-86.
22. **Burger, S. and A. Stolz.** 2010. Characterisation of the flavin-free oxygen-tolerant azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F in comparison to flavin-containing azoreductases. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:2067-2076.
23. **Caballero, A., J. J. Lazaro, J. L. Ramos, and A. Esteve-Nunez.** 2005. PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. *Environ Microbiol* **7**:1211-1219.
24. **Celik, A. and G. Yetis.** 2012. An unusually cold active nitroreductase for prodrug activations. *Bioorganic & medicinal chemistry* **20**:3540-3550.
25. **Cellitti, S. E., J. Shaffer, D. H. Jones, T. Mukherjee, M. Gurumurthy, B. Bursulaya, H. I. Boshoff, I. Choi, A. Nayyar, Y. S. Lee, J. Cherian, P. Niyomrattanakit, T. Dick, U. H. Manjunatha, C. E. Barry, III, G. Spraggon, and B. H. Geierstanger.** 2012. Structure of Ddn, the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in bioreductive activation of PA-824. *Structure (London, England : 1993)* **20**:101-112.
26. **Cerniglia, C. E., J. P. Freeman, W. Franklin, and L. D. Pack.** 1982. Metabolism of azo dyes derived from benzidine, 3,3'-dimethyl-benzidine and 3,3'-dimethoxybenzidine to potentially carcinogenic aromatic amines by intestinal bacteria. *Carcinogenesis* **3**:1255-1260.

27. **Chang, J. S., B. Y. Chen, and Y. S. Lin.** 2004. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource technology* **91**:243-248.
28. **Chang, J. S., C. Chou, Y. C. Lin, P. J. Lin, J. Y. Ho, and T. L. Hu.** 2001. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water research* **35**:2841-2850.
29. **Chang, J. S. and Y. C. Lin.** 2000. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol Prog.* **16**:979-985.
30. **Chen, H., J. Feng, O. Kweon, H. Xu, and C. E. Cerniglia.** 2010. Identification and molecular characterization of a novel flavin-free NADPH preferred azoreductase encoded by *azoB* in *Pigmentiphaga kullae* K24. *BMC Biochem* **11**:13.
31. **Chen, H., S. L. Hopper, and C. E. Cerniglia.** 2005. Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. *Microbiology* **151**:1433-1441.
32. **Chen, H., R. F. Wang, and C. E. Cerniglia.** 2004. Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. *Protein Expr. Purif* **34**:302-310.
33. **Chen, H., H. Xu, T. M. Heinze, and C. E. Cerniglia.** 2009. Decolorization of water and oil-soluble azo dyes by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus fermentum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **36**:1459-1466.
34. **Chen, H., H. Xu, O. Kweon, S. Chen, and C. E. Cerniglia.** 2008. Functional role of Trp-105 of *Enterococcus faecalis* azoreductase (*AzoA*) as resolved by structural and mutational analysis. *Microbiology* **154**:2659-2667.
35. **Chi, B. K., D. Albrecht, K. Gronau, D. Becher, M. Hecker, and H. Antelmann.** 2010. The redox-sensing regulator YodB senses quinones and diamide via a thiol-disulfide switch in *Bacillus subtilis*. *Proteomics* **10**:3155-3164.
36. **Chi, B. K., K. Kobayashi, D. Albrecht, M. Hecker, and H. Antelmann.** 2010. The paralogous MarR/DUF24-family repressors YodB and CatR control expression of the catechol dioxygenase CatE in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**:4571-4581.
37. **Chivukula, M. and V. Renganathan.** 1995. Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and environmental microbiology* **61**:4374-4377.
38. **Choi, J. W., J. Lee, N. Kosuke, C. H. Jung, and J. S. Kim.** 2007. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *ydjA*, a minimal nitroreductase from *Escherichia coli* K12. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol Cryst. Commun* **63**:1064-1066.
39. **Christofferson, A. and J. Wilkie.** 2009. Mechanism of CB1954 reduction by *Escherichia coli* nitroreductase. *Biochem Soc Trans.* **37**:413-418.
40. **Chung, K. T., S. E. Stevens, Jr., and C. E. Cerniglia.** 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical reviews in microbiology* **18**:175-190.

41. **Corigliano, M. G., A. M. de Guzman, and P. V. Stagnitta.** 2011. Characterization of the plasmidic or chromosomal cpe gene and metabolic activities in *Clostridium perfringens* isolates from food in San Luis--Argentina. *Cent. Eur J Public Health* **19**:46-53.
42. **Correia, B., Z. Chen, S. Mendes, L. O. Martins, and I. Bento.** 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the azoreductase PpAzoR from *Pseudomonas putida* MET94. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol Cryst. Commun* **67**:121-123.
43. **Dai, R., J. Chen, J. Lin, S. Xiao, S. Chen, and Y. Deng.** 2009. Reduction of nitro phenols using nitroreductase from *E. coli* in the presence of NADH. *J Hazard. Mater* **170**:141-143.
44. **Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad. Sci U. S A* **97**:6640-6645.
45. **de, O., I. A. Zanotto-Filho, J. C. Moreira, D. Bonatto, and J. A. Henriques.** 2010. The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **27**:89-102.
46. **Deller, S., P. Macheroux, and S. Sollner.** 2008. Flavin-dependent quinone reductases. *Cell Mol Life Sci* **65**:141-160.
47. **Deller, S., S. Sollner, R. Trenker-El-Toukhy, I. Jelesarov, G. M. Gubitz, and P. Macheroux.** 2006. Characterization of a thermostable NADPH:FMN oxidoreductase from the mesophilic bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **45**:7083-7091.
48. **Doublet, B., G. Douard, H. Targant, D. Meunier, J. Y. Madec, and A. Cloeckaert.** 2008. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of microbiological methods* **75**:359-361.
49. **Dubin, P. and K. L. Wright.** 1975. Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **5**:563-571.
50. **Emptage, C. D., R. J. Knox, M. J. Danson, and D. W. Hough.** 2009. Nitroreductase from *Bacillus licheniformis*: a stable enzyme for prodrug activation. *Biochem Pharmacol* **77**:21-29.
51. **Fabrega, O., A. James, S. Orenga, J. Perry, V. Salwatura, and S. Stanforth.** 2011. novel nitroreductase enzymatic substrates. wo/2011/012824.
52. **Fabrega, O., A. James, V. Salwatura, S. Orenga, and S. Stanforth.** 2008. novel nitroreductase enzymatic substrates. wo/2008/152305.
53. **Feng, J., T. M. Heinze, H. Xu, C. E. Cerniglia, and H. Chen.** 2010. Evidence for significantly enhancing reduction of Azo dyes in *Escherichia coli* by expressed cytoplasmic Azoreductase (AzoA) of *Enterococcus faecalis*. *Protein Pept. Lett.* **17**:578-584.
54. **Feng, J., O. Kweon, H. Xu, C. E. Cerniglia, and H. Chen.** 2012. Probing the. *Arch Biochem Biophys* **520**:99-107.

55. **Fischl, A. S. and E. P. Kennedy.** 1990. Isolation and properties of acyl carrier protein phosphodiesterase of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **172**:5445-5449.
56. **Funk, S. B., D. J. Roberts, D. L. Crawford, and R. L. Crawford.** 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Applied and environmental microbiology* **59**:2171-2177.
57. **Ghodake, G., U. Jadhav, D. Tamboli, A. Kagalkar, and S. Govindwar.** 2011. Decolorization of Textile Dyes and Degradation of Mono-Azo Dye Amaranth by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890. *Indian journal of microbiology* **51**:501-508.
58. **Ghosh, D. K., S. Ghosh, P. Sadhukhan, A. Mandal, and J. Chaudhuri.** 1993. Purification of two azoreductases from *Escherichia coli* K12. *Indian J Exp Biol* **31**:951-954.
59. **Ghosh, D. K., A. Mandal, and J. Chaudhuri.** 1992. Purification and partial characterization of two azoreductases from *Shigella dysenteriae* type 1. *FEMS Microbiol Lett.* **77**:229-233.
60. **Ghosh, S., D. Usharani, A. Paul, S. De, E. D. Jemmis, and S. Bhattacharya.** 2008. Design, Synthesis, and DNA Binding Properties of Photoisomerizable Azobenzene<sup>+</sup>Distamycin Conjugates: An Experimental and Computational Study. *Bioconjugate Chem.* **19**:2332-2345.
61. **Gingell, R.** 1973. Substrate non-specificity of *Streptococcus faecalis* azoreductase. *Xenobiotica* **3**:165-169.
62. **Gonzalez, C., E. Touraud, S. Spinelli, and O. Thomas.** 2007. Chapter 3 Organic constituents, p. 47-87. *In* O. T. and (ed.), *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*. Elsevier.
63. **Gonzalez, C. F., D. F. Ackerley, S. V. Lynch, and A. Matin.** 2005. ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *The Journal of biological chemistry* **280**:22590-22595.
64. **Gonzalez-Perez, M. M., D. P. van, R. M. Wittich, and J. L. Ramos.** 2007. *Escherichia coli* has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. *Environ Microbiol* **9**:1535-1540.
65. **Gosai, V., P. Ambalam, M. Raman, C. R. Kothari, R. K. Kothari, B. R. Vyas, and N. R. Sheth.** 2011. Protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* 231 against N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in animal model. *Gut microbes* **2**:319-325.
66. **Grove, J. I., P. F. Searle, S. J. Weedon, N. K. Green, I. A. McNeish, and D. J. Kerr.** 1999. Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954. *Anti-cancer drug design* **14**:461-472.
67. **Guillen, H., J. A. Curiel, J. M. Landete, R. Munoz, and T. Herraiz.** 2009. Characterization of a nitroreductase with selective nitroreduction properties in the food and intestinal lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J Agric. Food Chem* **57**:10457-10465.
68. **Hartman, C. P., A. W. Andrews, and K. T. Chung.** 1979. Production of a mutagen from ponceau 3R by a human intestinal anaerobe. *Infection and immunity* **23**:686-689.

69. **He, M., X. Li, L. Guo, S. J. Miller, C. Rensing, and G. Wang.** 2010. Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol* **10**:221.
70. **Hernandez, P. H., P. Mazel, and J. R. Gillette.** 1967. Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase. II. The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities. *Biochem Pharmacol* **16**:1877-1888.
71. **Hsueh, C. C., B. Y. Chen, and C. Y. Yen.** 2009. Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of hazardous materials* **167**:995-1001.
72. **Hu, T. L.** 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. *Water Sci Technol.* **43**:261-269.
73. **Huang, J., Y. Wen, N. Ding, Y. Xu, and Q. Zhou.** 2012. Effect of sulfate on anaerobic reduction of nitrobenzene with acetate or propionate as an electron donor. *Water research* **46**:4361-4370.
74. **Huang, M. T., G. T. Miwa, N. Cronheim, and A. Y. Lu.** 1979. Rat liver cytosolic azoreductase. Electron transport properties and the mechanism of dicumarol inhibition of the purified enzyme. *The Journal of biological chemistry* **254**:11223-11227.
75. **Idaka, E., H. Horitsu, and T. Ogawa.** 1987. Some properties of azoreductase produced by *Pseudomonas cepacia*. *Bull Environ Contam. Toxicol* **39**:982-989.
76. **Ingledeu, W. J. and R. K. Poole.** 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **48**:222-271.
77. **Ito, K., M. Nakanishi, W. C. Lee, H. Sasaki, S. Zenno, K. Saigo, Y. Kitade, and M. Tanokura.** 2005. Crystallization and preliminary X-ray analysis of AzoR (azoreductase) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol Cryst. Commun* **61**:399-402.
78. **Ito, K., M. Nakanishi, W. C. Lee, H. Sasaki, S. Zenno, K. Saigo, Y. Kitade, and M. Tanokura.** 2006. Three-dimensional structure of AzoR from *Escherichia coli*. An oxidoreductase conserved in microorganisms. *J Biol Chem* **281**:20567-20576.
79. **Ito, K., M. Nakanishi, W. C. Lee, Y. Zhi, H. Sasaki, S. Zenno, K. Saigo, Y. Kitade, and M. Tanokura.** 2008. Expansion of substrate specificity and catalytic mechanism of azoreductase by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **283**:13889-13896.
80. **Ito, K. and M. Tanokura.** 2008. [Structure and reaction mechanism of azoreductase]. *Seikagaku.* **80**:550-559.
81. **James, A. L., J. D. Perry, C. Jay, D. Monget, J. W. Rasburn, and F. K. Gould.** 2001. Fluorogenic substrates for the detection of microbial nitroreductases. *Letters in applied microbiology* **33**:403-408.

82. **Jenks, P. J., R. L. Ferrero, J. Tankovic, J. M. Thiberge, and A. Labigne.** 2000. Evaluation of nitrofurantoin combination therapy of metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**:2623-2629.
83. **Ji, Q., G. Liu, J. Zhou, J. Wang, R. Jin, and H. Lv.** 2012. Removal of water-insoluble Sudan dyes by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Bioresour. Technol.* **114**:144-148.
84. **Kadam, A. A., J. D. Kamatkar, R. V. Khandare, J. P. Jadhav, and S. P. Govindwar.** 2012. Solid-state fermentation: tool for bioremediation of adsorbed textile dyestuff on distillery industry waste-yeast biomass using isolated *Bacillus cereus* strain EBT1. *Environ Sci Pollut. Res Int* .
85. **Keck, A., J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H. J. Knackmuss, and R. Mattes.** 1997. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and environmental microbiology* **63**:3684-3690.
86. **Kelley, K. D., L. Q. Olive, A. Hadziselimovic, and C. R. Sanders.** 2010. Look and see if it is time to induce protein expression in *Escherichia coli* cultures. *Biochemistry* **49**:5405-5407.
87. **Khalid, A., M. Arshad, and D. E. Crowley.** 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. under saline conditions. *Applied microbiology and biotechnology* **79**:1053-1059.
88. **Kim, S., D. B. Moon, C. H. Lee, S. W. Nam, and P. Kim.** 2009. Comparison of the effects of. *Curr Microbiol* **58**:159-163.
89. **Kim, S. J. and M. Shoda.** 1999. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnology and bioengineering* **62**:114-119.
90. **Knox, R. J., F. Friedlos, R. F. Sherwood, R. G. Melton, and G. M. Anlezark.** 1992. The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--II. A comparison of an *Escherichia coli* nitroreductase and Walker DT diaphorase. *Biochemical pharmacology* **44**:2297-2301.
91. **Koder, R. L. and A. F. Miller.** 1998. Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase. *Biochim. Biophys Acta* **1387**:395-405.
92. **Kolekar, Y. M. and K. M. Kodam.** 2011. Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. *Appl Microbiol Biotechnol* .
93. **Kolekar, Y. M., P. D. Konde, V. L. Markad, S. V. Kulkarni, A. U. Chaudhari, and K. M. Kodam.** 2012. Effective bioremoval and detoxification of textile dye mixture by *Alishewanella* sp. KMK6. *Appl Microbiol Biotechnol* .
94. **Kudlich, M., A. Keck, J. Klein, and A. Stolz.** 1997. Localization of the Enzyme System Involved in Anaerobic Reduction of Azo Dyes by *Sphingomonas* sp. Strain BN6 and Effect of Artificial Redox Mediators on the Rate of Azo Dye Reduction. *Applied and environmental microbiology* **63**:3691-3694.

95. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
96. **LaPointe, G., D. Atlan, and C. Gilbert.** 2008. Characterization and site-directed mutagenesis of Wzb, an O-phosphatase from *Lactobacillus rhamnosus*. *BMC biochemistry* **9**:10.
97. **Leelakriangsak, M., N. T. Huyen, S. Towe, D. N. van, D. Becher, M. Hecker, H. Antelmann, and P. Zuber.** 2008. Regulation of quinone detoxification by the thiol stress sensing DUF24/MarR-like repressor, YodB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**:1108-1124.
98. **Lei, B., M. Liu, S. Huang, and S. C. Tu.** 1994. *Vibrio harveyi* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. *J Bacteriol* **176**:3552-3558.
99. **LinWu, S. W., C. J. Syu, Y. L. Chen, A. H. Wang, and F. C. Peng.** 2009. Characterization of *Escherichia coli* nitroreductase NfsB in the metabolism of nitrobenzodiazepines. *Biochem Pharmacol* **78**:96-103.
100. **Liochev, S. I., A. Hausladen, and I. Fridovich.** 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:3537-3539.
101. **Liu, G., J. Zhou, Q. S. Fu, and J. Wang.** 2009. The *Escherichia coli* azoreductase AzoR is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. *J Bacteriol* **191**:6394-6400.
102. **Liu, G., J. Zhou, R. Jin, M. Zhou, J. Wang, H. Lu, and Y. Qu.** 2008. Enhancing survival of *Escherichia coli* by expression of azoreductase AZR possessing quinone reductase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**:409-416.
103. **Liu, G., J. Zhou, H. Lv, X. Xiang, J. Wang, M. Zhou, and Y. Qv.** 2007. Azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 is a flavodoxin that also functions as nitroreductase and flavin mononucleotide reductase. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:1271-1279.
104. **Liu, G., J. Zhou, J. Wang, B. Yan, J. Li, H. Lu, Y. Qu, and R. Jin.** 2008. Site-directed mutagenesis of substrate binding sites of azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett.* **30**:869-875.
105. **Liu, G., J. Zhou, J. Wang, M. Zhou, H. Lu, and R. Jin.** 2009. Acceleration of azo dye decolorization by using quinone reductase activity of azoreductase and quinone redox mediator. *Bioresour. Technol.* **100**:2791-2795.
106. **Liu, Z. J., H. Chen, N. Shaw, S. L. Hopper, L. Chen, S. Chen, C. E. Cerniglia, and B. C. Wang.** 2007. Crystal structure of an aerobic FMN-dependent azoreductase (AzoA) from *Enterococcus faecalis*. *Arch Biochem Biophys* **463**:68-77.
107. **Lu, H., J. Zhou, J. Wang, H. Ai, C. Zheng, and Y. Yang.** 2008. Decolorization of anthraquinone dye intermediate and its accelerating effect on reduction of azo acid dyes by *Sphingomonas xenophaga* in anaerobic-aerobic process. *Biodegradation* **19**:643-650.

108. **Macwana, S. R., S. Punj, J. Cooper, E. Schwenk, and G. H. John.** 2010. Identification and isolation of an azoreductase from *Enterococcus faecium*. *Curr Issues Mol Biol* **12**:43-48.
109. **Mallett, A. K., L. J. King, and R. Walker.** 1982. A continuous spectrophotometric determination of hepatic microsomal azo reductase activity and its dependence on cytochrome P-450. *The Biochemical journal* **201**:589-595.
110. **Manchon, P. and R. Lowy.** 1965. [Studies on the azoreductase activity of supernatants of homogenates of rat liver. II. Comparison with other preparations. Variations with age and the ingestion of dye]. *Food Cosmet. Toxicol* **3**:783-787.
111. **Mansour, H. B., R. Mosrati, D. Corroler, K. Ghedira, D. Barillier, and L. Chekir-Ghedira.** 2009. Mutagenicity and genotoxicity of acid yellow 17 and its biodegradation products. *Drug Chem Toxicol* **32**:222-229.
112. **Mascitelli-Coriandoli, E. And C. Citterio.** 1959. [Azoreductase in neoplastic liver tissue. II. Variations during oncogenesis and the effect of treatment with flavin]. *Z. Naturforsch. B* **14B**:612-613.
113. **Matsumoto, K., Y. Mukai, D. Ogata, F. Shozui, J. M. Nduko, S. Taguchi, and T. Ooi.** 2010. Characterization of thermostable FMN-dependent NADH azoreductase from the moderate thermophile *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:1431-1438.
114. **McBain, A. J. and G. T. Macfarlane.** 2001. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. *J Med Microbiol* **50**:833-842.
115. **McBain, A. J. and G. T. Macfarlane.** 1998. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* **47**:407-416.
116. **McCalla, D. R., A. Reuvers, and C. Kaiser.** 1970. Mode of action of nitrofurazone. *J Bacteriol* **104**:1126-1134.
117. **McFARLAND, J.** 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **XLIX**:1176-1178.
118. **Mechsner, K. and K. Wuhrmann.** 1982. Cell permeability as a rate limiting factor in the microbial reduction of sulfonated azo dyes. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**:123-126.
119. **Mendes, S., A. Farinha, C. G. Ramos, J. H. Leitao, C. A. Viegas, and L. O. Martins.** 2011. Synergistic action of azoreductase and laccase leads to maximal decolourization and detoxification of model dye-containing wastewaters. *Bioresour. Technol.* **102**:9852-9859.
120. **Mendes, S., L. Pereira, C. Batista, and L. O. Martins.** 2011. Molecular determinants of azo reduction activity in the strain *Pseudomonas putida* MET94. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**:393-405.

121. **Meng, X., G. Liu, J. Zhou, F. Q. Shiang, and G. Wang.** 2012. Azo dye decolorization by *Shewanella aquimarina* under saline conditions. *Bioresour. Technol.* **114**:95-101.
122. **Mermod, M., F. Murlane, S. Waltersperger, A. E. Oberholzer, U. Baumann, and M. Solioz.** 2010. Structure and function of CinD (YtjD) of *Lactococcus lactis*, a copper-induced nitroreductase involved in defense against oxidative stress. *Journal of bacteriology* **192**:4172-4180.
123. **Mielgo, I., C. Lopez, M. T. Moreira, G. Feijoo, and J. M. Lema.** 2003. Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology progress* **19**:325-331.
124. **Mihara, M., T. Nakai, T. Iwai, T. Ito, and T. Mizuno.** Solvent-Free Basic or KF/Alumina-Assisted Dehydrogenation of Hydrazo Compounds.
125. **Miller, P. F., L. F. Gambino, M. C. Sulavik, and S. J. Gracheck.** 1994. Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38**:1773-1779.
126. **Miura, K., Y. Tomioka, H. Suzuki, M. Yonezawa, T. Hishinuma, and M. Mizugaki.** 1997. Molecular cloning of the *nemA* gene encoding N-ethylmaleimide reductase from *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* **20**:110-112.
127. **Moch, C., O. Schrogel, and R. Allmansberger.** 2000. Transcription of the *nfrA-ywch* operon from *Bacillus subtilis* is specifically induced in response to heat. *J Bacteriol* **182**:4384-4393.
128. **Morrison, J. M., C. M. Wright, and G. H. John.** 2012. Identification, Isolation and characterization of a novel azoreductase from *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* **18**:229-234.
129. **Mostertz, J., C. Scharf, M. Hecker, and G. Homuth.** 2004. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression in response to superoxide and peroxide stress. *Microbiology* **150**:497-512.
130. **Moutaouakkil, A., Y. Zeroual, D. F. Zohra, M. Talbi, K. Lee, and M. Blaghen.** 2003. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. *Arch Biochem Biophys* **413**:139-146.
131. **Mugerfeld, I., B. A. Law, G. S. Wickham, and D. K. Thompson.** 2009. A putative azoreductase gene is involved in the *Shewanella oneidensis* response to heavy metal stress. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**:1131-1141.
132. **Nakanishi, M., C. Yatome, N. Ishida, and Y. Kitade.** 2001. Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *J Biol Chem* **276**:46394-46399.
133. **Nishiya, Y. and Y. Yamamoto.** 2007. Characterization of a NADH:dichloroindophenol oxidoreductase from *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**:611-614.
134. **Nokhbeh, M. R., S. Boroumandi, N. Pokorny, P. Koziarz, E. S. Paterson, and I. B. Lambert.** 2002. Identification and characterization of *SnrA*, an inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* TA1535. *Mutat. Res* **508**:59-70.

135. **Ogata, D., T. Ooi, T. Fujiwara, S. Taguchi, I. Tanaka, and M. Yao.** 2010. Crystallization and preliminary X-ray studies of azoreductases from *Bacillus* sp. B29. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **66**:503-505.
136. **Olukanni, O. D., A. A. Osuntoki, D. C. Kalyani, G. O. Gbenle, and S. P. Govindwar.** 2010. Decolorization and biodegradation of Reactive Blue 13 by *Proteus mirabilis* LAG. *J Hazard. Mater* **184**:290-298.
137. **Ooi, T., T. Shibata, K. Matsumoto, S. Kinoshita, and S. Taguchi.** 2009. Comparative enzymatic analysis of azoreductases from *Bacillus* sp. B29. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **73**:1209-1211.
138. **Ooi, T., T. Shibata, R. Sato, H. Ohno, S. Kinoshita, T. L. Thuoc, and S. Taguchi.** 2007. An azoreductase, aerobic NADH-dependent flavoprotein discovered from *Bacillus* sp.: functional expression and enzymatic characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:377-386.
139. **Oturkar, C. C., H. N. Nemade, P. M. Mulik, M. S. Patole, R. R. Hawaldar, and K. R. Gawai.** 2011. Mechanistic investigation of decolorization and degradation of reactive red 120 by *Bacillus lentus* BI377. *Bioresour. Technol.* **102**:758-764.
140. **Parshetti, G. K., A. A. Telke, D. C. Kalyani, and S. P. Govindwar.** 2010. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Journal of hazardous materials* **176**:503-509.
141. **Pasti-Grigsby, M. B., A. Paszczynski, S. Goszczynski, D. L. Crawford, and R. L. Crawford.** 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology* **58**:3605-3613.
142. **Paterson, E. S., S. E. Boucher, and I. B. Lambert.** 2002. Regulation of the *nfsA* Gene in *Escherichia coli* by SoxS. *J Bacteriol* **184**:51-58.
143. **Perez-Reinado, E., R. Blasco, F. Castillo, C. Moreno-Vivian, and M. D. Roldan.** 2005. Regulation and characterization of two nitroreductase genes, *nprA* and *nprB*, of *Rhodobacter capsulatus*. *Appl Environ Microbiol* **71**:7643-7649.
144. **Peterson, F. J., R. P. Mason, J. Hovsepian, and J. L. Holtzman.** 1979. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J Biol Chem* **254**:4009-4014.
145. **Pricelius, S., C. Held, M. Murkovic, M. Bozic, V. Kokol, A. Cavaco-Paulo, and G. M. Guebitz.** 2007. Enzymatic reduction of azo and indigoid compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:321-327.
146. **Prosser, G. A., J. N. Copp, S. P. Syddall, E. M. Williams, J. B. Smail, W. R. Wilson, A. V. Patterson, and D. F. Ackerley.** 2010. Discovery and evaluation of *Escherichia coli* nitroreductases that activate the anti-cancer prodrug CB1954. *Biochem Pharmacol* **79**:678-687.
147. **Punj, S. and G. H. John.** 2009. Purification and identification of an FMN-dependent NAD(P)H azoreductase from *Enterococcus faecalis*. *Curr Issues Mol Biol* **11**:59-65.

148. **Race, P. R., A. L. Lovering, R. M. Green, A. Ossor, S. A. White, P. F. Searle, C. J. Wrighton, and E. I. Hyde.** 2005. Structural and mechanistic studies of Escherichia coli nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* **280**:13256-13264.
149. **Rafii, F. and C. E. Cerniglia.** 1993. Comparison of the azoreductase and nitroreductase from *Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol* **59**:1731-1734.
150. **Rafii, F. and C. E. Cerniglia.** 1995. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environ Health Perspect.* **103 Suppl 5**:17-19.
151. **Rafii, F. and T. Coleman.** 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of an azoreductase gene from *Clostridium perfringens* and comparison with azoreductase genes from other bacteria. *J Basic Microbiol* **39**:29-35.
152. **Rafii, F., W. Franklin, and C. E. Cerniglia.** 1990. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol* **56**:2146-2151.
153. **Rafii, F., M. Park, C. G. Gamboa da, and L. Camacho.** 2009. Comparison of the metabolic activities of four wild-type *Clostridium perfringens* strains with their gatifloxacin-selected resistant mutants. *Arch Microbiol* **191**:895-902.
154. **Rafii, F., D. B. Smith, R. W. Benson, and C. E. Cerniglia.** 1992. Immunological homology among azoreductases from *Clostridium* and *Eubacterium* strains isolated from human intestinal microflora. *J Basic Microbiol* **32**:99-105.
155. **Rafii, F. and C. Cerniglia.** 1993. Localization of the azoreductase of *Clostridium perfringens* by immuno-electron microscopy. *Current Microbiology* **27**:143-145.
156. **Rafii, F., W. Franklin, R. H. Heflich, and C. E. Cerniglia.** 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **57**:962-968.
157. **Ramalho, P. A., S. Paiva, A. Cavaco-Paulo, M. Casal, M. H. Cardoso, and M. T. Ramalho.** 2005. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of plasma membrane ferric reductase. *Applied and environmental microbiology* **71**:3882-3888.
158. **Rau, J., H. J. Knackmuss, and A. Stolz.** 2002. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ Sci Technol.* **36**:1497-1504.
159. **Rau, J. and A. Stolz.** 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent Azo reductases. *Appl Environ Microbiol* **69**:3448-3455.
160. **Renton, K. W.** 1980. Methyl red azo-reductase and its induction by 3-methylcholanthrene in the liver by different species. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **10**:243-246.

161. **Roldan, M. D., E. Perez-Reinado, F. Castillo, and C. Moreno-Vivian.** 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol Rev.* **32**:474-500.
162. **Ruiz, J. F., K. Kedziora, H. Windle, D. P. Kelleher, and J. F. Gilmer.** 2011. Investigation into drug release from colon-specific azoreductase-activated steroid prodrugs using in-vitro models. *J Pharm Pharmacol* **63**:806-816.
163. **Russ, R., J. Rau, and A. Stolz.** 2000. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and environmental microbiology* **66**:1429-1434.
164. **Ryan, A., N. Laurieri, I. Westwood, C. J. Wang, E. Lowe, and E. Sim.** 2010. A novel mechanism for azoreduction. *J Mol Biol* **400**:24-37.
165. **Ryan, A., C. J. Wang, N. Laurieri, I. Westwood, and E. Sim.** 2010. Reaction mechanism of azoreductases suggests convergent evolution with quinone oxidoreductases. *Protein Cell* **1**:780-790.
166. **Sabnis, R. W.** 2010. H, p. 223-238. *In Handbook of Biological Dyes and Stains.* John Wiley & Sons, Inc.
167. **Scheline, R. R., R. T. Nygaard, and B. Longberg.** 1970. Enzymatic reduction of the azo dye, acid yellow, by extracts of *Streptococcus faecalis* isolated from rat intestine. *Food and cosmetics toxicology* **8**:55-58.
168. **Seesuriyachan, P., S. Takenaka, A. Kuntiya, S. Klayraung, S. Murakami, and K. Aoki.** 2007. Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. *Water Res* **41**:985-992.
169. **Sirois, J., E. Bizier, And G. Cardin-Bernier.** april 2010. method of identifying endogenous fluorescent biological markers for monitoring cells. WO2010043021.
170. **Song, Z. Y., J. T. Zhou, J. Wang, B. Yan, and C. H. Du.** 2003. Decolorization of azo dyes by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett.* **25**:1815-1818.
171. **Spain, J. C.** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol* **49**:523-555.
172. **Stingley, R. L., W. Zou, T. M. Heinze, H. Chen, and C. E. Cerniglia.** 2010. Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. *J Med Microbiol* **59**:108-114.
173. **Stolz, A.** 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied microbiology and biotechnology* **56**:69-80.
174. **Streker, K., C. Freiberg, H. Labischinski, J. Hacker, and K. Ohlsen.** 2005. *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *J Bacteriol* **187**:2249-2256.
175. **Sugiura, W., T. Yoda, T. Matsuba, Y. Tanaka, and Y. Suzuki.** 2006. Expression and characterization of the genes encoding azoreductases from *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:1655-1665.

176. **Suzuki, Y., T. Yoda, A. Ruhul, and W. Sugiura.** 2001. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-2 isolated from soil. *J Biol Chem* **276**:9059-9065.
177. **Taylor, R. G., D. C. Walker, and R. R. McInnes.** 1993. *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research* **21**:1677-1678.
178. **Thompson, M. R., N. C. VerBerkmoes, K. Chourey, M. Shah, D. K. Thompson, and R. L. Hettich.** 2007. Dosage-dependent proteome response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to acute chromate challenge. *J Proteome Res* **6**:1745-1757.
179. **Thorn, J. M., J. D. Barton, N. E. Dixon, D. L. Ollis, and K. J. Edwards.** 1995. Crystal structure of *Escherichia coli* QOR quinone oxidoreductase complexed with NADPH. *Journal of molecular biology* **249**:785-799.
180. **Towe, S., M. Leelakriangsak, K. Kobayashi, D. N. van, M. Hecker, P. Zuber, and H. Antelmann.** 2007. The MarR-type repressor MhqR (YkvE) regulates multiple dioxygenases/glyoxalases and an azoreductase which confer resistance to 2-methylhydroquinone and catechol in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66**:40-54.
181. **Tropel, D. and d. M. van, Jr.** 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**:474-500.
182. **Umezawa, Y., T. Shimada, A. Kori, K. Yamada, and A. Ishihama.** 2008. The uncharacterized transcription factor YdhM is the regulator of the *nemA* gene, encoding N-ethylmaleimide reductase. *J Bacteriol* **190**:5890-5897.
183. **Valle, A., B. S. Le, J. Bolivar, G. Cabrera, and D. Cantero.** 2012. Study of the role played by NfsA, NfsB nitroreductase and NemaA flavin reductase from *Escherichia coli* in the conversion of ethyl 2-(2'-nitrophenoxy)acetate to 4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA), a benzohydroxamic acid with interesting biological properties. *Applied microbiology and biotechnology* **94**:163-171.
184. **Vass, S. O., D. Jarrom, W. R. Wilson, E. I. Hyde, and P. F. Searle.** 2009. *E. coli* NfsA: an alternative nitroreductase for prodrug activation gene therapy in combination with CB1954. *Br J Cancer* **100**:1903-1911.
185. **Vorontsov, I. I., G. Minasov, J. S. Brunzelle, L. Shuvalova, O. Kiryukhina, F. R. Collart, and W. F. Anderson.** 2007. Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *Protein Sci* **16**:2483-2490.
186. **Wang, C. J., C. Hagemeyer, N. Rahman, E. Lowe, M. Noble, M. Coughtrie, E. Sim, and I. Westwood.** 2007. Molecular cloning, characterisation and ligand-bound structure of an azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **373**:1213-1228.
187. **Wang, C. J., N. Laurieri, A. Abuhammad, E. Lowe, I. Westwood, A. Ryan, and E. Sim.** 2010. Role of tyrosine 131 in the active site of paAzoR1, an azoreductase with specificity for the inflammatory bowel disease prodrug balsalazide. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **66**:2-7.

188. **Wang, J., B. Yan, J. T. Zhou, Y. M. Bao, H. Lu, and X. D. Yuan.** 2005. Biodegradation of azo dyes by genetically engineered azoreductase. *J Environ Sci (China)* **17**:545-550.
189. **Wang, M., K. Funabiki, and M. Matsui.** 2003. Synthesis and properties of bis(hetaryl)azo dyes. *Dyes and Pigments* **57**:77-86.
190. **Wang, R. F., H. Chen, D. D. Paine, and C. E. Cerniglia.** 2004. Microarray method to monitor 40 intestinal bacterial species in the study of azo dye reduction. *Biosensors & bioelectronics* **20**:699-705.
191. **Watanabe, M., M. Ishidate, Jr., and T. Nohmi.** 1990. Nucleotide sequence of Salmonella typhimurium nitroreductase gene. *Nucleic Acids Res* **18**:1059.
192. **Whiteway, J., P. Koziarz, J. Veall, N. Sandhu, P. Kumar, B. Hoecher, and I. B. Lambert.** 1998. Oxygen-insensitive nitroreductases: analysis of the roles of nfsA and nfsB in development of resistance to 5-nitrofur derivatives in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:5529-5539.
193. **Xu, H., T. M. Heinze, S. Chen, C. E. Cerniglia, and H. Chen.** 2007. Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol* **73**:7759-7762.
194. **Xu, H., T. M. Heinze, D. D. Paine, C. E. Cerniglia, and H. Chen.** 2010. Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract. *Anaerobe* **16**:114-119.
195. **Yagi, T.** 1991. Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **23**:211-225.
196. **Yang, Y. Y., L. N. Du, G. Wang, X. M. Jia, and Y. H. Zhao.** 2011. The decolorisation capacity and mechanism of *Shewanella oneidensis* MR-1 for methyl orange and acid yellow 199 under microaerophilic conditions. *Water Sci Technol.* **63**:956-963.
197. **Zenno, S., T. Kobori, M. Tanokura, and K. Saigo.** 1998. Conversion of NfsA, the major *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase with an activity similar to that of Frp, a flavin reductase in *Vibrio harveyi*, by a single amino acid substitution. *J Bacteriol* **180**:422-425.
198. **Zenno, S., T. Kobori, M. Tanokura, and K. Saigo.** 1998. Purification and characterization of NfrA1, a *Bacillus subtilis* nitro/flavin reductase capable of interacting with the bacterial luciferase. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:1978-1987.
199. **Zenno, S., H. Koike, A. N. Kumar, R. Jayaraman, M. Tanokura, and K. Saigo.** 1996. Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J Bacteriol* **178**:4508-4514.
200. **Zenno, S., H. Koike, M. Tanokura, and K. Saigo.** 1996. Conversion of NfsB, a minor *Escherichia coli* nitroreductase, to a flavin reductase similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*, by a single amino acid substitution. *J Bacteriol* **178**:4731-4733.
201. **Zenno, S., H. Koike, M. Tanokura, and K. Saigo.** 1996. Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar

- in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J Biochem* **120**:736-744.
202. **Zenno, S., K. Saigo, H. Kanoh, and S. Inouye.** 1994. Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* **176**:3536-3543.
203. **Zhanel, G. G., D. J. Hoban, and J. A. Karlowsky.** 2001. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**:324-326.
204. **Zimmermann, T., F. Gasser, H. G. Kulla, and T. Leisinger.** 1984. Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. *Archives of microbiology* **138**:37-43.
205. **Zimmermann, T., H. G. Kulla, and T. Leisinger.** 1982. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *European journal of biochemistry / FEBS* **129**:197-203.
206. **Line, J.E., N. J. Stern, B. B. Oakley , and B.S. Seal.** 2011. Comparison of an automated most-probable-number technique with traditional plating methods for estimating populations of total aerobes, coliforms, and *Escherichia coli* associated with freshly processed broiler chickens. *Journal of Food Protection* **9**:1558-1563
207. **Blümel, S, M. Contzen, M. Lutz, A. Stolz, and H. J. Knackmuss.**1998. Isolation of a Bacterial Strain with the Ability To Utilize the Sulfonated Azo Compound 4-Carboxy-4'-Sulfoazobenzene as the Sole Source of Carbon and Energy. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(6) :2315-2317

## Résumé

Les activités réductases sont des activités enzymatiques largement répandues au sein des microorganismes. Parmi ces activités enzymatiques, il est possible de distinguer différentes familles en fonction des substrats réduits. Par exemple, il existe les enzymes azoréductases qui catalysent la réduction des ponts « azo » (N=N) de ces substrats et les enzymes nitroréductases qui catalysent la réduction de la fonction nitro (NO<sub>2</sub>) de ces substrats. Ce travail vise à étudier la répartition des activités réductases telles que nitroréductase et azoréductase au sein des microorganismes à l'aide de substrats qui deviennent fluorescent une fois réduits. Ce travail a pour but d'évaluer la pertinence d'utilisation de ces activités enzymatiques dans des tests diagnostique de détection voire d'identification des microorganismes recherchés dans un cadre clinique ou industriel. Une étude approfondie de ces activités enzymatiques a été effectuée sur une espèce à Gram négatif (*Escherichia coli*) et une espèce à Gram positif (*Enterococcus faecalis*). L'étude *in silico* suivie de l'étude *in vitro* ont mis en évidence une seule enzyme (AzoR) ayant une activité azoréductase chez *E. coli* et 2 enzymes (AzoA et EF0404) chez *E. faecalis*. Toutes ces enzymes utilisent préférentiellement le NADH comme cofacteur pour leur activité azoréductase. Concernant l'activité nitroréductase, 3 enzymes (NfsA, NfsB et AzoR) ont été mises en évidence chez *E. coli* comme ayant une activité nitroréductase tandis que 5 enzymes (AzoA, EF0404, EF1181, EF0648 et EF0655) ont été identifiées comme étant des nitroréductases chez *E. faecalis*. Toutes ces enzymes, excepté l'enzyme EF1181, sont capables d'utiliser le NADH et le NADPH comme cofacteur. Cependant, l'activité semble plus rapide avec le NADPH pour les enzymes AzoA, EF0404, AzoR et NfsA. L'enzyme EF1181 n'est capable d'utiliser que le NADPH comme cofacteur. Toutes ces enzymes étudiées sont des flavoprotéines dont la dépendance à la flavine sous forme FMN pour leur activité réductase a pu être montrée, exceptée pour l'enzyme NfsA et l'enzyme AzoR (pour son activité azoréductase). L'étude *in vivo* menée chez *E. coli* a mis en évidence le rôle indispensable d'AzoR dans l'activité azoréductase aérobie alors qu'en conditions d'anaérobies la protéine AzoR est, certes, impliquée, mais une voie non précisément caractérisée à ce jour, indépendante de l'enzyme AzoR, prend rapidement le relais. L'activité nitroréductase cellulaire est due majoritairement au couple NfsA/NfsB. Une activité cellulaire résiduelle de 30% est assurée par d'autres mécanismes restant à identifier.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de conclure à une répartition homogène des activités réductases au sein d'une espèce bactérienne. La capacité de réduction des substrats est variable en fonction des espèces de microorganismes. Des substrats peuvent être réduits par l'ensemble des espèces testées ou bien quelques espèces en particulier. Dans ce cadre, la caractérisation biochimique des activités nitroréductases et azoréductases ainsi que la mise en évidence des systèmes de régulation par l'oxygène de ces voies métaboliques permettra d'optimiser et d'étendre l'utilisation de ces activités enzymatiques dans des tests de diagnostic.

Mots clés : azoréductase nitroréductase *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, Methyl red, acide 7-nitrocoumarine-3-carboxylique, NADH, NADPH, flavine, FMN.

## Abstract

Reductase activities are enzymatic activities largely widespread among microorganisms. Among these enzymatic activities, it is possible to distinguish different families based on the reduced substrates. For example, there are azoreductase enzymes that catalyze the reduction of the nitrogen double bonds (N = N) of “azo” compounds and nitroreductase that catalyze the reduction of the nitro group (NO<sub>2</sub>) of the “nitro” substrates. This work aims to study the distribution of reductase activities such as nitroreductase and azoreductase among microorganisms using substrates that become fluorescent when reduced. This work aims to evaluate the appropriateness of using these enzyme activities in diagnostic tests for detection or identification of microorganisms sought in a clinical or industrial environment. A thorough study of these enzyme activities was carried out on a Gram-negative species (*Escherichia coli*) and Gram-positive species (*Enterococcus faecalis*). The *in silico* and *in vitro* studies showed a single enzyme (AzoR) with azoreductase activity in *E. coli* and 2 enzymes (AzoA and EF0404) in *E. faecalis*. All these enzymes preferentially use NADH as cofactor for their azoreductase activity. Three enzymes (NfsA, NfsB and AzoR) have been identified in *E. coli* as having a nitroreductase activity while 5 enzymes (AzoA, EF0404, EF1181, EF0648 and EF0655) have been identified as nitroreductases in *E. faecalis*. All these enzymes, except for the EF1181 enzyme, are able to use NADH and NADPH as cofactor. However, the activity of AzoA, EF0404, AzoR and NfsA seems faster with NADPH. The EF1181 enzyme is able to only use the NADPH as a cofactor. All these enzymes are flavoproteins, which the flavin dependence (FMN) has been shown for their reductase activity except for the enzyme NfsA and the enzyme AzoR (for its azoreductase activity). The *in vivo* study in *E. coli* has highlighted the essential role of AzoR in aerobic azoreductase activity, whereas in anaerobic conditions, the protein AzoR is involved in azoreductase activity but a way not precisely characterized to date, independent of the enzyme AzoR, takes over quickly. Cellular nitroreductase activity is due mainly to the couple NFSA / NfsB. The remaining cellular activity (30% ) is provided by other mechanisms to identify.

The results obtained in this study led to the conclusion that a homogeneous distribution of reductases activities within a bacterial species. Reducing capacities of the substrates depend on the microorganisms species. Substrates can be reduced by all tested species or a few species in particular. In this context, the biochemical characterization of nitroreductase and azoreductase activities and the highlighting control systems by oxygen of these pathways will optimize and extend the use of these enzyme activities in diagnostic tests.

Key words : azoreductase nitroreductase *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, Methyl red, 7-nitrocoumarine-3-carboxylic acid, NADH, NADPH, flavin, FMN.

bioMérieux-R&D Microbiologie  
3, route de Port Michaud  
38390 La Balme les Grottes

UMR 5240 Microbiologie, Adaptation, Pathogénie  
Equipe « Mécanismes de multirésistance et virulence chez *Legionella* »  
Université Lyon 1  
bâtiment Lwoff, 3<sup>ème</sup> étage  
10, rue Raphaël Dubois  
69622 Villeurbanne Cedex