

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand Frappier

## **Investigation du rôle physiologique de l'hydrogénase [NiFe] à haute affinité du groupe 5 chez *Streptomyces avermitilis***

Par  
Quentin Liot

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Biologie

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
Examineur interne

Eric Déziel  
INRS - Institut Armand Frappier

Examineur externe

Carole Beaulieu  
Faculté des Sciences  
Université de Sherbrooke

Examineur externe

George Szatmari  
Département de microbiologie, infectiologie  
et immunologie  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Philippe Constant  
INRS – Institut Armand Frappier



# REMERCIEMENTS

Entre le début de mon doctorat jusqu'à la rédaction de cette thèse, il se sera passé plusieurs années durant lesquelles j'ai côtoyé professeurs, étudiants, et autres membres de l'Institut Armand Frappier, sans qui ce doctorat n'aurait pas pu être celui qu'il a été.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement et chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. Philippe Constant. Merci Philippe, pour m'avoir guidé et aidé toutes ces années, pour ta patience infinie, ta compréhension, ton dialogue, et ce jusqu'au bout. Ça n'a pas toujours été facile, mais on y sera parvenu !

Merci aussi à Liliana, Isabelle, Sarah, Mondher et Virginie, avec qui j'ai eu la joie de travailler dans une ambiance amicale et complice, grâce à laquelle je ne suis jamais venu au labo « à reculons ». Merci aussi à tout le laboratoire du Pr. Claude Guertin, à commencer par Claude lui-même, Audrey-Anne, Narin, Amélie, et Jean-Philippe, pour nos longues discussions durant les réunions inter-labos, les litres de café et les kilos de gâteaux engloutis dans votre bureau.

Je n'oublie pas non plus tous les étudiants et professeurs travaillant à mes côtés dans le département d'écologie microbienne, Florian, Christine, Marie-Christine, Sophie, Servane, Fabrice, et tant d'autres, qui ont vécu mon quotidien tout ce temps, le Pr. Eric Déziel qui a su m'aiguiller avec ses conseils, Sylvain Milot et sa capacité à tout réparer, et le Pr. François Shareck dont la collection de souches et de vecteurs fut une mine d'or pour moi. Merci aussi à Amélie Côté et son programme d'Apprentis en Bioscience, car chaque année, cette semaine intense fut un réel plaisir. Merci aussi à Michel Courcelle, à la bibliothèque, pour arriver à trouver les articles, livres, thèses, nécessaires en un temps record. Et merci à tous les autres étudiants et membre de cet Institut pour leur accueil et l'ambiance positive qui y règne grâce à eux.

Finalement, merci à ma famille, mes amis, qui depuis toujours me soutiennent dans cette quête de savoir, sans qui je n'aurais sans doute pas eu le courage ni les moyens matériels d'aller si loin, et pour m'avoir soutenu dans les moments les plus durs.

# RÉSUMÉ

La bactérie du sol *Streptomyces avermitilis* est un microorganisme chimioorganotrophe qui alterne entre deux modes de vie, mycélium ou spores, selon la disponibilité des nutriments dans son milieu. Bien qu'elle puisse être exposée à des concentrations d'H<sub>2</sub> allant jusqu'à 10 000 ppmv en périphérie des nodules racinaires, cette bactérie possède la propriété exceptionnelle d'oxyder l'H<sub>2</sub> à des concentrations troposphériques (0,53 ppmv) avec une très haute affinité ( $K_{m(\text{app})} = 51 \text{ ppmv}$ ), cette activité étant restreinte aux spores uniquement. On retrouve dans son génome un groupe de gènes codant pour une hydrogénase [NiFe] à haute affinité (HHA) hypothétique, récemment caractérisée *in silico*. Les HHA se retrouvent principalement chez les actinobactéries, mais elles sont également détectées chez certaines acidobactéries, des protéobactéries et des chloroflexi. Le rôle physiologique de ces hydrogénases au  $K_m$  atypique est encore méconnu, malgré leur grande importance dans le bilan atmosphérique global de l'H<sub>2</sub>. Considérant l'expression de l'HHA dans les spores de *S. avermitilis* et son potentiel théorique suffisant pour combler les besoins énergétiques liés à la maintenance, l'hypothèse générale qui a fait l'objet de cette thèse de doctorat est que l'HHA joue un rôle dans la viabilité des spores chez les streptomycètes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons d'abord entrepris une étude transcriptomique sur des spores de *S. avermitilis* incubées en présence d'H<sub>2</sub> atmosphérique (0,53 ppmv) ou en saturant l'enzyme avec son substrat (500 ppmv), pour en analyser l'expression des gènes et en déduire l'impact sur la physiologie de la cellule. Cette expérience a révélé l'existence d'un nouveau mode de mixotrophie où les besoins énergétiques de la bactérie seraient comblés par l'H<sub>2</sub>, avec une diminution de sa dépendance aux sources de carbone organique du milieu. L'augmentation de la concentration d'H<sub>2</sub>, et donc de l'énergie apportée via l'hydrogénase, a effectivement mené à une sous-expression des enzymes impliquées dans le transport et le métabolisme des composés organiques, en plus des sous-unités de la NADH-déshydrogénase faisant le lien entre le catabolisme du carbone et la production d'ATP. Contrairement à la convention voulant que la mixotrophie additionne les sources d'énergies organique et inorganique pour supporter la croissance, la mixotrophie chez les streptomycètes est impliquée dans la dormance uniquement. Elle balancerait les sources d'énergie pour maintenir le métabolisme minimal en privilégiant l'utilisation du substrat inorganique, ubiquitaire, virtuellement illimité, et ne nécessitant qu'une seule enzyme, tout en complétant les besoins énergétiques résiduels par le métabolisme de composés organiques, limités, très diversifiés, et requérant un large éventail d'enzymes car réfractaires au métabolisme. En plus de l'impact sur le métabolisme énergétique des spores, l'exposition à l'H<sub>2</sub> a entraîné des variations dans l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire. L'apport d'énergie supplémentaire a entraîné la sous-expression de la ppGpp-synthase synthétisant l'alarmone Guanosine Pentaphosphate (ppGpp), responsable de la réponse stringente. L'effet du ppGpp étant pléiotrope, on lui a associé la sous-expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse au stress et le métabolisme lié aux antibiotiques (synthèse et défense) observée en présence de hautes concentrations d'H<sub>2</sub>. Pour confirmer le rôle physiologique de l'HHA dans une mixotrophie atypique, nous avons finalement entrepris l'élaboration d'un mutant de délétion pour ses gènes structuraux *hhySL*. Cette mutation n'a eu aucun impact sur la croissance du mycélium végétatif ou la maturation des spores. L'abolition de l'activité hydrogénase a cependant mené à une baisse drastique (-76%) de la viabilité des spores chez la souche mutante. L'HHA est donc impliquée dans une nouvelle forme de mixotrophie que nous avons nommée « mixotrophie de survie », exclusive aux streptomycètes. Cette thèse constitue un apport important dans le domaine de la biogéochimie de l'H<sub>2</sub>. Effectivement, nous sommes les premiers à démontrer que le rôle physiologique de l'HHA des streptomycètes se distingue de celui retrouvé chez d'autres

actinobactéries, telle que *Mycobacterium smegmatis* exprimant l'HHA dès la phase de croissance exponentielle en suivant un mode mixotrophique classique. La réponse des bactéries oxydant l'H<sub>2</sub> exposées à des sources d'H<sub>2</sub> diffuses dans l'environnement serait donc plus complexe que la notion de juxtaposition des bactéries en fonction de leur affinité pour leur substrat actuellement acceptée dans la littérature. L'impact de la mixotrophie de survie reste donc à être évalué d'un point de vue écologique, celle-ci pouvant moduler la structure et les fonctions des communautés microbiennes du sol via la persistance et la production de métabolites secondaires.

Mots clés : actinobactéries, streptomycètes, hydrogénase NiFe du groupe 5, gaz traces, mixotrophie, réserve de biomasse microbienne, persistance microbienne, mixotrophie de survie

---

Étudiant

---

Directeur de recherche

# ABSTRACT

The soil bacterium *Streptomyces avermitilis* is a chemoorganotrophic microorganism that alternates between two life stages, mycelium or spores, according to the abundance or deficiency of nutrients in its medium. Although it can be exposed to H<sub>2</sub> concentrations up to 10,000 ppmv on the outskirts of the root nodules, this bacterium has the unique property of oxidizing H<sub>2</sub> in tropospheric concentrations (0,53 ppmv) with a very high affinity ( $K_{m(\text{app})} = 51$  ppmv), this activity being restricted to spores only. We found in its genome a gene cluster encoding an hypothetical high affinity [NiFe] hydrogenase (HAH) recently characterized *in silico*. The HAH is mainly found in actinobacteria, but it is also detected in some acidobacteria, proteobacteria and chloroflexi. The physiological role of this hydrogenase arboring an atypical  $K_m$  is still unknown, despite its importance in the overall assessment of atmospheric H<sub>2</sub>. Considering its expression in the spores and the sufficient theoretical energy potential to meet the energy needs for maintenance, the general assumption that is the subject of this doctoral thesis is that the HAH plays a role in the survival of spores in streptomycetes. In order to challenge this hypothesis, we first undertook a transcriptomic study of *S. avermitilis* spores, incubated in the presence of atmospheric H<sub>2</sub> (0,53 ppmv) or saturating the enzyme with its substrate (500 ppmv), to analyze gene expression and deducing the impact on cell physiology. This experiment revealed the existence of a new mode of mixotrophy where energy needs of the bacterium are met by H<sub>2</sub>, with a reduction of its dependence on organic carbon sources. Increasing the H<sub>2</sub> concentration, and therefore the energy supplied via the hydrogenase, effectively led to an underexpression of the enzymes involved in the transport and metabolism of organic compounds, in addition to the NADH dehydrogenase subunits, linking carbon catabolism and ATP production. Unlike the conventional wisdom that mixotrophy adds sources of organic and inorganic energies to support growth, this mixotrophy in streptomycetes is involved in dormancy only. It would balance energy sources to maintain a minimal metabolism by favouring the use of inorganic substrate, ubiquitous, virtually unlimited, and requiring only one enzyme, while completing the remaining energy needs by the metabolism of organic compounds, limited, very diverse, requiring a wide range of enzymes, and resistant to metabolism. In addition to the impact on energy metabolism of spores, exposure to H<sub>2</sub> resulted in variations in the expression of genes involved in secondary metabolism. The additional energy supply has resulted in the underexpression of ppGpp synthase synthesizing the alarmone Guanosine pentaphosphate (ppGpp), responsible for the stringent response. The effect of ppGpp being pleiotropic, it was associated with the under-expression of many genes involved in stress response and secondary metabolism linked to antibiotics (synthesis and defense) observed in the presence of high H<sub>2</sub> concentrations. To confirm the physiological role of the HHA in such an atypical mixotrophy, we finally began developing a deletion mutant in its structural genes *hhySL*. This mutation had no impact on the growth of vegetative mycelium nor maturation of spores. The abolition of all hydrogenase activity has, however, led to a drastic decline (-76%) in the viability of spores in the mutant strain. The HAH is therefore involved in a new form of mixotrophy which we named "survival mixotrophy", for now exclusive to *Streptomyces*. This thesis is therefore an important contribution in the field of biogeochemistry of H<sub>2</sub>. Indeed, we are the first to demonstrate that the physiological role of the *Streptomyces*' HAH differs from that found in other actinobacteria such as *Mycobacterium smegmatis*, expressing the HAH during the exponential growth phase and following a conventional mixotrophic mode. The response of H<sub>2</sub> oxidizing bacteria exposed to diffuse sources of H<sub>2</sub> in the environment would thus be more complex than the concept of juxtaposition of bacteria based on their affinity to their substrate, as currently accepted in the literature. The impact of survival

mixotrophy remains to be assessed from an ecological point of view, as it can modulate the structure and function of soil microbial communities through persistence and production of secondary metabolites.

Keywords : actinobacteria, streptomyces, group 5 [NiFe] hydrogenase, trace gas, mixotrophy, microbial seed bank, microbial persistence, survival mixotrophy

# TABLE DES MATIÈRES

<b>I. REVUE LITTÉRAIRE.....</b>	<b>1</b>
1. DIFFÉRENTS MÉTABOLISMES CONNUS DU MONDE VIVANT .....	1
1.1. <i>La mixotrophie chez les bactéries</i> .....	2
1.2. <i>Mécanismes de la mixotrophie</i> :.....	4
1.3. <i>Les bactéries mixotrophes oxydant l'H<sub>2</sub></i> .....	4
2. L'OXYDATION ENZYMATIQUE DE L'H <sub>2</sub> .....	6
2.1. <i>Les hydrogénases</i> .....	6
2.2. <i>Les hydrogénases [Fe] et [FeFe]</i> .....	7
2.3. <i>Les hydrogénases [NiFe]</i> .....	8
3. LES MICROORGANISMES POSSEDANT DANS LEUR GENOME DES GENES CODANT POUR DES HYDROGENASES [NiFe] .....	16
3.1. <i>L'oxydation de l'H<sub>2</sub> en anaérobiose</i> .....	16
3.2. <i>L'oxydation de l'H<sub>2</sub> en aérobiose</i> .....	17
4. POTENTIEL ÉNERGETIQUE DE L'HYDROGENASE A HAUTE AFFINITÉ DE <i>S. AVERMITILIS</i> .....	26
<b>II. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>29</b>
<b>III. LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE L'HYDROGENASE A HAUTE AFFINITÉ DE <i>STREPTOMYCES AVERMITILIS</i> .....</b>	<b>30</b>
1. MISE EN CONTEXTE .....	30
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	31
2.1. <i>Organisme modèle</i> .....	31
2.2. <i>Montage expérimental</i> .....	31
3. JUSTIFICATION SUR LES MÉTHODES EMPLOYÉES.....	34
3.1. <i>Méthode transcriptomique</i> .....	34
3.2. <i>Alignement des séquences</i> .....	34
3.3. <i>Test statistique</i> .....	35
3.4. <i>Interprétation des données</i> .....	37
4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	39
4.1. <i>Résultats bruts d'extractions d'ARN et de séquençage</i> .....	39
4.2. L'EXPOSITIONS A DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS D'H <sub>2</sub> N'INFLUE PAS LA DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE ..	40
4.3. <i>L'exposition au H<sub>2</sub> n'entraîne pas d'expression différentielle des gènes impliqués dans la     synthèse ou la maturation des HHA</i> .....	42
4.4. <i>L'exposition au H<sub>2</sub> entraîne de nombreuses variations dans l'expression de gènes impliqués     dans différentes fonctions métaboliques</i> .....	42
4.5. <i>L'exposition à l'H<sub>2</sub> provoque la sous-expression des enzymes responsables de l'absorption des     nutriments</i> .....	43
4.6. <i>L'exposition à l'H<sub>2</sub> influence de nombreuses voies métaboliques des acides aminés</i> .....	44
4.7. <i>Influence de l'exposition à l'H<sub>2</sub> sur le métabolisme primaire du carbone et le métabolisme     énergétique</i> .....	48
4.8. <i>L'exposition à des concentrations élevées en H<sub>2</sub> abaisse le stress cellulaire</i> .....	53
4.9. <i>Synthèse</i> .....	54

<b>IV. MUTATION DE DELETION DES GENES CODANT POUR UNE HYDROGENASE A HAUTE AFFINITE DU GROUPE 5 CHEZ STREPTOMYCES AVERMITILIS :</b>	<b>56</b>
1. PROBLEMATIQUE	56
2. MATERIELS ET METHODES	57
2.1. <i>Microorganismes</i>	57
2.2. <i>Délétion des gènes hhySL</i>	58
2.3. <i>Activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> par les spores</i>	60
2.4. <i>Viabilité des spores</i>	61
2.5. <i>Analyse statistique</i>	62
3. RESULTATS	64
3.1. <i>Mutation de délétion pour les gènes hhySL chez S. avermitilis :</i>	64
3.2. <i>Comparaison des phénotypes des souches sauvage et mutant de délétion pour hhySL</i>	66
3.3. <i>Complémentation</i>	67
4. DISCUSSION	68
<b>V. SYNTHÈSE</b>	<b>71</b>
<b>VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>77</b>
1. AU SEIN DE <i>STREPTOMYCES AVERMITILIS</i>	77
2. DIVERSITÉ ET ABONDANCE DE LA MIXOTROPHIE DE SURVIE	81
3. FACTEURS DÉTERMINANT LA JUXTAPOSITION DES POPULATIONS	83
4. CONCLUSION	84
<b>VII. RÉFÉRENCES</b>	<b>85</b>
<b>VIII. ANNEXES</b>	<b>99</b>
1. TABLEAUX ANNEXES	99
2. PROTOCOLES	106
2.1. <i>Généralités</i>	106
2.2. <i>Protocole 1 : Transformation d'E. coli BW25113 (pIJ790) par le cosmide CL_214_G06</i>	106
2.3. <i>Protocole 2 : Transformation de la cassette de résistance à l'apramycine dans E. coli B1</i>	107
2.4. <i>Protocole 3 : conjugaison entre E. coli C1 et S. avermitilis :</i>	108
2.5. <i>Protocole 4 : Complémentation de la mutation par délétion des gènes hhySL</i>	109
3. MILIEUX DE CULTURE	113
4. TRAITEMENT BIO-INFORMATIQUE DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE D'ARN DE <i>STREPTOMYCES AVERMITILIS</i>	115
4.1. <i>Traitement des données brutes et alignement des séquences sur génome</i>	115
4.2. <i>Analyse de l'expression différentielle avec NOISeqBIO</i>	117
3. ANNEXE : ARTICLE PUBLIÉ	121



# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différentes formes de mixotrophies possibles dans le monde vivant. ....	1
Tableau 2 : Classification, rôle physiologique, accepteur physiologique d'électron, localisation et exemple de bactérie modèle pour les cinq groupes d'hydrogénase [NiFe] connus. ....	10
Tableau 3 : Km apparents d'organismes hydrogénévores à haute, intermédiaire et faible affinité parmi les bactéries du sol codant pour au moins une hydrogénase [NiFe] .....	13
Tableau 4 : Absence d'expression différentielle de gènes impliqués dans quatre stades de développement des streptomycètes.....	41
Tableau 5 : détails des souches bactériennes et vecteurs utilisés dans cette étude .....	57

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schématisation succincte de la respiration bactérienne aérobie chez <i>R. eutropha</i> .....	5
Figure 2 : Modèle de la structure de l'hydrogénase [NiFe] dimérique du groupe 5 chez <i>Ralstonia eutropha</i> H16 d'après une étude cristallographique.....	15
Figure 3 : Arbre phylogénétique du gène <i>hhyL</i> basé sur les séquences d'acides aminés. ....	20
Figure 4 : Structure du groupe de gènes contenant les sous-unités structurales et de maturation de l'hydrogénase hypothétique ainsi que les 4 ORF inconnus, dans le génome de <i>S. avermitilis</i> . ....	22
Figure 5 : Cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide (A), et photographies de spores de Streptomyces en microscopie électronique (B, C, D, E, F) .....	24
Figure 6 : Illustrations du microcosme à phase dynamique utilisé pour l'étude transcriptomique. ....	32
Figure 7 : Evaluation de la profondeur de séquençage de l'analyse transcriptomique.....	40
Figure 8 : Impact de l'exposition au H <sub>2</sub> sur le transcriptome des spores de <i>S. avermitilis</i> . ....	45
Figure 9 : Expression de l'opéron de l'HHA de <i>S. avermitilis</i> . ....	46
Figure 10 : Sélection de gènes codant pour la réponse au stress, l'export de protéines, un sidérophore, et les gènes liés aux antibiotiques (production et défense), dont l'expression est significativement différente en présence d'une faible vs une haute concentration d'H <sub>2</sub> . ....	47
Figure 11 : Expression altérée des voies métaboliques énergétiques et glucidiques dans les spores de <i>S. avermitilis</i> en réponse à la condition eH <sub>2</sub> . ....	52
Figure 12 : Schématisation des différentes étapes du protocole de mutation des gènes <i>hhySL</i> chez <i>S. avermitilis</i> ..	63
Figure 13 : Confirmation par PCR des constructions cPCΔ1 (A) et cPCΔ2 (B), et de la double recombinaison dans <i>S. avermitilis</i> Δ <i>hhySL</i> (C).....	65
Figure 14 : Photographie d'une culture confluyente sur MS-agar de <i>S. avermitilis</i> et muté pour <i>hhySL</i> .....	66
Figure 15 : Impact de l'inactivation de l'HHA sur le phénotype de <i>S. avermitilis</i> . ....	67

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,4 DNP .....	2,4-Dinitrophénol
ABC (transporteur) .....	<i>ATP Binding Cassette</i>
ADP/ATP .....	Adénosine Diphosphate / Triphosphate
aH <sub>2</sub> .....	H <sub>2</sub> à concentration atmosphérique (0,53 ppmv)
Amp .....	Ampiciline
Apra .....	Apramycine
Cam .....	Chloramphénicol
Carb .....	Carbéniciline
CCCP .....	Carbonyle cyanide m-chlorophénylhydrazone
DO .....	Densité optique
eH <sub>2</sub> .....	H <sub>2</sub> à concentration élevée (500 ppmv)
EMP .....	Voie d'Embden-Meyerhoff-Parnass
FADH .....	Flavine Adénine Dinucléotide
FLH-1 .....	Formate Hydrogenlyase Complexe 1
HHA .....	Hydrogénase à haute affinité
Hmd .....	<i>H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase</i>
HO(C) .....	Hydrogénase oxydatrice (cytoplasmique)
HR .....	Hydrogénase régulatrice (groupe 2b)
Kan .....	Kanamycine
Kgd .....	$\alpha$ -cétoglutarate décarboxylase
Kgor .....	$\alpha$ -cétoglutarate oxydoréductase
KO .....	<i>Kegg Orthology</i>
LB .....	Milieu de culture Lysogeny broth
MBH .....	Hydrogénase liée à la membrane
NADH .....	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ORF .....	Cadre ouvert de lecture ( <i>Open Reading Frame</i> )
PCR .....	Réaction de polymérisation en chaîne
ppm/b(v) .....	Parties par million / milliard (en volume)
SOB .....	Milieu de culture « <i>Super Optimal Broth</i> »
SOC .....	Milieu de culture « <i>Super Optimal Broth</i> » avec répression Catabolique
Ssd .....	Semialdéhyde succinique déshydrogénase
Str .....	Streptomycine
TAT .....	<i>Twin Arginine Transporter</i>
TCA .....	Cycle des acides tricarboxyliques (ou cycle de Krebs)
TSB .....	Milieu de culture <i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC .....	Unités formatrices de colonies (anglais : CFU)
WT (souche) .....	sauvage (souche)



# I. REVUE LITTÉRAIRE

## 1. Différents métabolismes connus du monde vivant

Selon la NASA, « est vivant tout système chimique auto-entretenu capable d'évolution Darwinienne » (Benner, 2010). Ceci indique que pour s'auto-entretenir, chaque être vivant doit posséder un métabolisme, soit la capacité d'utiliser l'énergie lumineuse (phototrophe) ou l'énergie chimique libérée par l'oxydation de molécules simples ou complexes (chimiotrophe), dans le but d'en synthétiser de nouvelles d'une complexité supérieure (anabolisme) ou produire une source d'énergie utilisable par la cellule, le plus souvent sous forme d'ATP (catabolisme). Les organismes vivants peuvent être discriminés en fonction de leur rôle trophique : les producteurs primaires (autotrophes) utilisant la photosynthèse ou des molécules inorganiques, ou les consommateurs de molécules organiques (hétérotrophes). Autotrophes comme hétérotrophes possèdent la capacité d'utiliser les molécules organiques dans les voies métaboliques. La différence vient de l'origine de ces molécules organiques, produites par l'organisme lui-même dans le cas des autotrophes, ou bien importées de l'environnement extérieur pour les hétérotrophes. Ce modèle binaire fut remis en question par la découverte d'organismes capables de combiner ces deux formes de métabolismes, amenant dès lors le concept de mixotrophie, rendant plus complexe la compréhension de la compétition pour les ressources énergétiques, et donc les relations inter-espèces (Gottschal & Kuenen, 1980, Matin, 1978) (Tableau 1).

Tableau 1 : Différentes formes de mixotrophies possibles dans le monde vivant.

		Hétérotrophie		
		Obligatoire	Facultative	Inexistante
Autotrophie (photo- ou chimiotrophie)	Obligatoire	mixotrophie obligatoire	mixotrophie facultative	autotrophie
	Facultative	mixotrophie facultative	« vraie » mixotrophie	
	Inexistante	hétérotrophie		

De plus, il existe plusieurs formes de mixotrophies, selon que l'hétérotrophie et l'autotrophie de l'organisme soient obligatoires ou facultatives. Par exemple, le dinoflagellé *Fragilidium subglobosum* est capable de croître en autotrophie stricte via la photosynthèse, de façon

strictement hétérotrophe en phagocytant des bactéries, ou bien suivant un mode mixotrophique en combinant ces deux métabolismes (Alf *et al.*, 2000). Même si sa vitesse maximale de croissance est atteinte lors de la mixotrophie, celle-ci n'est pas égale à la somme des vitesses des croissances hétéro- et autotrophique, la prédation des bactéries ayant tendance à inhiber la photosynthèse en raison de la turbidité. Ces deux métabolismes se complètent plus qu'ils s'additionnent, permettant un apport journalier maximal constant en C et N, indépendant du métabolisme utilisé. On retrouve aussi cette capacité à être autotrophe, ou hétérotrophe, ou les deux, chez les bactéries, avec par exemple *Thiobacillus acidophilus*, capable de croître en présence de glucose (hétérotrophie), de tétrathionate ( $S_4O_6^{2-}$ ) (autotrophie), ou en combinant ces deux nutriments, tirant de l'énergie en oxydant le glucose et le tétrathionate, et du carbone via le glucose et le  $CO_2$ , la combinaison accélérant la croissance (Barros *et al.*, 1984). D'autres espèces au contraire sont considérées comme mixotrophes obligatoires. C'est le cas de certaines archées marines oxydant l'ammoniac : celles-ci sont généralement autotrophes, utilisant l'ammoniac comme source d'énergie et le  $CO_2$  comme source de carbone. Néanmoins, certaines espèces se sont montrées incapables de croître sans la présence d'une source de carbone organique, ce qui ferait d'elles des mixotrophes obligatoires (Qin *et al.*, 2014). De même, le dinoflagellé marin *Polykrikos lebourae* combine obligatoirement photosynthèse et prédation de cryptophytes pour sa croissance (Kim *et al.*, 2015). Finalement, les bactéries autotrophes facultatives ou hétérotrophes facultatives sont les cas les plus répertoriés, incluant *Escherichia coli*, hétérotrophe obligatoire, qui recycle l' $H_2$  issu de la fermentation (Sawers *et al.*, 1985), ou encore *Methanosarcina barkeri*, autotrophe pouvant, en l'absence de  $CO_2$ , oxyder le CO seul mais capable de croître en couplant l'utilisation du CO et du méthanol (O'Brien *et al.*, 1984), même si ses substrats préférentiels restent le méthanol, le  $CO_2$  et l'acétate (dans cet ordre).

### 1.1. La mixotrophie chez les bactéries

La mixotrophie confère aux microorganismes une versatilité métabolique favorisant leur persistance ainsi que leur colonisation de nouvelles niches écologiques. Kuenen et Gottschal (1982) ont présenté un exemple intéressant avec les bactéries *Thiobacillus neapolitanus*, bactérie chimolithotrophe obligatoire utilisant le thiosulfate et le  $CO_2$ , *Spirillum* sp. G7, hétérotrophe obligatoire métabolisant l'acétate, et *Thiobacillus versutus*, mixotrophe capable de métaboliser ces deux sources d'énergie (Kuenen & Gottschal, 1982). Lors d'une co-culture de ces trois bactéries en présence de seulement une de ces deux sources d'énergie de façon non-

limitante (thiosulfate ou acétate), la bactérie spécialiste avait la vitesse de croissance la plus rapide, car plus performante dans le métabolisme de son substrat (*T. neapolinatus* ou *Spirillum* sp. G7 respectivement). Par contre, en présence des deux substrats en concentrations équivalentes ou non-limitantes, la bactérie versatile mixotrophe *T. versutus* surpassait les deux autres en termes de croissance, jusqu'à épuisement des deux substrats. Différentes expériences avec alternance des substrats ou des variations dans leurs concentrations relatives ont mené à déterminer les règles suivantes quant à la compétition pour un ou des substrats entre des bactéries spécialistes ou versatiles dans leur métabolisme, dans un milieu ne contenant au maximum qu'un seul substrat par espèce :

1. L'organisme spécialiste est favorisé lorsque seul son substrat est présent,
2. Lorsque les substrats sont mélangés mais la concentration de l'un excède largement celle du second, la bactérie spécialisée dans le substrat le plus concentré est favorisée,
3. Lors de l'alternance des substrats, les bactéries spécialistes vont être favorisées car les bactéries mixotrophes répriment fortement l'expression des enzymes métabolisant le substrat manquant, au contraire des bactéries spécialistes qui expriment ces enzymes de façon continue même en l'absence du substrat, et donc plus réactives lors de sa biodisponibilité,
4. Lorsque les substrats sont mélangés de manière non-limitante, ou limitante mais de même ordre de concentration, l'organisme versatile est favorisé, même si la coexistence de toutes les bactéries est possible, dépendamment de la proportion des sources d'énergie organiques et inorganiques.

Les individus mixotrophes peuvent donc utiliser plus de ressources que les simples hétéro- ou autotrophes et leur métabolisme peut balancer d'une forme à l'autre dépendamment des ressources du milieu ou bien les combiner, modifiant et complexifiant dès lors la compétition inter-espèces envers les ressources nutritives, en particulier dans des milieux complexes où plusieurs sources de nutriments organiques et inorganiques se superposent. Ceci est particulièrement vrai pour les bactéries aquatiques et lithiques qui vivent des épisodes de festin et famine (surtout de famine), où durant un court laps de temps, de grandes biodisponibilités de nutriments sous forme de carbone organique, alternent avec de longues périodes où seul du carbone réfractaire au métabolisme est disponible (Kjelleberg, 1998). Pour mieux s'adapter à ces variations extrêmes d'un point de vue métabolique, certaines bactéries ont opté pour la dormance ou la sporulation comme stratégie, dans lesquelles le métabolisme est réduit au strict

minimum en l'attente d'un retour d'une quantité de nutriments suffisants pour la croissance. Néanmoins, la majorité des espèces bactériennes a évolué dans la voie de la mixotrophie (Gottschal & Kuenen, 1980, Peters *et al.*, 1998, Rittenberg & Goodman, 1969), leur permettant d'utiliser de plus nombreuses sources d'énergie et de s'adapter plus facilement aux variations nutritionnelles. Ces stratégies, loin d'être opposées, peuvent être complémentaires, les bactéries mixotrophes pouvant sporuler ou rentrer en dormance lorsque l'addition de ces énergies n'est plus suffisante pour soutenir la croissance.

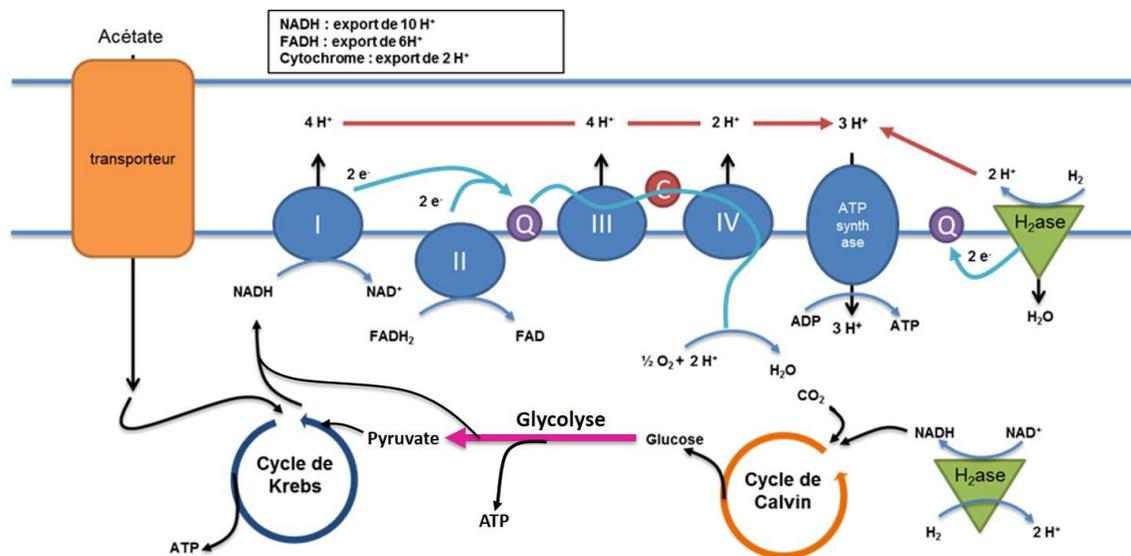
## **1.2. Mécanismes de la mixotrophie :**

La mixotrophie consiste à utiliser nutriments organiques et inorganiques soit simultanément, soit en les combinant, dans le but de soutenir l'apport en énergie et en carbone à la cellule. Lors d'une utilisation simultanée, les deux métabolismes utilisent des voies différentes, leurs composés n'interagissant pas entre eux. Dans ce cas, la vitesse de croissance maximale égale les vitesses cumulées des deux métabolismes. Chez *Ralstonia eutropha* par exemple, la vitesse de croissance en mixotrophie utilisant simultanément le lactate et l'H<sub>2</sub> mène à une vitesse de croissance de 0,33 h<sup>-1</sup>. Bien que cette vitesse soit inférieure à l'addition des vitesses de croissance en hétérotrophie (0,31 h<sup>-1</sup>) et en autotrophie (0,17 h<sup>-1</sup>), le plus haut rendement de production de biomasse est observé en mixotrophie (Rittenberg & Goodman, 1969). Au contraire, il arrive que la vitesse de croissance en mixotrophie soit supérieure aux vitesses cumulées des deux autres métabolismes, ce qui démontre que les métabolismes chémoorganotrophe et chimolithotrophe peuvent agir en synergie (Pronk *et al.*, 1990).

## **1.3. Les bactéries mixotrophes oxydant l'H<sub>2</sub>**

Puisque l'H<sub>2</sub> est ubiquitaire et représente la molécule la plus énergétique par unité de masse, ce gaz est au centre de la mixotrophie chez une grande variété de microorganismes occupant des niches écologiques aérobies et anaérobies. Par exemple, *R. eutropha* (aérobie) et *Acetobacterium woodii* (anaérobie) cumulent l'utilisation du lactate et de l'H<sub>2</sub> pour la croissance lorsque les deux sont disponibles (Fig. 1) (Peters *et al.*, 1998, Rittenberg & Goodman, 1969). Cette mixotrophie disparaissant au profit d'une hétérotrophie stricte en présence de glucose, elle est donc facultative et dépendante de la nature et la biodisponibilité des substrats disponibles. Chez *R. eutropha* par exemple, l'activation de la voie d'oxydation de l'H<sub>2</sub> est entre autre déterminée par la disponibilité des sources d'énergie dans le milieu via un contrôle transcriptionnel impliquant un facteur  $\sigma_{54}$  ainsi que l'activateur HoxA (Schwartz *et al.*, 1999,

Schwartz *et al.*, 1998). Un autre mécanisme décisionnel est basé sur la détection d'H<sub>2</sub> dans le milieu par la bactérie, mécanisme qui sera décrit plus bas (voir section hydrogénases). Généralement, l'oxydation de l'H<sub>2</sub> conduit au transfert d'électrons au *pool* de quinones membranaires, des transporteurs d'électrons liposolubles faisant partie de la chaîne respiratoire acheminant les électrons à travers une suite de cytochromes jusqu'à une oxydase terminale, générant ainsi des protons dans l'espace périplasmique (Lamichhane-Khadka *et al.*, 2010, Richardson, 2000).



**Figure 1 : Schématisation succincte de la respiration bactérienne aérobie chez *R. eutropha*.**

On note une hydrogénase cytoplasmique recyclant les équivalents réducteurs et une hydrogénase membranaire régénérant le *pool* de quinone et créant un gradient de protons entre le cytoplasme et l'espace périplasmique. Les hydrogénases 2b (régulatrice) et 5 (fonction inconnue) ne sont pas représentées car ne participant pas directement au métabolisme énergétique. figure adaptée de Cramm (Cramm, 2009)

La chaîne respiratoire permet la production d'énergie via le transfert d'électrons vers un accepteur final d'électron, soit le dioxygène en aérobie. En anaérobie, des molécules moins oxydantes comme le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), le nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), le soufre (S), ou le fumarate, sont utilisées comme accepteur d'électron terminal alternatif à l'O<sub>2</sub>. Ce transfert d'électrons se fait grâce aux enzymes de la chaîne respiratoire qui, en oxydant des accepteurs d'électrons au faible potentiel redox comme le NAD<sup>+</sup>/NADH ou la FAD<sup>+</sup>/FADH, vont exporter des protons dans le périplasm, créant ainsi un gradient de protons entre le cytoplasme et le périplasm. Ce gradient de protons constitue une force protomotrice aboutissant à la synthèse de l'ATP via la phosphorylation de l'ADP lors du passage des H<sup>+</sup> à travers l'ATP synthase. Les équivalents réducteurs (e.g. NADH) étant générés lors du métabolisme central du carbone, ceux-ci font le pont entre l'assimilation du carbone organique et la production d'énergie. L'oxydation de l'H<sub>2</sub> n'est pas exclusivement

utilisée pour alimenter la chaîne respiratoire en électrons, l'oxydation cytoplasmique de l'H<sub>2</sub> permettant le recyclage de divers coenzymes ou cofacteurs impliqués dans le métabolisme central. Chez *R. eutropha* par exemple, la réduction du NAD(P)<sup>+</sup> apporte les équivalents réducteurs nécessaires à la fixation du CO<sub>2</sub> dans le cycle de Calvin pour la synthèse du glucose (Fig. 1). De même, chez la bactérie anaérobie *Ignavibacterium album*, la régénération du NADH pourrait permettre l'utilisation du cycle de Krebs dans le sens de l'anabolisme (Liu *et al.*, 2012b).

## 2. L'oxydation enzymatique de l'H<sub>2</sub>

### 2.1. Les hydrogénases

D'un point de vue chimique, l'oxydation de l'H<sub>2</sub> n'est pas énergétiquement favorable en raison de l'acidité très faible de la liaison entre les atomes d'hydrogène (pKa = 35). Cette réaction est cependant possible lors de la liaison de la molécule d'H<sub>2</sub> avec un centre métallique formé de nickel et/ou de fer, catalyseur réduisant le pKa de 20 à 30 unités (Montet *et al.*, 1998). Cette réaction a lieu au cœur des hydrogénases, métalloenzymes catalysant l'interconversion de l'H<sub>2</sub> en électrons et en protons :  $H_2 \leftrightarrow 2 H^+ + 2 e^-$ . Cette capacité à oxyder l'H<sub>2</sub> se retrouve dans toutes les divisions de façon ubiquitaire, quel que soit le type trophique de la bactérie. Elle permet effectivement à la fois de générer de l'énergie ou bien de se débarrasser de surplus d'équivalents réducteurs, selon la direction de la réaction : oxydation ou production d'H<sub>2</sub>, respectivement. Les hydrogénases ont été découvertes à travers trois approches différentes. Tout d'abord de façon biochimique à travers l'analyse de leur activité catalytique, en suivant la variation de concentration en H<sub>2</sub> d'un microenvironnement enrichi en H<sub>2</sub> et contenant des hydrogénases. Ensuite par génie génétique via des mutations de délétion des gènes codant pour les composantes structurales ou accessoires d'hydrogénases hypothétiques, amenant une perte de l'activité catalytique. Finalement, certaines hydrogénases ont été caractérisées par cristallographie, révélant la structure et le fonctionnement du site actif, variant en fonction des différentes classes d'hydrogénases identifiées à ce jour (Ogata *et al.*, 2010, Volbeda *et al.*, 1995). L'étude biochimique et génétique des hydrogénases a démontré que celles-ci possèdent une structure polypeptidique et une composition métallique de leur site actif différentes entre elles malgré une activité similaire, dénotant une évolution convergente (Vignais & Billoud, 2007). Ces enzymes sont donc séparées en 3 classes et facilement discriminées en fonction de la composition métallique de leur site actif, soit les hydrogénases [NiFe], [FeFe] et [Fe] (aussi nommées Hmd). Des analyses phylogénétiques ont aussi révélé un grand nombre d'évolutions horizontales et verticales : les hydrogénases étant des enzymes modulaires, ceci facilite

l'échange des gènes structuraux et accessoires des hydrogénases d'une même classe entre les micro-organismes sans aboutir à une impasse dans l'évolution (Vignais & Billoud, 2007). Dû à des appareils de maturation en *cis*- et *trans*- différents selon les groupes d'hydrogénases, l'expression hétérologue de ces dernières ne peut se faire sans transférer en même temps un nombre minimal de sous-unités et de gènes codant pour les protéines accessoires liées à la maturation de l'enzyme, en particulier la protéase impliquée dans la dernière étape de maturation (Sun *et al.*, 2010) (voir Encadré 1). Bien que cette thèse porte sur l'étude de l'oxydation de l'H<sub>2</sub> en aérobiose, les hydrogénases [Fe] et [FeFe] sensibles à l'O<sub>2</sub> seront brièvement présentées, suivi d'une description plus détaillée des hydrogénases [NiFe] se retrouvant chez des microorganismes aérobies et anaérobies.

#### **Encadré 1 : Biosynthèse et maturation des hydrogénases [NiFe] :**

La biosynthèse des hydrogénases [NiFe] est issue d'une part de la liaison non-covalente des sous-unités structurales notées S (*Small*) et L (*Large*), et de leur maturation grâce à des protéines accessoires spécifiées par un groupe de gènes minimal : *hypA*, *hypB*, *hypC*, *hypD*, *hypE*, et *hypF*, ainsi qu'un gène codant pour une endopeptidase (*hypD*). Leur fonction est de synthétiser le site actif métallique comportant le Ni et le Fe ainsi que leurs ligands, soient le CO et le CN<sup>-</sup>, puis insérer ce cofacteur métallique au bon endroit dans la grande sous-unité (Lenz *et al.*, 2010, Vignais & Billoud, 2007). En premier, HypC agirait comme chaperonne pour permettre aux autres protéines accessoires d'intégrer le cofacteur métallique. Ensuite HypF et HypE insèrent 3 liaisons diatomiques, 2 CO et 1 CN<sup>-</sup>. L'insertion de l'atome de fer se produit à ce moment précis. HypA et HypB apportent l'atome de nickel et le lient en présence de GTP (Casalot & Rousset, 2001). Finalement, l'endopéptidase va opérer un clivage de la région C-terminale de la grande sous-unité, en se liant à l'atome de nickel. La protéine HypX, présente chez certaines espèces, n'est pas nécessaire pour la bonne maturation mais semblerait procurer une tolérance accrue à l'O<sub>2</sub> via son apport d'une liaison cyanure supplémentaire au site actif (Bleijlevens *et al.*, 2004), même si cette conclusion est remise en cause depuis peu, laissant le rôle de HypX incertain (Horch *et al.*, 2010).

## **2.2. Les hydrogénases [Fe] et [FeFe]**

Les hydrogénases [Fe], ou Hmd, sont spécialisées dans la méthanogénèse hydrogénéotrophique. Les archées méthanogènes hydrogénéotrophiques utilisent l'H<sub>2</sub> comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone pour produire de la biomasse et du CH<sub>4</sub>. Le site actif de l'hydrogénase [Fe], dimérique, est constitué d'un atome de fer sur chaque

monomère, et nécessite un cofacteur ferreux. L'hydrogénase intervient dans la réduction du  $\text{CO}_2$  en méthane chez les archées méthanogènes via la réaction  $\text{H}_2 + 5,10\text{-méthényltétrahydropyriméthanoptérine (H4MPT)} \Rightarrow \text{H}^+ + 5,10\text{-méthylènetétrahydropyriméthanoptérine}$ . Chez les méthanogènes, le H4MPT agit comme porteur du carbone du  $\text{CO}_2$  qui entre dans une série de réactions de réduction menant à la production de  $\text{CH}_4$ . Dans cette chaîne métabolique, l'enzyme se charge de fournir les équivalents réducteurs nécessaires à ces réactions. L'atome de fer n'est pas actif d'un point de vue redox, l'enzyme ne peut donc pas catalyser la réaction réversible  $\text{H}_2 \leftrightarrow 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$  (Shima & Thauer, 2007) et l'enzyme est irréversiblement désactivée en présence d'oxygène (Lyon *et al.*, 2004).

Les hydrogénases [FeFe] se retrouvent chez des organismes anaérobies, telles que les bactéries acétogènes et les bactéries réductrices des sulfates. Le cœur de l'enzyme est formé d'un centre [FeFe] lié à un groupe [4Fe-4S] par un pont cystéine (Nicolet *et al.*, 2002). Un canal hydrophobe conduit les molécules d' $\text{H}_2$  jusqu'au site actif, même si ces dernières peuvent, par diffusion, l'atteindre par d'autres voies. Ces hydrogénases sont inactivées de manière irréversible en présence d' $\text{O}_2$ . La fonction principale de la plupart des hydrogénases [FeFe] est la production d' $\text{H}_2$ , et les différents homologues faisant partie de ce groupe peuvent avoir évolué pour interagir différemment avec le métabolisme cellulaire. Les plus connus des microorganismes possédant l'hydrogénase [FeFe] sont les *Clostridia*. Ce sont des bactéries anaérobies strictes utilisant principalement la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (FOR) pour convertir le pyruvate en acétyl-CoA et en  $\text{CO}_2$ , impliquant la production de ferrédoxine réduite. La ferrédoxine réduite transfère ses électrons à l'hydrogénase [FeFe], menant à une production d' $\text{H}_2$ .

### **2.3. Les hydrogénases [NiFe]**

Contrairement aux groupes précédents, les hydrogénases de type [NiFe] sont généralement tolérantes à l' $\text{O}_2$  et sont donc les plus étudiées en raison de leur potentiel biotechnologique. L'enzyme est composée de deux sous-unités, une grande ( $\alpha$ ) et une petite ( $\beta$ ) (environ 60 et 30 kDa, respectivement). Un atome de fer et un de nickel sur la sous-unité  $\alpha$  forment le site actif de l'enzyme, l'interaction des deux sous-unités formant un hétérodimère globulaire. Des analyses structurales ont révélé que le site actif est implanté profondément dans la grande sous-unité  $\alpha$ , relié par 4 ponts cystéine, et, liés au fer, 3 ligands non protéiques : 1 CO et 2  $\text{CN}^-$ . Ces hydrogénases sont résistantes à l' $\text{O}_2$  grâce à la présence de résidus cystéine de part et d'autre du centre fer-soufre [FeS] proximal, permettant un transfert d'électrons plus rapide vers le site

actif lors d'une attaque par l' $O_2$  (Lukey *et al.*, 2011). Dans la petite sous-unité  $\beta$ , à proximité du site actif, se trouvent trois [FeS] servant au passage des électrons depuis le site actif vers le transporteur physiologique d'électrons (Volbeda *et al.*, 1995). Le [FeS] proximal au cœur métallique est essentiel à l'activation du site actif de l'enzyme. Contrairement aux hydrogénases [FeFe] qui produisent du  $H_2$ , les hydrogénases [NiFe] sont plus souvent impliquées dans l'oxydation du  $H_2$  *in vivo*. Parmi les hydrogénases appartenant à la classe [NiFe], cinq principaux grands groupes sont décrits dans la littérature, se distinguant par leur fonction physiologique ainsi que leur classification phylogénétique (Tableau 2). La séquence en acides aminés de la grande sous-unité des hydrogénases comporte deux régions très conservées, entourant les deux paires de cystéines accommodant le site actif. Ces régions conservées servent de signatures propres aux différents groupes décrits ci-dessous (Greening *et al.*, 2015a).

**Tableau 2 : Classification, rôle physiologique, accepteur physiologique d'électron, localisation et exemple de bactérie modèle pour les cinq groupes d'hydrogénase [NiFe] connus.**

Groupe	Fonction	Accepteur d'électrons	Localisation	Organisme modèle
1	Régénération du pool de quinones, couplée à la réduction du CO <sub>2</sub> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , fumarate, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et du fer	Cytochromes	Périplasma	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> (Deckers <i>et al.</i> , 1990)
2a	Génère des équivalents réducteurs pour la fixation du CO <sub>2</sub> / Production d'H <sub>2</sub> en absence de lumière et d'O <sub>2</sub>	Cytochrome b	Périplasma / Cytoplasme	<i>Aquifex aeolicus</i> (Brugna-Guiral <i>et al.</i> , 2003)
2b	Senseur d'H <sub>2</sub> , active l'expression d'autres hydrogénases	Histidine kinases	Cytoplasme	<i>Ralstonia eutropha</i> H16 (Kleihues <i>et al.</i> , 2000)
3a	Réduction du cofacteur F <sub>420</sub> impliqué dans la méthanogénèse et autres réactions anaboliques	Cofacteur F <sub>420</sub>	Cytoplasme	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> (Vitt <i>et al.</i> , 2014)
3b	Oxydation du NAD(P)H via la production d'H <sub>2</sub> S	NAD(P) <sup>+</sup> / NAD(P)H	Cytoplasme	<i>Pyrococcus furiosus</i> (Bryant & Adams, 1989)
3c	Réduction du coenzyme CoM-S-S-CoB et de la ferrédoxine pour la synthèse du pyruvate	Protéine MvhD	Cytoplasme	<i>Methanosarcina marburgensis</i> (Stojanowic <i>et al.</i> , 2003)
3d	Bidirectionnelles : maintien de l'équilibre redox NAD(P) <sup>+</sup> / NAD(P)H	NAD(P) <sup>+</sup> / NAD(P)H	Cytoplasme	<i>Ralstonia eutropha</i> H16 (Burgdorf <i>et al.</i> , 2005)
4	Dissipation des équivalents réducteurs via la réduction des H <sup>+</sup> / Production d'H <sub>2</sub>	Formate, CO, Fe <sup>3+</sup>	Périplasma ou cytoplasme	<i>E. coli</i> / <i>Methanosarcina barkeri</i> (Meuer <i>et al.</i> , 1999)
5	<b>Inconnue.</b> Oxyde l'H <sub>2</sub> atmosphérique.	Inconnu	Cytoplasme ? Périplasma ?	<i>Streptomyces avermitilis</i> (Constant <i>et al.</i> , 2008) <i>Mycobacterium smegmatis</i> (Berney & Cook, 2010)

Les hydrogénases du groupe 1 sont liées à la membrane plasmique et font partie de la chaîne respiratoire des bactéries, générant des électrons servant à la réduction d'accepteurs terminaux d'électrons tels que les  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , le fumarate, le  $\text{CO}_2$  (anaérobie), ou l' $\text{O}_2$  (aérobie). Lorsqu'elles sont liées à des composés oxydoréducteurs dont le potentiel est plus élevé que celui du couple  $\text{H}_2/\text{H}^+$ , ces enzymes catalysent l'oxydation de l' $\text{H}_2$ . Dans certains cas, la petite sous-unité possède un [FeS] proximal atypique [4Fe-3S] qui amène une plus grande tolérance à l' $\text{O}_2$ . Cette résistance accrue à l' $\text{O}_2$  serait due à une plus grande plasticité de l'enzyme, d'un point de vue redox, amenée par le surplus de cystéines (6 résidus conservés au lieu de 4) du [FeS] proximal (Pandelia *et al.*, 2012), comme par exemple les Cys19 et Cys120 de l'hydrogénase Hyd1 chez *E. coli* (Fritsch *et al.*, 2011, Lukey *et al.*, 2011).

Le groupe 2 est composé de deux sous types : le sous-groupe 2a, comprenant les hydrogénases oxydatives cytoplasmiques, et le 2b, regroupant les hydrogénases senseurs, servant à contrôler la cascade de régulation de la biosynthèse des hydrogénases oxydatives selon la concentration d' $\text{H}_2$  dans le milieu. On retrouve les hydrogénases 2a oxydatives chez les cyanobactéries, couplées à une nitrogénase inductible en présence de conditions favorables de fixation du  $\text{N}_2$ , où elles recyclent le  $\text{H}_2$  produit par la nitrogénase pour produire de l'énergie. Les hydrogénases [NiFe] 2a sont également impliquées dans la fixation du  $\text{CO}_2$  chez *Aquifex aeolicus* (Guiral *et al.*, 2005). Par ailleurs, les hydrogénases senseurs appartenant au sous-groupe 2b ont été principalement étudiées chez *R. eutropha*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Thiocapsa roseopersicina*, et *Rhodospseudomonas palustris* (Kovács *et al.*, 2005, Lenz & Friedrich, 1998). Leur fonction de senseur à  $\text{H}_2$  permet d'activer la biosynthèse d'hydrogénases oxydatives en présence d'une concentration minimale d' $\text{H}_2$  dans le milieu (Buhrke *et al.*, 2004, Elsen *et al.*, 2003, Lenz *et al.*, 2010). Chez *R. eutropha*, l'hydrogénase senseur sous forme dimérique ( $\text{HoxBC}_2$ ) est couplée à une histidine kinase (HoxJ) phosphorylant un régulateur transcriptionnel (HoxA) (Buhrke *et al.*, 2004). Ces hydrogénases 2b sont à l'état soluble dans le cytoplasme et sont insensibles à l' $\text{O}_2$ , propriété conférée par un canal moléculaire permettant le passage de l' $\text{H}_2$  jusqu'au site actif de l'enzyme, mais trop étroit pour laisser passer l' $\text{O}_2$ .

Les enzymes appartenant aux groupes 3a, b, c et d se retrouvent principalement chez les archées, même si on en observe aussi chez les bactéries et cyanobactéries. On les retrouve couplées à des sous-unités liant des cofacteurs solubles tels que le  $\text{NAD}^+$ , le  $\text{NADP}^+$  (impliqués dans la fixation du  $\text{CO}_2$ ) ou le cofacteur 420, coenzyme flavinique intervenant principalement

dans les réactions d'oxydo-réduction chez les archées méthanogènes (Deppenmeier, 2002 ). Les réactions catalysées par ces enzymes sont bidirectionnelles, les enzymes pouvant oxyder les cofacteurs réduits, en conditions anaérobies.

Le quatrième est composé d'enzymes multimériques d'au moins 6 sous-unités. Leur fonction consiste en la réduction de protons afin d'éliminer l'excès d'équivalents réducteurs produits par la fermentation de composés organiques en anaérobie, tels que le formate, ou le monoxyde de carbone. Chez *E. coli*, l'hydrogénase 4 fait partie du complexe Formate Hydrogenlyase 1 (FLH-1) qui lie l'oxydation du formate ( $\text{HCOO}^-$ ) en  $\text{H}_2$  et  $\text{CO}_2$  via la réaction  $\text{HCOO}^- \Leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}^+$  puis  $2\text{H}^+ \Leftrightarrow \text{H}_2$  (Sawers, 2005). Deux différentes hydrogénases membranaires du groupe 4 sont présentes chez les archées méthanogènes. Une première (*Energy converting hydrogenase*, ou Ech) est nécessaire pour la méthanogénèse acétoclastique avec cytochrome, telle que retrouvée chez *Methanosarcina barkeri*. Ce premier type est une hydrogénase catalysant la réduction  $\text{H}_2$ -dépendante de la ferrédoxine couplée à la translocation de protons, conduisant à la formation d'un gradient de protons à travers la membrane cytoplasmique pour la production d'ATP (Welte *et al.*, 2010). Le second type d'hydrogénase du groupe 4 se retrouve chez les méthanogènes sans cytochrome (Thauer *et al.*, 2008). Ces archées catalysent l'oxydation de l' $\text{H}_2$  couplée à l'importation d'un ion sodium alimentant une ATP synthase sodium-dépendante. Ces deux types d'hydrogénases ont en commun de fournir la ferrédoxine réduite pour la biosynthèse et la production d'énergie.

Tableau 3 : Km apparents d'organismes hydrogénovores à haute, intermédiaire et faible affinité parmi les bactéries du sol codant pour au moins une hydrogénase [NiFe]

Organisme	Km <sub>(app)</sub> (ppmv)	Groupes fonctionnels
<b>Hydrogénovores à haute affinité (Km<sub>(app)</sub> &lt; 100 ppmv)</b>		
<i>Streptomyces</i> sp. strain AP1	30	5
<i>Streptomyces avermitilis</i>	9	5
<i>Streptomyces</i> sp. strain PCB7	11	5
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	145	2a, 3b, 5
<i>Rhodococcus equi</i>	145	3b, 5
<b>Activité à haute affinité du sol</b>	2-10	
<b>Hydrogénovores à affinité intermédiaire (Km<sub>(app)</sub> entre 100 et 1000 ppmv)</b>		
<i>Streptomyces</i> sp. HP12 <sup>b</sup>	400	5
<i>Streptomyces</i> sp. HP9 <sup>b</sup>	400	5
<b>Hydrogénotrophes à faible affinité (Km<sub>(app)</sub> &gt; 1000 ppmv)</b>		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1200	1
<i>Desulfovibrio</i> sp. strain G11	1450	3a, 4
<i>Paracoccus denitrificans</i>	1565	1,4
<i>Ralstonia eutropha</i> <sup>a</sup>	4800	1, 2b, 3b, 5
<i>Methanospirillum hungatei</i>	6600	1, 2b
<b>Activité à faible affinité du sol</b>	1700	
<b>Enzymes individuelles</b>		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155 $\Delta$ hyd13	35	5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc(2)155 $\Delta$ hyd23	255	2a
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	1086	5

Tableau tiré de (Greening *et al.*, 2015a) et complété avec l'article de (Meredith *et al.*, 2014) pour les organismes à affinité intermédiaire. <sup>a</sup> : organisme possédant une hydrogénase [NiFe] du groupe 5 ayant une affinité faible. <sup>b</sup> : organisme possédant une hydrogénase [NiFe] du groupe 5 ayant une affinité intermédiaire.

Finalement, le cinquième et dernier groupe, découvert plus récemment et encore très peu connu (Constant *et al.*, 2011a, Constant *et al.*, 2010, Constant *et al.*, 2008) fait l'objet de cette thèse. Un premier caractère qui distingue ce groupe de tous ceux qui ont été décrits jusqu'à maintenant est l'affinité exceptionnellement haute que ces hydrogénases démontrent envers le H<sub>2</sub> (Tableaux 2 et 3). Contrairement aux autres hydrogénases connues, celles-ci peuvent posséder une affinité pouvant être assez élevée (Km < 100 ppmv) pour oxyder l'H<sub>2</sub> atmosphérique tout en étant résistante à l'attaque de son site actif par l'O<sub>2</sub>.

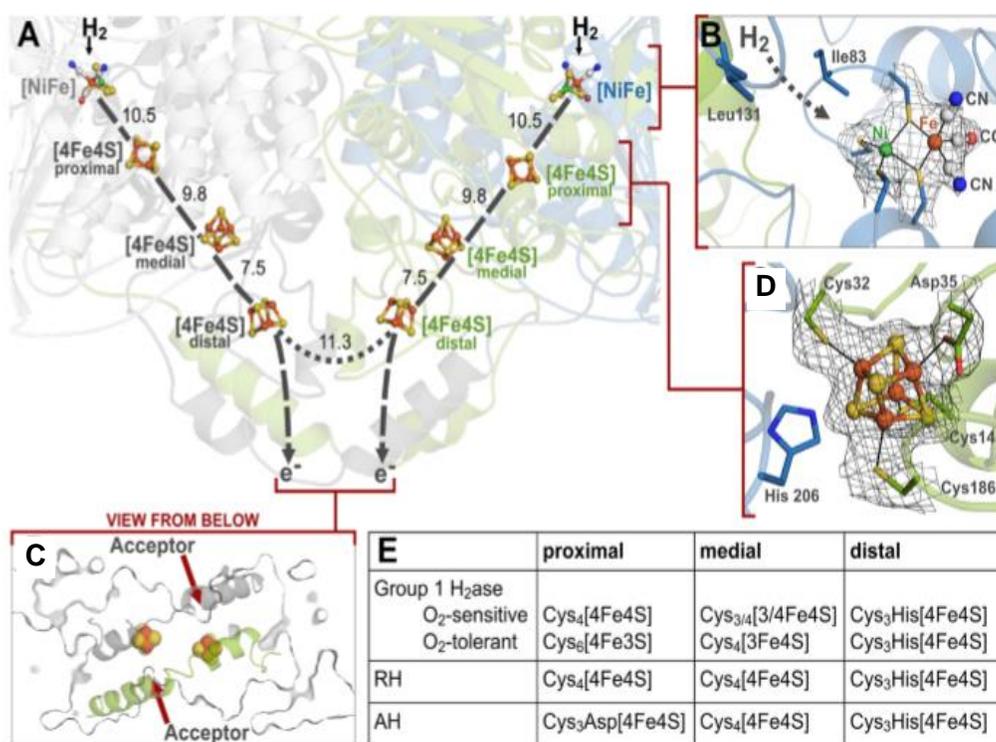
Dans certains *Streptomyces* oxydant l'H<sub>2</sub> à haute affinité ( $K_{m(\text{app})} < 100$  ppmv), on retrouve effectivement un groupe de gènes codant pour les sous-unités structurales et de maturation d'une hydrogénase hypothétique, mais dont les sous-unités structurales sont phylogénétiquement différentes des 4 autres groupes décrits précédemment. La distribution de cette hydrogénase est taxonomiquement indépendante. Par exemple, l'hydrogénase de *Streptomyces ghanaensis* est plus similaire à celle de *Frankia alvi* qu'à celle de *Streptomyces avermitilis*. Il est probable que l'acquisition des hydrogénases du groupe 5 soit le résultat de transferts géniques horizontaux, ce qui expliquerait la présence occasionnelle de plus fortes homologues entre les enzymes de deux taxons différents qu'entre deux enzymes d'un même taxon. Parmi ces bactéries, nombreuses sont celles connues pour avoir les sols comme niche écologique. Elles seraient responsables de l'activité hydrogénase permettant le recyclage de près de 80% de l'H<sub>2</sub> atmosphérique, activité autrefois attribuée à des enzymes abiotiques du sol (Conrad, 1996). La distribution de cette activité étant globale, ces bactéries pourraient se retrouver partout sur le globe plutôt que dans une niche écologique géographiquement restreinte (Ehhalt & Rohrer, 2009).

Des bactéries possédant des enzymes de ce groupe ont été étudiées par la suite. Tout d'abord *R. eutropha*, qui possède dans son génome une hydrogénase [NiFe] du groupe 5 : cette enzyme y est très peu exprimée en conditions standards de laboratoire et possède une faible affinité envers le H<sub>2</sub>, avec un  $K_m > 1000$  ppmv. Du fait de sa très faible expression, son rôle dans la bactérie est inconnu (Schäfer *et al.*, 2013). On retrouve aussi cette hydrogénase atypique chez *M. smegmatis*, qui possède trois hydrogénases [NiFe]. Celle du groupe 3b, servant à produire de l'H<sub>2</sub> en conditions anaérobies, n'est pas impliquée dans l'oxydation de l'H<sub>2</sub> atmosphérique. Par contre, l'hydrogénase du groupe 2a a un  $K_{m(\text{app})}$  de 230 ppmv, lui permettant tout juste de capter l'H<sub>2</sub> atmosphérique. Mais c'est surtout l'hydrogénase du groupe 5, avec un  $K_{m(\text{app})}$  de 65 ppmv, qui serait responsable de la majorité de l'oxydation de l'H<sub>2</sub> atmosphérique par cette bactérie. Cette oxydation à haute affinité a lieu durant la croissance, servant à la régénération de cofacteurs oxydés, mais aussi durant la phase stationnaire, où l'oxydation de l'H<sub>2</sub> servirait de source d'énergie. Le rôle physiologique des hydrogénases du groupe 5 a donc commencé à être étudié (Constant *et al.*, 2008, Greening *et al.*, 2014a, Schäfer *et al.*, 2013), mais il reste à être clarifié, de même que l'accepteur d'électron et le fonctionnement de la haute affinité restent encore à élucider.

Par ailleurs, la question de la résistance à l'O<sub>2</sub> a trouvé un début de réponse fin 2015 dans une étude de cristallographie de l'hydrogénase [NiFe] dimérique de type 5 chez *R. eutropha* H16

(Schäfer *et al.*, 2015): dans chaque monomère, les deux sous-unités structurales sont reliés par 4 groupes [4Fe4S], servant aussi de pont électronique depuis le [4Fe4S] proximal, proche du site actif de l'enzyme, jusqu'au [4Fe4S] distal, transmettant l'électron à son accepteur physiologique (Fig. 2A, B et C). La coordination du site [4Fe4S] proximal, habituellement menée par 4 résidus cystéine, implique ici trois résidus cystéine et un résidu aspartate (Fig. 2D) : c'est ce dernier, conservé dans toutes les hydrogénase [NiFe] du groupe 5, qui amène la résistance à l'O<sub>2</sub> à travers une modulation précise du potentiel redox du site actif (Fig. 2E). La présence d'un tunnel à H<sub>2</sub> formé par les deux résidus isoleucine 83 et leucine 131 a aussi été évoquée (Fig. 2B), une telle structure se retrouvant responsable de la résistance à l'O<sub>2</sub> chez les hydrogénases NiFe de type 2b (Lukey *et al.*, 2011). Néanmoins dans ce cas précis, cette structure soutient l'effet de l'aspartate mais n'est pas directement responsable de la résistance à l'oxydation du centre [NiFe] par l'O<sub>2</sub>.

**Figure 2 : Modèle de la structure de l'hydrogénase [NiFe] dimérique du groupe 5 chez *Ralstonia eutropha* H16 d'après une étude cristallographique.**



(A) Structure de la chaîne de transfert des électrons depuis le site actif jusqu'au groupement [4Fe-4S] distal. (B) Site actif [NiFe] de l'HHA incluant un canal réduisant partiellement l'accès au site actif par l'O<sub>2</sub>, formé par les deux résidus isoleucine 83 et leucine 131. (C) Architecture du groupement [4Fe-4S] proximal atypique coordonné par 3 résidus cystéine (32, 145, 186) et le résidu aspartate 35. (D) Site potentiel de liaison à l'accepteur physiologique d'électrons. (E) Comparaison des groupements [4Fe-4S] et les résidus impliqués dans leur coordination au sein des différentes hydrogénases de *R. eutropha* H16

### **3. Les microorganismes possédant dans leur génome des gènes codant pour des hydrogénases [NiFe]**

Le H<sub>2</sub>, bien qu'omniprésent, l'est à différentes concentrations selon le biotope étudié. Dans la troposphère, on le retrouve à l'état de traces, à un rapport de mélange de 0,53 ppmv, équivalent à une concentration de 40,7 nmole m<sup>-3</sup> à température et pression normales (Novelli *et al.*, 1999). Dans le sol, le H<sub>2</sub> est produit par certains microorganismes via la fermentation des composés organiques mais aussi par la fixation de l'azote puisque l'H<sub>2</sub> est un sous-produit de l'activité des nitrogénases, pouvant (Hunt & Layzell, 1993) atteindre les 20 000 ppmv. Comme le H<sub>2</sub> est une source d'énergie, il contribue à influencer la structure des communautés microbiennes. Ces communautés peuvent être divisées en deux groupes bien distincts que sont les bactéries aérobies et anaérobies. Bien que l'oxydation de l'H<sub>2</sub> atmosphérique soit évidemment aérobie, il est important de décrire les points communs comme les différences entre ces deux communautés pour bien appréhender les facteurs régissant la dynamique de juxtaposition de ces différentes espèces selon leur écosystème.

#### **3.1. L'oxydation de l'H<sub>2</sub> en anaérobie**

Comme vu précédemment, le centre [NiFe] des hydrogénase est sensible à l'oxydation par l'O<sub>2</sub>. Ceci explique que les hydrogénases soient fréquemment retrouvées dans les milieux anoxiques. Leur affinité envers l'H<sub>2</sub> les amène à se retrouver en juxtaposition avec d'autres organismes producteurs d'H<sub>2</sub> : les nodules racinaires (Hoch *et al.*, 1957), et les bactéries impliquées dans la fermentation (Conrad *et al.*, 1985). L'H<sub>2</sub> produit lors de la fermentation de la matière organique est consommé par une succession de microorganismes dont la juxtaposition est déterminée par la disponibilité d'accepteurs d'électrons alternatifs à l'O<sub>2</sub>. En anaérobiose stricte, les archées méthanogènes, telles que *Thermoanaerobacter tengcongensis* capturent l'H<sub>2</sub> à travers la réduction du CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> via une hydrogénase [NiFe] et un cofacteur de type ferrédoxine servant d'accepteur d'électron, et créant un gradient de protons dans l'espace périplasmique (Soboh *et al.*, 2004). En présence d'accepteurs d'électrons terminaux alternatifs au CO<sub>2</sub>, les méthanogènes sont supplantées par d'autres groupes de microorganismes fonctionnels bénéficiant d'un plus fort apport énergétique en oxydant l'H<sub>2</sub>, telles que les bactéries réductrices des sulfates (Robinson & Tiedje, 1984). Dans le sol, le genre *Desulfovibrio* est le plus étudié chez les bactéries réduisant le sulfate à travers l'exemple de *D. vulgaris* (Hildenborough), qui possède 6 hydrogénases différentes, dont quatre périplasmiques : une

[FeFe], une [NiFeSe] et deux [NiFe] (Brandis & Thauer, 1981). La juxtaposition est complétée par les bactéries réduisant le fer, le manganèse et les nitrates. À titre d'exemple, *Shewanella oneidensis*, couple l'oxydation de la matière organique et de l'H<sub>2</sub> à la réduction du fer, du manganèse, et divers métaux lourds (Shi *et al.*, 2011).

La juxtaposition de ces espèces va directement dépendre de l'énergie qu'elles peuvent obtenir de l'oxydation de l'H<sub>2</sub>. Par exemple, l'oxydation de l'H<sub>2</sub> avec le SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> apporte une énergie de 38 kJ mol<sup>-1</sup>H<sub>2</sub> tandis qu'avec le fumarate, l'énergie est de 86 kJ mol<sup>-1</sup>H<sub>2</sub> et avec le nitrate, 224 kJ mol<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>. De fait, une bactérie utilisant le SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> comme accepteur d'électrons nécessitera 10 fois plus d'H<sub>2</sub> qu'une bactérie utilisant le nitrate pour produire une même quantité d'énergie. La bactérie la plus efficace dans son rendement énergétique sera évidemment avantagée. Ainsi, la dynamique de la juxtaposition de ces espèces est principalement déterminée par la présence ou l'absence de ces différents accepteurs d'électrons terminaux, les bactéries utilisant l'accepteur d'électrons offrant le plus grand potentiel redox étant avantagées dans la compétition inter-espèces lorsque celui-ci est disponible. Ce modèle ne s'applique pas pour expliquer la juxtaposition des bactéries oxydant l'H<sub>2</sub> en aérobie, car le dioxygène amène un potentiel redox plus élevé que ceux des autres accepteurs d'électrons : 237 kJ mol<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>. Étant donné que l'oxydation de l'H<sub>2</sub> en présence d'O<sub>2</sub> amène la même énergie quelle que soit l'espèce, se sont logiquement d'autres facteurs qui déterminent la juxtaposition des espèces hydrogénovores.

### 3.2. L'oxydation de l'H<sub>2</sub> en aérobie

Les bactéries ayant la capacité d'oxyder l'H<sub>2</sub> en présence d'O<sub>2</sub> sont appelées « bactéries *knallgas* », un terme allemand signifiant gaz explosif en référence au mélange H<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (Kaserer, 1905). La majorité de l'H<sub>2</sub> oxydé par ces bactéries aérobies ou microaérophiles est produit par les nodules racinaires fixant le diazote (N<sub>2</sub>). La réduction du N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub><sup>-</sup> générant une grande quantité d'H<sub>2</sub>, les concentrations peuvent atteindre localement 20 000 ppmv. Cet H<sub>2</sub> est consommé directement *in situ* (Cunningham *et al.*, 1986), dans un rayon d'en moyenne 4,5 centimètres autour du lieu de synthèse (Hunt & Layzell, 1993), par les microorganismes du sol.

Parmi ces microorganismes, on retrouve principalement les bactéries exprimant une ou plusieurs hydrogénase(s) [NiFe], ces dernières étant moins sensibles à l'O<sub>2</sub> que les hydrogénases Hmd ou [FeFe] (Buhrke *et al.*, 2005). Étant donné les nombreux transferts horizontaux des gènes codant pour les hydrogénases et leur aspect modulaire, il n'existe pas

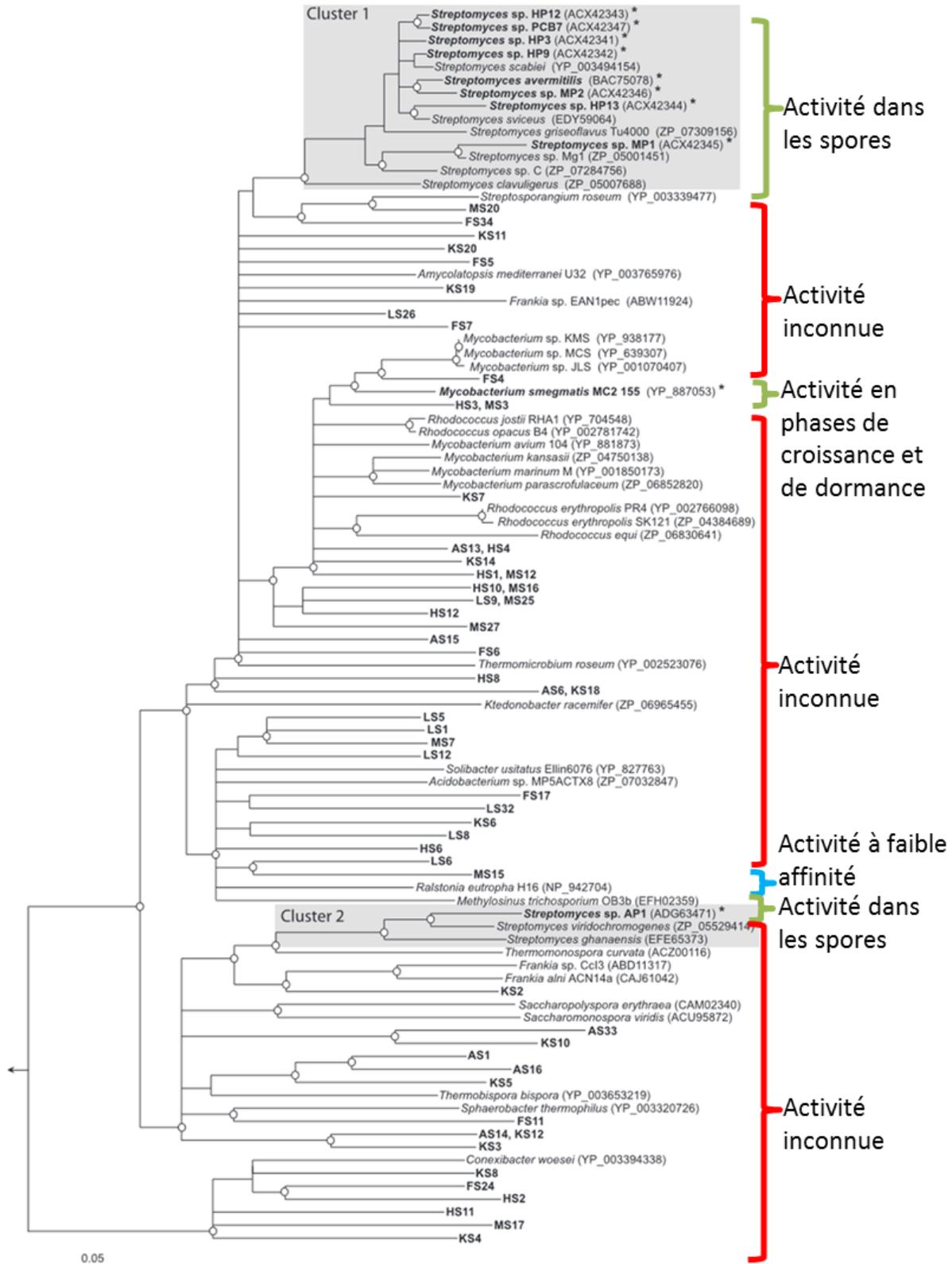
de relation taxonomique claire entre les bactéries *knallgas* (Schwartz *et al.*, 2013). Elles ne forment donc pas une branche taxonomique précise, mais sont présentes à travers tout le domaine des bactéries. Dans le sol en milieu aérobie, l'oxydation de l' $H_2$  est un processus diphasique, impliquant deux activités, l'une à faible ( $K_m > 1000$  ppmv) et l'autre à haute affinité ( $K_m < 100$  ppmv), permettant de supposer l'existence d'au moins deux sous-populations : les bactéries oxydant l' $H_2$  avec une faible affinité, et celles, beaucoup moins connues, l'oxydant avec une haute affinité.

La population à faible affinité a été largement étudiée, particulièrement à travers la bactérie modèle *R. eutropha* H16. Cette bactérie chimiolithoautotrophe facultative possède quatre hydrogénases [NiFe] différentes, dont deux lui permettant de soutenir sa croissance : une hydrogénase hétérotrimérique liée à la membrane (MBH), couplée à la chaîne respiratoire et permettant la création d'un gradient de protons; et une hydrogénase oxydative soluble (HO) recyclant les équivalents réducteurs via la réduction du  $NAD^+$  en NADH en présence d' $H_2$ , permettant de fixer le  $CO_2$  dans le cycle de Calvin (Friedrich *et al.*, 1981). L'expression de cette dernière hydrogénase est sous le contrôle d'une hydrogénase régulatrice de type 2b (HR). Cette bactérie possède un métabolisme mixotrophe : elle peut métaboliser des composés organiques lorsqu'ils sont disponibles, fixer le  $CO_2$  grâce à l'énergie tirée de l'oxydation de l' $H_2$  en cas de carence en nutriments organiques, ou utiliser ces deux métabolismes en simultanée. La sous-population bactérienne dont fait partie *R. eutropha* exprime des hydrogénases [NiFe] appartenant aux groupes 1, 2 ou 3 qui démontrent une faible affinité pour l' $H_2$ , avec des  $K_{m(app)}$  supérieurs à 1000 ppmv. Elle ne peut donc pas capter l' $H_2$  atmosphérique puisque la faible affinité des hydrogénases ne permet pas l'oxydation de l' $H_2$  à des concentrations inférieures à 1 ppmv (Schuler & Conrad, 1990).

La population à haute affinité fut découverte grâce aux travaux de Constant *et al.* (Constant *et al.*, 2011a, Constant *et al.*, 2010, Constant *et al.*, 2008), soit l'existence d'une sous-population incluant des bactéries possédant la capacité d'oxyder l' $H_2$  atmosphérique (0,53 ppmv) grâce à des hydrogénases à haute affinité (HHA,  $K_{m(app)} < 100$  ppmv). Après un enrichissement continu en  $H_2$  d'un sol naturel durant 10 jours dans un microcosme à phase dynamique, l'apparition de l'activité d'oxydation à haute affinité de l' $H_2$  fut corrélée avec celle d'un mycélium blanc en surface des particules de sol. Après culture sur différents milieux, 8 bactéries (PCB1-8) et 2 champignons (PCM1-2) ont été isolés, et les séquences des régions variables V3 des ARNr 16S (bactéries) ou les régions V7 et V8 des ARNr 18S (champignons) ont été séquencées.

L'inoculation de sol stérile avec chacune de ces espèces a montré que la souche PB7 amenait l'oxydation à haute affinité. La séquence de son gène codant pour l'ARN 16S indiquait qu'il s'agissait d'un *Streptomyces* (Constant *et al.*, 2008). Cette oxydation d'H<sub>2</sub> a ensuite été retrouvée chez diverses actinobactéries, incluant *Streptomyces avermitilis*, *Rhodococcus jostii* (DSM 44719), ou *Mycobacterium smegmatis*, dont les génomes possèdent un groupe de gènes codant pour les composantes structurales et accessoires d'une hydrogénase [NiFe] hypothétique (Constant *et al.*, 2010) (Fig. 3).

Figure 3 : Arbre phylogénétique du gène *hhyL* basé sur les séquences d'acides aminés.



Tiré de Constant et al. 2011

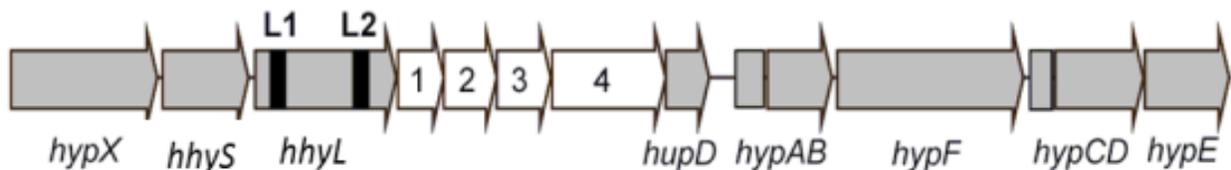
Une analyse phylogénétique démontrait clairement que le gène *hhyL*, codant pour la grande sous-unité de cette hydrogénase hypothétique, formait un nouveau groupe phylogénétique, celui des hydrogénases [NiFe] du groupe 5 (Constant *et al.*, 2011b). Ces hydrogénases possèderaient à la fois une haute affinité pour l'H<sub>2</sub> avec un Km<sub>(app)</sub> inférieur à 100 ppmv et une haute tolérance à l'O<sub>2</sub> de par leur contact étroit avec l'atmosphère (Constant *et al.*, 2011a). Ces micro-organismes seraient le chaînon manquant dans notre connaissance du cycle biogéochimique de l'H<sub>2</sub>, puisque la réaction catalysant l'oxydation de l'H<sub>2</sub> atmosphérique était auparavant attribuée à la présence d'hydrogénases hypothétiques (considérées comme abiotiques (Conrad, 1996) issues de bactéries mortes et stabilisées par la matrice du sol. Elles participeraient donc directement à la stabilité de la concentration atmosphérique en H<sub>2</sub>, compensant jusqu'à présent l'activité anthropique en constante augmentation. Les bactéries démontrant une forte affinité pour l'H<sub>2</sub> possèderaient de fait une hydrogénase aux propriétés exceptionnelles, dont la structure et le rôle physiologique sont encore inconnus, mais ayant un rôle majeur dans la biogéochimie de l'H<sub>2</sub> atmosphérique. Cette activité hydrogénase à haute affinité a été très récemment étudiée chez *M. smegmatis* par Greening *et al* (Greening *et al.*, 2014a, Greening *et al.*, 2014b). Au sein de cette bactérie coexistent trois [NiFe]-hydrogénases des groupes 2a, 3b et 5. L'oxydation de l'H<sub>2</sub> à des concentrations atmosphériques a lieu durant les phases végétative et stationnaire en milieu liquide, et aurait pour rôle de participer à la croissance puis, lors de la phase stationnaire, dans la régénération de cofacteurs oxydés. Par contre, son implication dans la phase de dormance, dont le phénotype diffère en de nombreux points (Anuchin *et al.*, 2009), n'a pas encore été démontrée. De même, chez *S. avermitilis*, une hydrogénase a été détectée. Après culture dans un sol stérile, cette bactérie a démontré une oxydation de l'H<sub>2</sub> avec un Km<sub>(app)</sub> de 51 ppmv, confirmant la présence d'une HHA, mais dont l'activité était confinée à la spore mature et inexistante dans le mycélium. La culture sur un milieu supplémenté en nickel amène la plus forte capacité d'oxydation (Constant *et al.*, 2011a, Constant *et al.*, 2010). *S. avermitilis* est très étudiée dans le

domaine biomédical grâce à sa production de divers antibiotiques et antihelminthiques tels que les avermectines (Ikeda *et al.*, 1999, Ōmura *et al.*, 2001). Grâce à cette notoriété, son génome a été séquencé permettant ainsi d'identifier le groupe de gènes codant pour une hydrogénase [NiFe] cytoplasmique du groupe 5 hypothétique. Les principaux gènes nécessaires à la maturation de l'hydrogénase sont également présents (Fig. 4). Ce groupe de protéines accessoires a pour fonctions de synthétiser le site actif métallique comportant le Ni et le Fe ainsi que leurs ligands soient le CO et le CN<sup>-</sup>, puis insérer ce cofacteur métallique dans la grande sous-unité, maintenue dans une conformation permettant ladite insertion (Lenz *et al.*, 2010, Vignais & Billoud, 2007). Par contre, les fonctions des ORF 1, 2, 3 et 4 sont totalement inconnues à ce jour, mais la présence de nombreux résidus cystéines sur deux d'entre eux suggérerait des liaisons avec des atomes de fer. Une analyse du génome de *S. avermitilis* a révélé la présence d'une seule hydrogénase dans la bactérie. Comme il a été démontré que *S. avermitilis* possède une activité HHA, celle-ci est potentiellement liée à l'activité de cette nouvelle hydrogénase appartenant au groupe 5 (Constant *et al.*, 2011a). Il est important de mentionner que l'activité hydrogénase de *S. avermitilis* n'a été mise en évidence que dans les spores et non dans le mycélium de la bactérie, et ce de même pour les autres *Streptomyces* testés pour cette même activité (Meredith *et al.*, 2014). Cette expression, liée à ce stade précis du développement, suggère un lien entre la régulation de l'expression de l'HHA et l'appauvrissement du milieu en nutriments déclenchant la sporulation (Constant *et al.*, 2010).

### 3.3. Cycle de vie et spores des *Streptomyces*

Même si quelques exceptions sont connues (Kirby *et al.*, 2012, Lerat *et al.*, 2009), les *Streptomyces* sont généralement des bactéries du sol. Sur un milieu solide, les streptomycètes ont un cycle de développement complexe passant par différentes phases de différenciation : le mycélium végétatif se développe durant une période d'approximativement trois jours. L'expression des gènes *bld* va déclencher la formation d'un mycélium aérien. L'expression des

Figure 4 : Structure du groupe de gènes contenant les sous-unités structurales et de maturation de l'hydrogénase hypothétique ainsi que les 4 ORF inconnus, dans le génome de *S. avermitilis*.



Tiré de Constant *et al.* 2011

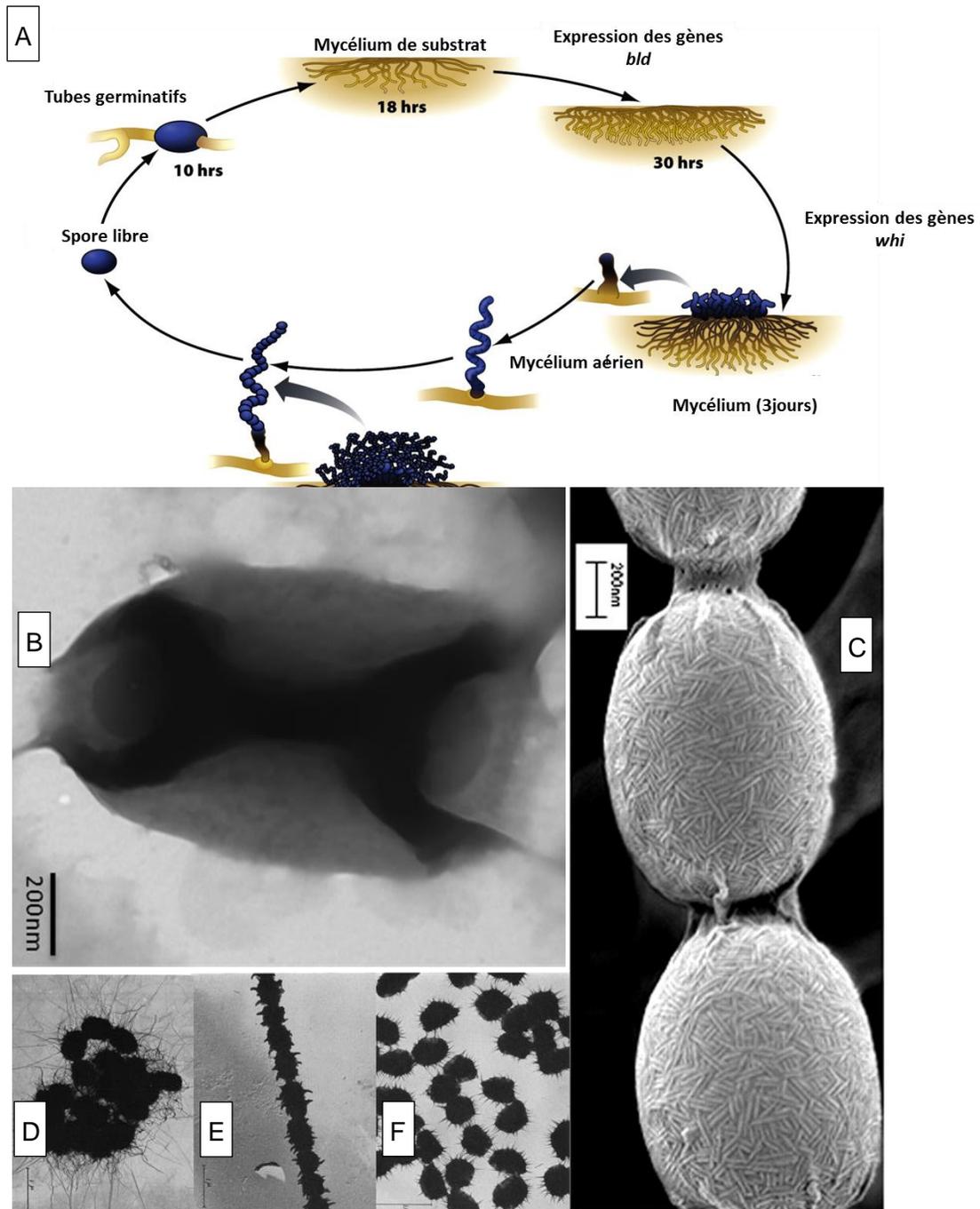
gènes *whi* va provoquer la septation du mycélium aérien, qui va former des chaînes de spores, et libérer par après des spores libres, qui re-germineront à leur tour en présence de nutriments Fig. 5A) (Angert, 2005). Au contraire, la croissance en milieu liquide permet le développement d'un mycélium végétatif suivie d'une phase stationnaire, sans sporulation.

Les spores bactériennes :

Les spores bactériennes les plus largement étudiées sont les spores du genre *Bacillus*. Ces dernières sont créées à l'intérieur d'une cellule mère, d'où l'appellation d'endospores. Elles sont connues pour résister à des environnements extrêmes (UV, vide spatial, rayons gamma, pression, températures extrêmes, etc.), et possédant un métabolisme quasi-indétectable (Setlow, 2006), ce qui en fait des structures de survie extrêmement performantes. Les spores du genre *Streptomyces* sont différentes : résultantes de la septation d'un hyphe aérien et non d'une formation intracellulaire, elles sont beaucoup moins résistantes aux stress environnementaux que celles du genre *Bacillus*, mais plus résistantes que les hyphes en termes de sonication, chaleur, détergents et déshydratation (Ensign, 1978). Ce sont donc certes des structures visant à survivre à des conditions environnementales inadaptées pour la phase de croissance, mais agissant aussi comme moyen de dispersion pour la bactérie, à travers l'eau, l'air, et les arthropodes (Mayfield et al., 1972), grâce à leur hydrophobicité et, parfois, une structure externe adhérente possédant des excroissances de diverses formes (Tresner et al., 1961, Williams & Davies, 1967). Effectivement, les spores de *Streptomyces* sont enveloppées d'une gaine protectrice non-lipidique générée par le mycélium aérien, et obtenue lors de la sporulation, ce qui les rend totalement hydrophobes. Sous cette gaine, on retrouve le plus souvent une paroi composée de paires de bâtonnets fibrillaires composés de chapelines en interaction avec des rodlines (Claessen et al., 2004). Celle-ci protège l'intégrité de la spore, et possède une résistance au lysozyme non retrouvée chez la paroi du mycélium (DeJong & McCoy, 1966). Cette structure leur permet de survivre à une température de 120°C durant 30 min à l'air sec ou immergées dans l'huile, et même dans l'eau, même si dans ce dernier cas, une incubation de 28 jours entre 28 et 37°C est requise pour permettre aux spores de se régénérer. Des temps d'incubation inférieures ou des températures supérieures empêchent ladite régénération (DeJong & McCoy, 1966). On notera l'absence de rodlines chez *S. avermitilis*, ceci dû à l'absence de gène *rdl* dans son génome, rendant ses spores lisses (Claessen et al., 2004). Néanmoins, les spores de Streptomycetes sont connues pour adopter

diverses formes incluant des épines, des poils, ou des protubérances (Fig. 5 B, C, D, E, F) (Tresner *et al.*, 1961).

Figure 5 : Cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide (A), et photographies de spores de *Streptomyces* en microscopie électronique (B, C, D, E, F)



(A) Figure traduite de (Slonczewski & Foster, 2013). (B) Spore de *S. avermitilis*, grossissement 134 000 X (notre étude). (C) Spores de *S. coelicolor* (Claessen *et al.*, 2004). (D) Spores de *Streptomyces alogriseolus* (Tresner *et al.*, 1961). (E) Spores de *Streptomyces purpurascens* (Tresner *et al.*, 1961). (F) Spores de *Streptomyces diastatochromogenes* (Tresner *et al.*, 1961).

Lorsque les spores sont en milieu sec, le cytoplasme est semblable à celui du mycélium, à la différence qu'il ne contient qu'entre 2 et 4% d'H<sub>2</sub>O, généralement lié aux molécules endogènes et rarement à l'état libre (Ensign, 1978). L'ADN et les ribosomes semblent en interaction avec un pigment jaune présent en grande quantité, dont le rôle pourrait être une protection aux ultraviolets et/ou une voie de régulation de la germination.

Néanmoins, une fois hydratées, elles possèdent bien un métabolisme actif et détectable (McBride & Ensign, 1987), contrairement à celles du genre *Bacillus*. Les spores ont une respiration très faible (la quantité de cytochrome A, B et C est réduite chez les spores) mais constante, ce qui leur permet de conserver un métabolisme minimal. Une autre particularité des spores est leur accumulation de deux sucres : le tréhalose et le glycogène. Le tréhalose est un disaccharide accumulé au sein des spores, et métabolisé par les tréhalases, enzymes hydrolysant le tréhalose et ayant une très forte affinité pour celui-ci. Chez *Streptomyces hygroscopicus*, on retrouve 235 µg de tréhalose par mg de spores (150 µg dans le mycélium) et la concentration en tréhalase double, pour atteindre 46 unités par mg de spores au lieu de 26 dans le mycélium (Hey-Ferguson *et al.*, 1973). Ce tréhalose va être fortement hydrolysé durant les 20 heures de la germination. Un mécanisme encore inconnu inhibe en grande partie les tréhalases durant la dormance, et augmente leur activité d'un facteur 15 lors de la germination. Le glycogène, présent à 45 µg par mg de spores, sera hydrolysé au moment où les réserves de tréhalose seront épuisées (Hey-Ferguson *et al.*, 1973).

Le potentiel biotechnologique des *Streptomyces* (*i.e.* la production d'ATB) étant surtout relié à sa phase de différenciation en mycélium aérien (Bibb, 1996), les spores de ce genre ont été très peu étudiées et les informations sur leur structure et leur métabolisme sont parcellaires et datent principalement d'avant les années 80. Depuis, très peu de recherches ont été entreprises pour en savoir plus sur le métabolisme des spores de ce genre bactérien.

#### **3.4. La juxtaposition des bactéries *knallgas* dans l'environnement**

Comme vu précédemment, la juxtaposition dans l'environnement des bactéries *knallgas* n'est pas liée à l'accepteur final d'électron. Il était suggéré dans la littérature que le facteur modulant cette juxtaposition serait l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Effectivement, plus l'affinité pour un substrat est faible, plus sa vitesse maximum d'oxydation ( $V_{max}$ ) est élevée. Ainsi, dans un milieu riche en H<sub>2</sub>, une bactérie à faible affinité oxyderait beaucoup plus vite l'H<sub>2</sub> et se retrouverait avantagée par rapport à une bactérie ayant une forte affinité envers l'H<sub>2</sub> mais dont

le  $V_{\max}$  est faible. Inversement, dans un milieu pauvre en  $H_2$ , les bactéries à haute affinité pourraient capter l' $H_2$  que les bactéries à faible affinité seraient incapables d'oxyder. Ceci disposerait la population à faible affinité dans les zones les plus concentrées en  $H_2$ , tandis que la population à faible affinité serait présente à la frange du gradient d' $H_2$ , captant les traces d' $H_2$  restantes. Néanmoins, la découverte de bactéries co-exprimant des enzymes à faible et haute affinités ainsi que d'autres possédant une affinité intermédiaire ( $K_m$  entre 100 et 1000 ppmv) remet en cause cette séparation nette de deux populations, et suggère que la disposition des bactéries *knallgas* au sein des gradients d' $H_2$  dans le sol dépendrait d'autres facteurs qui restent à découvrir. Les résultats de nos recherches vont justement aller dans ce sens en montrant que les bactéries à haute affinité pour l' $H_2$  réagissent différemment, au niveau physiologique et régulation, à une même concentration d' $H_2$ .

#### **4. Potentiel énergétique de l'hydrogénase à haute affinité de *S. avermitilis***

Le rôle physiologique de l'HHA fut une des premières questions posée suite à l'isolement de bactéries capturant les traces d' $H_2$  présentes dans l'atmosphère. Effectivement, considérant la faible vitesse de catalyse comparativement aux autres hydrogénases [NiFe] et son activité restreinte aux spores, l'implication de l'HHA dans la croissance fut rapidement perçue comme improbable, mais potentiellement suffisante pour maintenir un métabolisme minimal (Constant *et al.*, 2010). Une première approche pour tester cette hypothèse fut l'application de modèles thermodynamiques dédiés à estimer l'énergie apportée par l'HHA. Il existe effectivement un modèle pour estimer l'énergie de maintenance nécessaire pour soutenir une certaine population de bactéries (Tijhuis *et al.*, 1993), à savoir :  $m_E = 4.5 \exp[-6,94.10^4 \times R (1 / T) - (1/298)]$  avec R la constante universelle des gaz parfaits ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) et T la température en Kelvin. Le résultat,  $m_E$ , est en kJ par  $[C_{\text{mole}_{\text{biomasse}}}]^{-1}$ . S'appuyant sur ce modèle, il est possible d'estimer la biomasse ou le nombre de bactéries dont les besoins énergétiques de base pourraient être comblés par l'oxydation de l' $H_2$  atmosphérique (Conrad, 1996), à savoir :  $N = 1.4 \times 10^{14} (-\Delta G)d/m_E$ , (N étant la population de bactéries oxydant l' $H_2$  atmosphérique, exprimé en cellules par gramme de sol sec,  $1.4 \times 10^{14}$  une constante exprimant la densité cellulaire bactérienne par Cmoles de biomasse,  $\Delta G$  l'énergie de Gibbs de la réaction d'oxydation de l' $H_2$  (soit -199 kJ par mole d' $H_2$ ),  $d$  la vitesse d'oxydation de l' $H_2$  en moles d' $H_2$  par gramme de sol sec, et finalement  $m_E$  issu du calcul précédent). À 30°C,  $m_E = 4.5 \text{ kJ} \times C_{\text{mol}^{-1}} \text{ biomasse}$ , et avec 0,53 ppmv d' $H_2$ , les HHA pourraient donc supporter à elles seules une population de  $2,3 \times 10^7$  bactéries par gramme de sol. Dans son milieu naturel, l'enzyme peut se retrouver exposée à

des conditions saturantes, c'est-à-dire en présence de 500 ppmv d'H<sub>2</sub>. Dans ce cas, la population soutenue par l'H<sub>2</sub> pourrait être 10 fois supérieure. Il est donc possible que cette énergie sert à la maintenance d'un métabolisme minimal chez les spores des *Streptomyces*, permettant d'améliorer leur survie en attendant le retour de conditions plus favorables à la croissance. Ce calcul théorique fut mis à l'épreuve avec une collection de streptomycètes isolées du sol. Pour chacune des souches, la vitesse d'oxydation de l'H<sub>2</sub> ainsi que la biomasse furent évaluées. Les vitesses d'oxydation mesurées furent utilisées pour prédire la population théorique de streptomycètes soutenues par l'H<sub>2</sub> qui fut ensuite comparée à la biomasse bactérienne réelle (Constant *et al.*, 2010). Puisque la biomasse réelle était supérieure à celle prédite par le modèle thermodynamique, il fut conclu que l'H<sub>2</sub>, combiné à d'autres sources d'énergie assuraient la viabilité des spores. Un exercice similaire a été réalisé avec une collection de sols où la biomasse des bactéries oxydant l'H<sub>2</sub> avait été estimée cette fois-ci par qPCR ciblant le gène *hhyL*, codant pour la grande sous-unité de l'HHA (Constant *et al.*, 2011b). Encore une fois, l'abondance des gènes *hhyL* était supérieure à la population attendue selon le modèle thermodynamique. Ceci pouvait s'expliquer par la présence de bactéries pouvant avoir une hydrogénase de type 5 non-fonctionnelle (comme c'est le cas chez *R. eutropha*), ou par une expression non constitutive où l'activation se fait dans un contexte de mixotrophie permettant de soutenir une population plus importante qu'avec l'hydrogénase seule. Les deux études (Constant *et al.*, 2010, Schäfer *et al.*, 2013) tendaient à démontrer cependant que l'HHA à elle seule est insuffisante pour assurer la croissance des bactéries oxydant l'H<sub>2</sub>. Le rôle exact de l'enzyme demeurait ainsi obscur.

Une équipe de chercheurs de la Nouvelle-Zélande en sont venus à s'intéresser à l'HHA de *Mycobacterium smegmatis* suite à un concours de circonstances. En étudiant le mode de survie chez *M. smegmatis*, ils ont observé une hausse de l'expression de l'HHA dans leurs cultures latentes. Conscients qu'ils n'avaient pas fait d'ajouts d'H<sub>2</sub> dans leurs culture, et n'étant pas à l'affût des récentes publications rapportant l'existence d'HHA, les chercheurs ont inactivé génétiquement l'HHA pour comprendre le rôle de l'enzyme chez la bactérie. La souche mutante démontrait tout d'abord une baisse significative de production de biomasse (Berney & Cook, 2010). Par la suite, Greening *et al.* ont généré des mutants pour les trois hydrogénases [NiFe] de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, et découvert que cette bactérie peut croître de façon mixotrophique en captant le H<sub>2</sub> atmosphérique, à l'aide de deux hydrogénases : l'une du groupe 2a possédant l'activité oxydative principale, et l'autre du groupe 5, plus lente, mais néanmoins impliquée dans la croissance (Greening *et al.*, 2014b). Remarquant que l'activité HHA était à son maximum lors

de la phase stationnaire, ces mêmes auteurs ont conduit une étude transcriptomique et métabolomique, comparant *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 WT et mutée pour son hydrogénase à haute affinité, 1 h après le début de la phase stationnaire. Les résultats suggèrent que l'HHA de *M. smegmatis* serait impliquée dans la réduction des équivalents réducteurs durant la croissance mixotrophie, puis soutiendrait la chaîne respiratoire durant la dormance (Greening *et al.*, 2014b).

## II. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'étude de l'oxydation de l' $H_2$  atmosphérique par le sol a permis de découvrir les bactéries possédant une nouvelle hydrogénase [NiFe] dotée d'une haute affinité pour l' $H_2$ , de l'ordre du nanomolaire, dépassant le seuil de la micromolaire précédemment connu. Ce nouveau groupe d'hydrogénase reste encore peu caractérisé, que ce soit d'un point de vue biochimique ou physiologique. Ces HHA se retrouvent en particulier chez les *Streptomyces*, où l'activité à haute affinité est retrouvée seulement dans les spores matures, structures vouées à la survie et la dissémination. L'énergie apportée par cette hydrogénase étant théoriquement suffisante pour soutenir un métabolisme minimal, nous suggérons qu'elle serait impliquée dans un rôle nouveau chez les hydrogénases, à savoir le maintien de la viabilité des spores. Ces HHA pourraient alors revêtir une importance certaine dans la physiologie des spores des *Streptomyces*, et plus largement dans la persistance microbienne et la stabilité du microbiote du sol grâce à la persistance d'une partie de sa population. La vocation de cette thèse est d'élucider le rôle physiologique de cette enzyme particulière au sein du métabolisme des spores de *S. avermitilis* au travers d'une étude transcriptomique, puis de valider ce rôle via l'élaboration d'un mutant de délétion pour *hhySL* dans le but de découvrir sa potentielle implication dans le maintien d'un métabolisme minimal dans les spores tout comme l'absence d'impact sur la phase végétative.

### III. Le rôle physiologique de l'hydrogénase à haute affinité de *Streptomyces avermitilis*

#### 1. Mise en contexte

Les quatre premiers groupes d'hydrogénases [NiFe] à faible affinité ( $K_m > 1000$  ppmv) ont des rôles physiologiques déjà connus, et sont typiquement impliqués dans la génération d'énergie, la détection d' $H_2$  ou le recyclage des équivalents réducteurs durant la croissance hétéro- ou lithoautotrophique. Le rôle physiologique du 5<sup>ème</sup> groupe reste donc à déterminer. La première étude visant à étudier une HHA a eu lieu chez *R. eutropha* H16, possédant dans son génome un gène codant pour une hydrogénase du groupe 5, issue d'un transfert latéral. Mais étant donné sa faible expression et sa faible affinité envers l' $H_2$  (de l'ordre du micromolaire), son rôle physiologique reste inconnu. L'étude publiée par Greening *et al.* en 2014, s'intéresse au deux hydrogénases du groupe 2a et du groupe 5, dont les sous unités structurales sont codées respectivement par les gènes MSMEG\_2262-2263 et MSMEG\_2720-2719, de la bactérie *M. smegmatis*, isolée d'un patient humain, et pouvant toutes deux oxyder l' $H_2$  atmosphérique. Les auteurs de cette dernière étude ont proposé que l'oxydation de l' $H_2$  atmosphérique supporterait la croissance mixotrophique par la réduction des équivalents réducteurs comme le  $NAD^+/NADH$ , nécessaires au cycle du carbone, tandis qu'elle fournirait de l'énergie dédiée à la survie lors des phases de latence. Dans ces études précédentes, la présence de multiples hydrogénases, ainsi que leurs éléments de maturation, peut complexifier la documentation de leur rôle précis en raison des risques d'une redondance fonctionnelle. Par exemple, si la haute affinité est conférée par des éléments de maturation en *trans*, ces derniers pourraient compléter l'inactivation des gènes structuraux de l'HHA en modifiant les autres hydrogénases.

La présence d'une seule hydrogénase chez *S. avermitilis* fait de cette bactérie un modèle de choix pour étudier le rôle physiologique de l'HHA. Pour ce premier volet de ma thèse, une analyse transcriptomique a été entreprise pour explorer le rôle physiologique de l'HHA. Notre stratégie consistait à tirer profit de l'énergie apportée par l' $H_2$  pour détecter une réponse de l'expression génique chez *S. avermitilis*. En suivant cette idée, deux approches étaient possibles pour identifier les gènes dont le profil d'expression est influencé par l'activité de l'HHA : (1) exposer les spores à une phase gazeuse exempte d' $H_2$  ou (2) exposer les spores à une forte concentration d' $H_2$ . Compte tenu des difficultés entourant l'exposition de la biomasse à une

phase gazeuse complètement exempte d'H<sub>2</sub> (e.g. risque de production abiotique par le milieu de culture après stérilisation), l'incubation des spores s'est faite sous exposition à l'air ambiant (conditions contrôles de l'expérience ; 0,53 ppmv d'H<sub>2</sub>) et sous exposition à des concentrations saturantes pour l'HHA (conditions tests de l'expérience ; 500 ppmv d'H<sub>2</sub>). Même si les conditions saturantes correspondent à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans l'atmosphère, elles simulent néanmoins une condition que l'on retrouve dans le sol. L'objectif de cette expérience consistait donc à identifier les gènes dont l'expression augmentait ou diminuait lorsque l'HHA était saturée par son substrat.

## **2. Matériels et méthodes**

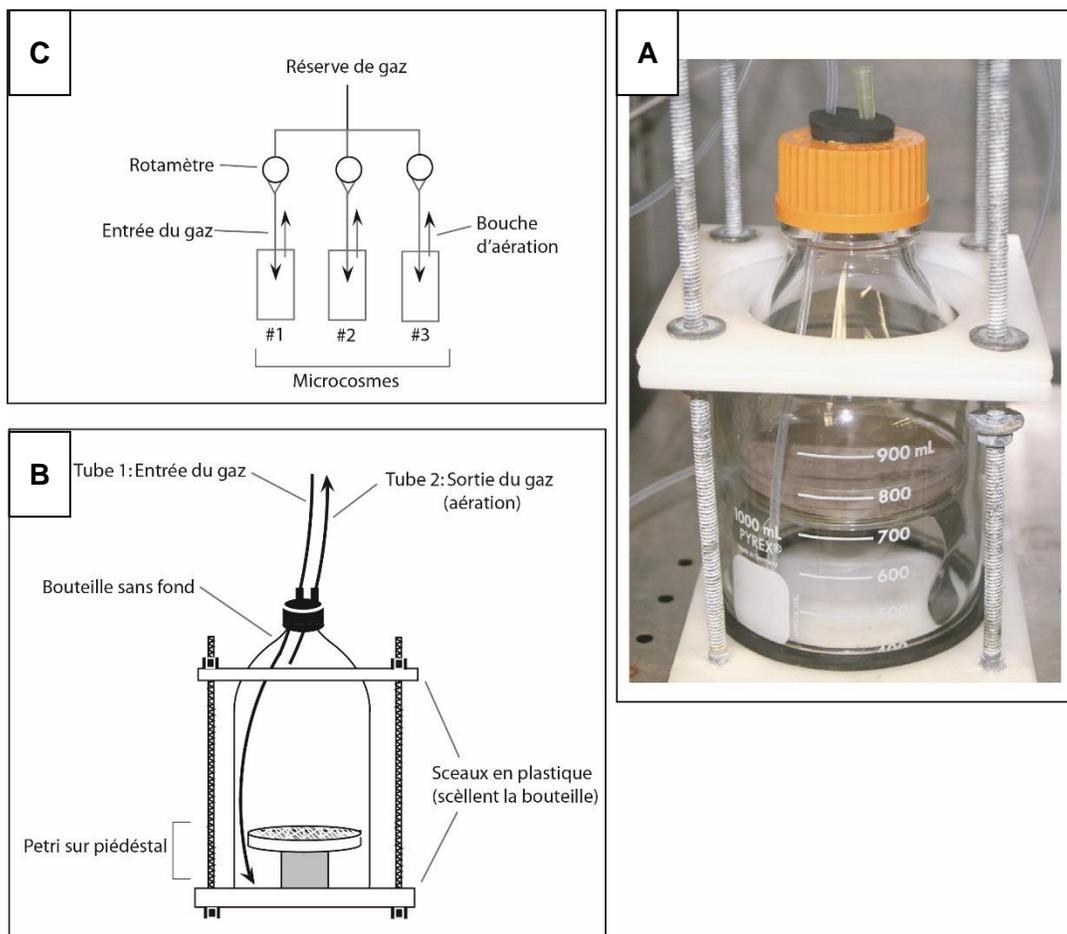
### **2.1. Organisme modèle**

*S. avermitilis* MA\_4680 isolée d'un sol japonais (Kim & Goodfellow, 2002) est le modèle de bactérie oxydant l'H<sub>2</sub> à haute affinité qui fut choisi pour cette étude. La souche de *S. avermitilis* MA\_4680 DSM-46492, provenant du « Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures » a été cultivée sur MS-Agar (Tobias *et al.*, 2000) supplémenté avec 10 µM de Ni<sup>2+</sup> (voir Milieux de culture en annexe).

### **2.2. Montage expérimental**

Une suspension de spores (approximativement 10<sup>8</sup> spores dans 100 µL) a été étalée sur une gélose MS-agar (2 conditions x 3 réplicats) à l'aide de 5 billes de verre de 2 mm diamètre, stérile, et incubée à 30°C, permettant au mycélium de surface de se développer jusqu'à confluence et de produire un mycélium aérien formant des spores tout juste matures. Après 5 jours d'incubation, chaque gélose démontrant un tapis confluent de mycélium aérien a été transférée dans un microcosme à phase gazeuse dynamique consistant en une bouteille sans fond de 1000 ml montée sur un système en plastique permettant l'étanchéité, un cercle de caoutchouc scellant la bouteille au fond du support en plastique (Fig. 6 A). Ce système est équipé d'un septum à deux ports, utilisé pour faire circuler l'air à l'intérieur (Fig. 6 B). Le premier port sert à amener le mélange d'air consistant dans les deux cas en un mélange synthétique (« air zéro », contenant 0,53 ppmv d'H<sub>2</sub>, désigné comme l'air à faible concentration d'H<sub>2</sub>, nommé aH<sub>2</sub>) ou un mélange de gaz enrichi en H<sub>2</sub> (500 ppmv d'H<sub>2</sub> équilibré avec de l'air zéro, désigné comme l'air à haute concentration d'H<sub>2</sub>, nommé eH<sub>2</sub>). Le second port est utilisé comme sortie pour le surplus d'air. Le flux d'air alimentant le système a été fixé à 40 ml min<sup>-1</sup> à l'aide de rotamètres (Fig. 6 C). Ce système permet d'exposer les spores à une atmosphère contrôlée

(débit et concentration d'H<sub>2</sub>) durant leur maturation. Ainsi, durant 48 heures, la seconde phase d'incubation a lieu dans des microcosmes, en présence de faible ou haute concentrations d'H<sub>2</sub>. Après incubation, les spores matures sont récupérées rapidement (t < 2 min) en grattant les géloses à l'aide d'une lame de bistouri, transférées dans un tube à vis de 2 ml contenant 100 mg de billes de verre de 0,2 mm de diamètre, 700 µl de tampon TM (50 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0) et 35 µl de SDS 20% p/v. Les tubes sont ensuite plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.



**Figure 6 : Illustrations du microcosme à phase dynamique utilisé pour l'étude transcriptomique.**

(A) Photo d'un microcosme utilisé durant l'étude. (B) Vue détaillée d'un microcosme : l'air y est continuellement injecté via le tube 1 sous la gélose, minimisant ainsi la dessiccation, et évacué par le tube 2 en haut du microcosme. (C) Schéma des différents rotamètres apportant l'air zéro ou l'H<sub>2</sub> à 500 ppmv dans les microcosmes branchés en parallèle, contenant chacun une gélose à confluence de spores matures de *S. avermitilis*.

L'ARN total a été extrait via l'utilisation d'une technique de lyse mécanique et chimique. La biomasse contenue dans les tubes a été broyée à l'aide d'un homogénéisateur FastPrep®-24

Instrument (MP Biomedicals), pulvérisant les spores à une vitesse de  $6 \text{ m s}^{-1}$  durant 40 sec. Après une centrifugation de 5 min à  $20\,000 \times g$  à  $0^\circ\text{C}$ , le surnageant a été recueilli et le culot a été remis en suspension dans 700  $\mu\text{l}$  tampon PBL (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM EDTA disodique, 0,1% (p/v) SDS, 6% phénol) et transféré dans l'homogénéisateur pour un second broyage des spores. Les acides nucléiques ont été purifiés à partir des deux surnageants combinés, à travers une extraction au phénol (pH 4,3), puis au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, pH 4,3) et enfin au chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Les acides nucléiques ont été précipités pendant une nuit à  $-20^\circ\text{C}$  après mélange de la phase aqueuse avec trois volumes d'éthanol 100% et 0,1 volume d'AcNa (10 M, pH 5,2).

Les acides nucléiques ont été solubilisés dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM d'EDTA disodique, pH 8,0). Un traitement DNase a été réalisé en utilisant la trousse TurboDNase (Invitrogen), suivant le protocole du fabricant. L'absence d'ADN résiduel a été confirmé en faisant migrer les échantillons sur gel d'agarose, et par l'absence d'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S avec les amorces 27F et V3R (Chakravorty *et al.*, 2007). La quantification de l'ARN a été effectuée en utilisant un thermocycleur PCR en temps réel (Corbett RG-6000) avec un système d'ADN QuantiFluor (Promega).

Une concentration de 200 ng d'ARN dans 40  $\mu\text{l}$  par échantillon a été expédié à l'équipe technique de Génome Québec (Université McGill) pour le contrôle de qualité, la préparation et le séquençage des échantillons en utilisant la technologie Illumina HiSeq. Les séquences brutes démultiplexées ont été reçues dans des fichiers dit « paired-end » (R1 et R2), sans code à barre. Les fragments de 100 pb avaient en moyenne un score phredQ  $> 30$  pour chaque base, dénotant une bonne qualité de séquençage. Les données ont été filtrées à l'aide du module `fastx_quality_filter` de la suite `fastx_tools` (Blankenberg *et al.*, 2010) pour retirer les fragments de mauvaise qualité (arguments : `q = 20`, `p = 90` : toute séquence avec moins de 90% de ses bases ayant un score phredQ de 20 ou plus était ainsi retirée). Ensuite, les fichiers R1 (séquences anti-sens) ont été convertis en complément-inverse et fusionnés aux fichiers R2 (séquences sens) correspondants. Pour éviter un biais dans les analyses statistiques subséquentes dû à la profondeur de séquençage différente selon les échantillons, les six banques de séquences ont été standardisées pour que l'effectif de chaque échantillon soit égal à celui qui avait le moins de séquences (48 millions de séquences). Cette opération fut réalisée par sous-échantillonnage aléatoire, en utilisant le code de programmation *subsampler* sous

Python (David Eccles, Wellington, Nouvelle-Zélande, non-publié, disponible à l'adresse suivante : <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=16505>). Ensuite, le logiciel Rockhopper (Tjaden, 2015) a été utilisé pour l'alignement des séquences sur le génome de *S. avermitilis* MA\_4680 ainsi que leur annotation. Toutes les lignes de commandes utilisées pour ces opérations sont disponibles en annexe 3.

### **3. Justification sur les méthodes employées**

#### **3.1. Méthode transcriptomique**

Notre étude transcriptomique est basée sur un séquençage des ARNm, mais il existe deux technologies de transcriptomiques : soit celle utilisant des biopuces de type « microarray », soit le séquençage à haut débit des ARNm (RNAseq). Le séquençage à haut débit des ARNm se distingue par l'existence de plusieurs technologies différentes (Illumina HiSeq, Life Tech. SOLiD, Roche 454 ou IonTorrent...) mais même si la chimie est différente, le principe de base reste le même : un séquençage massif en parallèle de fragments d'ADNc obtenus après rétrotranscription des ARN (Liu *et al.*, 2012a). La différence se trouve au niveau de la longueur des fragments : 50 à 250 nucléotides pour les technologies HiSeq et SOLiD, et jusqu'à 400 nucléotides pour les technologies Roche 454 et IonTorrent, mais avec un nombre de séquences moindre. Dans le cas d'une analyse *de novo*, plus la taille des fragments est élevée, plus il sera simple d'assembler des génomes. Au contraire, si le génome de l'organisme est déjà disponible, l'utilisation d'une technologie générant plus de séquences, même si plus courtes, permet d'augmenter la profondeur de séquençage et donc de détecter plus de gènes et donc plus finement les variations d'expression. Ces différentes technologies sont donc parfois complémentaires. Étant donné la nature discrète et qualitative des données brutes générées par un séquençage, la plage dynamique n'est limitée que par la profondeur de séquençage.

#### **3.2. Alignement des séquences**

Après séquençage et traitement des données brutes, les séquences ont été alignées sur le génome de référence par le logiciel Rockhopper, pour obtenir le nombre brut de transcrits pour chacun des gènes. Il existe d'autres logiciels capables de faire cet alignement, en particulier Cufflinks, le plus couramment utilisé. Cufflinks assemble les transcrits, estime leur abondance et peut calculer le taux d'expression différentielle entre les échantillons, mais sa conception est basée sur l'analyse de génomes eucaryotes. Rockhopper a été choisi pour son dessein spécifique aux génomes bactériens, prenant en compte leur structure particulière comme des

séquences polycistroniques, des opérons, et les petits ARN régulateurs (sRNA), inexistantes dans les génomes eucaryotes. Il est aussi à noter que sa simplicité, sa rapidité et sa compatibilité avec de nombreux formats de fichiers de séquençage, en a fait selon notre expérience un outil préférable à Cufflinks.

### 3.3. Test statistique

Une étude transcriptomique a souvent pour but la recherche des gènes exprimés différemment entre au moins deux conditions. Pour y répondre, il est nécessaire d'utiliser un test statistique approprié. Dans notre étude, le test non-paramétrique NOISeqBIO a été utilisé. Il convient d'expliquer pourquoi, et d'en présenter les alternatives toutes aussi pertinentes.

Le choix d'un test statistique dépend de plusieurs facteurs :

- La forme des données : quantitatives (discrètes ou continues) ou qualitatives (ordinales ou nominales). Seules les données quantitatives peuvent faire l'objet d'un test paramétrique.
- Le nombre d'échantillons : si  $n = 1$ , un test exact de Fisher sera la solution appropriée, et en deçà de 3, un test paramétrique est déconseillé, sauf à faire des hypothèses irréalistes.
- Le respect de certaines conditions : distribution normale des données, égalité de la variance, échantillons indépendants, sont des propriétés nécessaires dans le cas d'un test paramétrique.

Étant donné le grand nombre de gènes et de transcrits lors d'un séquençage d'ARNm, il est fort probable d'avoir une distribution normale des données. Dans le doute, un test de Shapiro-Wilk, ou un test de Kolmogorov-Smirnov, peuvent être fait. Dans ces deux tests, l'hypothèse nulle est que la population est normalement distribuée. De fait, la valeur  $p$  doit être supérieure au seuil choisi, soit classiquement un seuil  $\alpha$  de 0,05. Si cette hypothèse est vérifiée, cela confirme que la probabilité que la population ne soit pas distribuée de façon normale est inférieure à 5%. Les tests paramétriques, malgré leurs nombreuses restrictions, sont souvent considérés comme plus robustes, mais les résultats peuvent être discutables si la distribution des données s'écarte de la normalité. Au contraire, les tests non-paramétriques ne se basent sur aucune présomption sur la distribution des données, d'où l'utilisation répandue de tests non-paramétriques pour traiter les données biologiques. Ils sont néanmoins considérés comme moins robustes, en particulier en présence d'un faible nombre de répliques.

Les résultats bruts sont à l'origine des données qualitatives discrètes (séquences nucléotidiques), transformables en données quantitatives discrètes après alignement des séquences sur le génome de référence et calcul du nombre de transcrits par gène. Ces données peuvent être transformées en données quantitatives continues via différentes méthodes de standardisation : RPKM, FPKM, TMM, etc. visant à corriger le facteur d'expression de chaque gène par rapport à la longueur du gène, (un transcrit sera d'autant plus détecté que le gène est grand) et à le standardiser par rapport à l'expression totale dans l'échantillon. Il est aussi possible de faire une correction en fonction du contenu en GC des gènes, lorsque l'on veut comparer des espèces différentes ayant les mêmes gènes mais avec une composition nucléotidique différente, la variation du taux de GC influant sur le niveau de détection et de transcription des gènes (Risso *et al.*, 2011).

Dans la littérature, on retrouve pour les tests paramétriques l'utilisation des logiciels edgeR, baySeq ou DESeq, tous basés sur la distribution binomiale négative des données. Contrairement à une distribution de Poisson qui modélise la variation technique et considère que la moyenne augmente proportionnellement à la variance, la distribution binomiale négative modélise la variabilité biologique en rajoutant un facteur de dispersion dans ses paramètres, la variance augmentant plus vite que la moyenne. À partir de ces données, ces logiciels peuvent conduire une large gamme de tests statistiques, comme le test exact de Fisher, le modèle linéaire généralisé (une forme de régression linéaire) couplé à un test de quasi-probabilité (*quasi-likelihood test* en anglais) cherchant toute donnée s'écartant de la distribution binomiale inverse, ou encore un test statistique empirique bayésien, conçu pour le débruitage des données, ne gardant que les données au-delà du « bruit » généré par les répliques. À l'inverse, les tests non-paramétriques ne présument d'aucune distribution préalable des données. Les plus courants utilisent des méthodes différentes : SAMseq utilise le rang des valeurs d'expression dans un test de Wilcoxon, alors que NPEBseq et LFCseq utilisent une approche empirique bayésienne basée sur le taux de variation d'expression, tandis que NOISeqBIO utilise la même approche mais prend en compte à la fois le facteur de variation et la différence absolue de l'expression des gènes. Pour connaître l'efficacité d'un test, paramétrique ou non, il existe la possibilité de générer des données simulées, où les gènes exprimés différentiellement (ED) et non-exprimés différentiellement (non-ED) sont connus. On peut ainsi déterminer leur rapport d'expression différentielle, leur niveau d'expression, et ajouter des « outliers » dans l'expérience, c'est-à-dire des aberrations (e.g. un transcrit 10 fois plus présent dans un réplica par rapport aux autres). L'efficacité du test statistique va être jugée selon :

- L'habileté à discriminer les gènes ED des non-ED
- Le taux de faux positifs (FDR, pour *False Discovery Rate*) qui doit être le plus bas possible.

La capacité de NOISeqBIO à discriminer les gènes ED des non-ED ainsi que son faible taux de faux positifs font partie des raisons de son choix dans notre étude. De plus, ce progiciel inclut trois sous-programmes d'analyse : NOISeq-real (pour répliques techniques), NOISeq-sim, (absence de répliques), et NOISeqBIO (pour répliques biologiques indépendants). En résumé, pour permettre la séparation des gènes ED et non-ED, NOISeqBIO va suivre plusieurs étapes :

1. Tout d'abord, il regroupe les gènes selon leur niveau d'expression (*clustering*).
2. Ensuite, il calcule une valeur Z pour chaque gène, représentant la variation moyenne d'expression du gène et dépendant de la moyenne du niveau d'expression du gène (M) ainsi que la différence entre les moyennes des niveaux d'expression (D) (plus un gène sera exprimé, plus ces moyennes seront élevées).
3. Ensuite, le logiciel va calculer la valeur  $Z_0$  en faisant 1000 permutations parmi valeurs d'expression de tous les gènes d'un même *cluster* et calculant la valeur de Z pour chacun des gènes avec ces nouvelles valeurs d'expression. La valeur  $Z_0$  est considérée comme le degré de variation non-significatif.
4. Finalement, NOISeqBIO calcule la probabilité  $p(Z)$  que le Z du gène soit différent du  $Z_0$  calculé précédemment. Si la fonction  $1-p(Z)$  dépasse le seuil  $\alpha$  (ici, 0,95), alors le gène est considéré comme différentiellement exprimé, le facteur d'expression différentielle étant égal à la variation moyenne entre les deux conditions.

Ainsi, NOISeqBIO calcule la valeur du bruit de fond pour chaque groupe de gènes ( $Z_0$  pour chaque *cluster*) et calcule la probabilité que les gènes, dont l'expression semble varier, ne rentrent pas dans ce bruit de fond.

### 3.4. Interprétation des données

Notre interprétation des données a été faite grâce à la base de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), créée en 1995, cherchant à devenir une représentation informatique des systèmes biologiques, que ce soit d'une cellule, d'un organisme, ou d'un écosystème (Ogata *et al.*, 1999). KEGG permet de visualiser la somme de toutes les voies métaboliques d'un organisme, avec une profondeur allant jusqu'aux gènes et molécules. La base de données KEGG *Pathway* permet d'avoir un aperçu des différentes voies métaboliques d'un organisme. La cartographie des gènes exprimés différentiellement permet de voir

lesquelles de ces voies semblent régulées dans un sens ou dans l'autre, mais l'information reste surtout visuelle. Dans la base de données KEGG BRITE, les gènes sont triés selon leurs fonctions systémiques. De fait, certains gènes sont retrouvés dans diverses voies métaboliques, en particulier certaines enzymes-clés comme par exemple la pyruvate-kinase qui ne se retrouve dans pas moins de 8 voies métaboliques différentes, allant de la glycolyse à la synthèse d'antibiotiques. Lors de l'interprétation de l'expression différentielle de gènes dans un organisme, il est important de regarder, au-delà du gène en lui-même, sur quelles voies métaboliques sa variation d'expression semble avoir un impact. Finalement, même si les bases de données KEGG contiennent de nombreuses informations sur le génome et les voies métaboliques de *S. avermitilis*, un grand nombre de gènes n'ont pas pu être reconnus par KEGG, le plus souvent parce que leur fonction est encore inconnue, ou parce que la base de donnée KEGG BRITE n'a pas été mise à jour.

En parallèle de KEGG existe Gene Ontology (GO), projet bio-informatique visant à « *structurer la description des gènes, produits géniques et séquences dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces* » (Gene Ontology Consortium, 2004). La différence entre GO et KEGG vient de leur structure légèrement différente. Tandis que KEGG présente trois niveaux d'informations (Ontologie, famille de protéines, gène) pour chaque espèce, GO ne se base pas sur une espèce précise, et va décrire chaque gène selon sa fonction moléculaire, les processus biologiques dans lesquels il est impliqué, et sa localisation cellulaire. Nous saurons donc au final quelles fonctions et processus biologiques ont été affectés, mais sans avoir le détail des gènes. L'exemple de la phosphofructokinase chez *S. avermitilis*, présentant 3 homologues dans le génome et dont les rôles et régulations d'expression sont différents, ou encore les homologues des gènes codant pour la déshydrogénase des  $\alpha$ -cétoacides à chaînes ramifiées, montre que l'information sur les gènes peut être importante : là où KEGG nous a permis de savoir précisément quelle enzyme a été régulée parmi les homologues, GO n'aurait fait aucune distinction. De fait, l'utilisation de KEGG semble préférable lors de la comparaison d'un transcriptome impliquant la même espèce dans des conditions différentes, tandis que GO semble plus approprié pour des comparaisons entre différents organismes, ou environnements, où l'on recherche des fonctions ou processus biologiques généraux sans chercher à amener la précision jusqu'à des homologues de gènes précis.

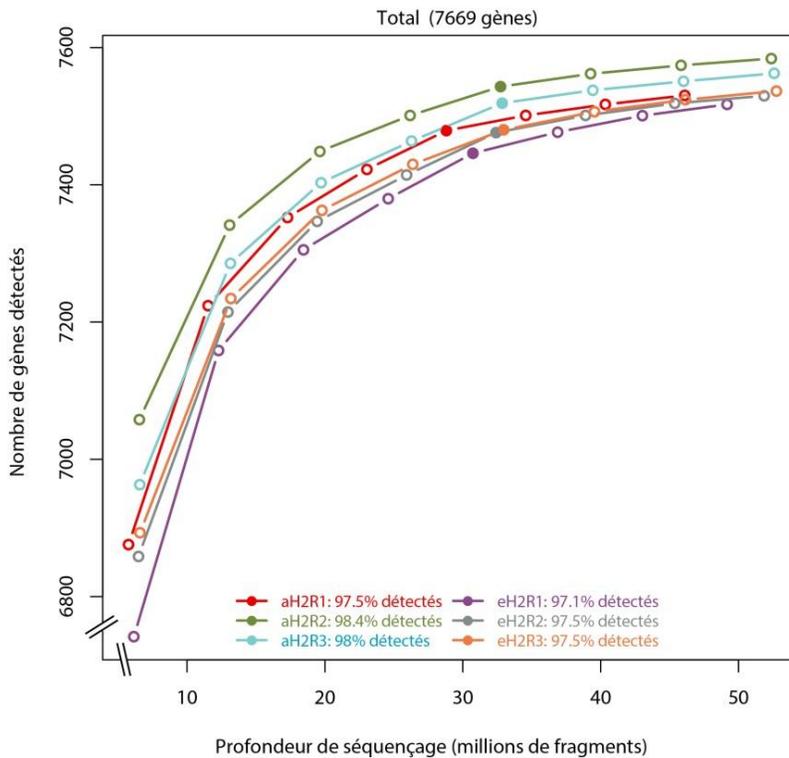
## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Résultats bruts d'extractions d'ARN et de séquençage

Des cultures confluentes sous forme de mycélium aérien de *S. avermitilis*, après 5 jours de croissance végétative statique dans un incubateur à 30°C, ont été exposées durant 48 h à un espace libre à phase dynamique constituée d'un mélange synthétique d'air avec 0,53 ou 500 ppmv d'H<sub>2</sub> (Fig. 6). Dans ces conditions, la différenciation du mycélium aérien en spores matures est censée s'achever dans les 24 heures (Flärdh & Buttner, 2009). La saturation de l'HHA de *S. avermitilis* avec 500 ppmv d'H<sub>2</sub> n'a pas exercé d'impact visible sur la différenciation du mycélium ou le phénotype de maturation de spores, caractérisé par une pigmentation d'un brun sombre. Les spores récupérées après 48h d'incubation ont été broyées, puis les ARN totaux extraits à l'aide d'une méthode au phénol/chloroforme, puis précipités à l'aide d'acétate de sodium. Les rendements d'extraction d'ARN ont été de 416 ±191 et 413 ±102 ng µl<sup>-1</sup> pour les traitements à basse et haute concentrations d'H<sub>2</sub>, respectivement.

Six banques de séquences indépendantes (3 réplicas × 2 traitements d'H<sub>2</sub>) ont été utilisées pour l'analyse transcriptomique. Au total, 92 ±6% des séquences ont été alignées avec succès sur le génome de *S. avermitilis*, avec 46 ±2% alignées sur des gènes « sens » codants pour des protéines, 2 ±0,4% sur les gènes « anti-sens » de protéines connues, 33 ±3% sur des ARN divers, et 18 ±1% sur des régions non annotées. L'analyse de l'expression différentielle a été menée à l'aide du progiciel NOIseqBIO. Néanmoins, notre premier séquençage ne comprenant aucun réplica, NOISeq-sim a pu être utilisé, générant d'une part la courbe de raréfaction des données, permettant d'estimer la profondeur de séquençage nécessaire pour nos réplicas suivants, et d'autre part fournissant des données préliminaires permettant de supposer les possibles résultats d'une expérience avec réplicas biologiques indépendants, et donc d'étudier la littérature en conséquence, en l'attente des réplicas suivants. La profondeur de séquençage était suffisante, tel que le montre la courbe de raréfaction, atteignant un plateau à environ 25 millions de séquences (Fig. 7) et la détection des transcrits de plus de 97% des 7669 gènes annotés pour chaque librairie. Au total, 1293 gènes étaient exprimés de manière différentielle, soit 17% des gènes annotés. Parmi les 1293 gènes différentiellement exprimés entre nos deux conditions, 87% (1126) étaient sous-exprimés et 13% (167) sur-exprimés, en présence d'une concentration d'H<sub>2</sub> élevée.

Figure 7 : Evaluation de la profondeur de séquençage de l'analyse transcriptomique.



Les courbes de raréfaction ont été calculées avec la fonction "explo.plot" implémentée dans le package NOISeq. Les points pleins représentent le nombre réel de séquences dans chaque échantillon, tandis que les points vides sont simulés par NOISeq. Le plateau a été atteint, amenant la détection d'au moins 97,1% des gènes connus de *S. avermitilis*.

#### 4.2. L'expositions à différentes concentrations d'H<sub>2</sub> n'influe pas la différenciation cellulaire

Dans le but de confirmer l'absence d'impact de l'H<sub>2</sub> sur la différenciation des spores, nous avons analysés quatre catégories de gènes, impliqués dans la germination des spores, la transition du mycélium de substrat, la sporulation précoce et la maturation des spores. Ceux-ci ne montrent pas d'expression différentielle (Tableau 4), à l'exception d'un groupe de gènes hypothétiques *bldA2*, *-B2*, *-C2*, *-D2*, et *-E2*, codant pour un importateur d'oligopéptides qui serait potentiellement impliqué dans la différenciation cellulaire. Cette observation confirme que la biomasse récoltée était dans chaque condition au même stade de développement, et que l'analyse des profils transcriptomiques est représentative de spores matures.

**Tableau 4 : Absence d'expression différentielle de gènes impliqués dans quatre stades de développement des streptomycètes.**

Gènes	Catégorie	Expr. Diff.	Description
SAV_5455 ( <i>mreB1</i> ) SAV_5456 ( <i>mreC</i> ) SAV_5457( <i>mreD</i> )	1	non	MreB est un homologue de l'actine censé former les filaments cytosquelettiques dans la membrane cytoplasmique.
SAV_6861 ( <i>bldD</i> ) SAV_2529 ( <i>bldD</i> )	2	non	BldD agit comme répresseur de quelques gènes connus impliqués dans la régulation du développement : <i>bldN/M</i> , <i>whiG</i> et <i>sigF</i> , chez <i>S. coelicolor</i>
SAV_4130 ( <i>bldC</i> )	2	non	Le gène <i>bldC</i> encode un facteur de transcription de la famille MerR, conditionnellement requis lors de la formation du mycélium aérien.
SAV_3150 ( <i>bldKA1</i> ) SAV_3151 ( <i>bldKB1</i> ) SAV_3152 ( <i>bldKC1</i> ) SAV_3153 ( <i>bldKD1</i> ) SAV_3154 ( <i>bldKE1</i> )	2	non	Le gène <i>bldK</i> code pour un importateur d'oligopeptides potentiellement impliqué dans la différenciation cellulaire.
SAV_3172 ( <i>bldKE2</i> ) SAV_3173 ( <i>bldKD2</i> ) SAV_3174 ( <i>bldKC2</i> ) SAV_3175 ( <i>bldKB2</i> ) SAV_3176 ( <i>bldKA2</i> )	2	oui (0,64) oui (0,66) oui (0,60) oui (0,57) oui (0,71)	Le gène <i>bldK</i> encode pour un importateur d'oligopeptides potentiellement impliqué dans la différenciation cellulaire.
SAV_4185 ( <i>sigF</i> )	3	non	Le facteur SigF de l'ARN polymérase contrôle le développement tardif durant la sporulation.
SAV_2630 ( <i>whiG</i> )	4	non	Le gène <i>whiG</i> code pour un facteur sigma de l'ARN polymérase et pourrait être un régulateur clef du passage entre hyphes aériens et sporulation.
SAV_2684 ( <i>hupB</i> ) SAV_5127 ( <i>HU1</i> )	4	non	Les protéines HU contribuent à la compaction de la chromatine dans les spores et sont requises pour la résistance des spores à la chaleur.
SAV_4331 ( <i>whiP</i> )	4	non	WhiP influence la coordination de l'extension et la septation des hyphes aériens, possiblement en inhibant la division cellulaire avant le moment adéquat.
SAV_4997 (put. <i>whiB</i> )	4	non	Le rôle métabolique des protéines Wbl est controversé : potentiellement facteurs de transcription ou bien disulphide réductases.
SAV_6294 ( <i>whiA</i> )	4	non	WhiA constitue, avec WhiB, une voie métabolique indépendante de WhiG qui contrôle la sporulation dans les hyphes aériens.
SAV_2445 ( <i>whiH</i> )	4	non	Les mutants WhiH voient une réduction de la pigmentation de leurs spores et produisent majoritairement des hyphes non-différenciés.

Les gènes classés en quatre catégories englobent (1) la germination des spores, (2) la transition en mycélium aérien, (3) la sporulation précoce et (4) la maturation des spores (Flårdh & Buttner, 2009, Keith, 1998). L'expression différentielle a été calculée avec le progiciel NOISeqBIO.

#### **4.3. L'exposition au H<sub>2</sub> n'entraîne pas d'expression différentielle des gènes impliqués dans la synthèse ou la maturation des HHA**

L'analyse statistique des données transcriptomique a révélé qu'aucun des gènes codant pour les protéines structurales ou auxiliaires de l'HHA n'ont été différentiellement exprimés lors de l'exposition à 500 ppmv d'H<sub>2</sub> (eH<sub>2</sub>) (Fig. 9). Cette observation est en accord avec l'absence d'hydrogénase régulatrice (HR) dans le génome de *S. avermitilis* (Ikeda et al., 2003). Cette absence de régulation peut être expliquée par l'ubiquité de l'H<sub>2</sub> dans l'environnement de la bactérie : le seuil inférieur de concentration d'H<sub>2</sub> en dessous duquel l'HHA de *S. avermitilis* cesse d'être active est inférieur à 100 ppbv (Constant et al., 2010), largement en dessous des 530 ppbv que l'on retrouve dans la troposphère, ou les 20 000 ppmv autour des nodules racinaires des légumineuses fixant le N<sub>2</sub>. Ceci contraste avec les autres hydrogénases des bactéries *knallgas* comme *R. eutropha* dont le seuil d'activité, atteint aux alentours de 800 ppbv, ne permet pas l'oxydation de l'H<sub>2</sub> atmosphérique (Conrad et al., 1983). Ces microorganismes bénéficient de l'H<sub>2</sub> généré par les nodules racinaires pour la croissance chimolithotrophique ou mixotrophique et utilisent des HR pour activer l'expression des HO en fonction de la biodisponibilité du substrat (Lenz et al., 2002, Lenz & Friedrich, 1998). En plus de la régulation par les HR, l'expression des gènes des HO peut être réprimée chez certaines espèces en présence de certains substrats, comme le glucose (Friedrich, 1982). Dans le cas de *S. avermitilis*, l'expression de l'HHA semble déclenchée lors de la sporulation, lorsque les sources d'énergies carbonées sont présentes en trop faibles concentrations pour soutenir la croissance du mycélium, déclenchant alors une réponse stringente (Constant et al., 2010, Constant et al., 2008). Malgré l'absence d'expression différentielle des sous-unités de l'HHA, un sidérophore (*sidABCD*) et son transporteur (*sidEF*) sont surexprimés dans la condition eH<sub>2</sub>, ce qui pourrait faciliter la maturation de l'enzyme, le site actif de la grande sous-unité et les centres Fer-Soufre de la petite sous-unité, transportant les électrons, requérant du fer (Fig. 10).

#### **4.4. L'exposition au H<sub>2</sub> entraîne de nombreuses variations dans l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions métaboliques**

Les gènes présentant une expression différentielle significative en réponse à l'exposition à l'H<sub>2</sub> ont été classés en catégories métaboliques regroupant des gènes orthologues selon KEGG (KO) (Fig. 8). Parmi les différentes grandes fonctions métaboliques proposées par KEGG, dix-sept ont été particulièrement affectées lors de l'exposition à l'H<sub>2</sub>. Parmi ces catégories, les transporteurs membranaires, la sécrétion de protéines, le métabolisme central du carbone, le

stress cellulaire et la biosynthèse de métabolites secondaires étaient les plus biologiquement pertinentes, car elles tendraient à montrer une autosuffisance inattendue des spores basée sur l'HHa en présence de concentrations saturantes d'H<sub>2</sub>.

#### **4.5. L'exposition à l'H<sub>2</sub> provoque la sous-expression des enzymes responsables de l'absorption des nutriments**

##### *Sécrétion*

Les catégories KO (*KEGG Orthology*) « repliement, maturation et dégradation des protéines » ainsi que la catégorie englobant les transporteurs membranaires sont celles qui présentent la réponse la plus importante à l'H<sub>2</sub> en termes de proportion de gènes affectés. Pas moins de 25% des gènes de la première catégorie montrent une sous-expression, ceci principalement dû à la diminution de l'expression des gènes de la voie de sécrétion générale Sec (Fig. 10). Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des macromolécules récalcitrantes très présentes dans le sol (e.g. cellulose, xylanes) en molécules plus petites, plus simples et surtout importables via les transporteurs membranaires, possèdent un peptide signal leur permettant d'être prises en charge et excrétées par le système Sec. Chez *S. avermitilis*, 10 gènes sont impliqués dans le système d'exportation Sec, incluant deux homologues du gène *secA*. Parmi ces gènes, les deux homologues *secA* (ATPase fournissant l'énergie au complexe de transport pour la translocation), *secGY* (deux des trois gènes codant pour le canal de transport), et *secDF* (codant pour des protéines liées au canal, intervenant probablement lors des derniers stades du transport), sont sous-exprimés dans la condition eH<sub>2</sub> (Fig. 10). Une réponse similaire a été observée dans le cas de *M. smegmatis*, qui surexprime ce système de transport lors de l'inactivation de son HHA (Greening *et al.*, 2014b). Par contre, l'expression des gènes encodant pour le système de sécrétion TAT (*Twin Arginine Transporter*), reconnaissant une séquence peptidique signal spécifique, n'a pas été affectée par l'exposition à l'H<sub>2</sub>.

##### *Transporteurs de nutriments*

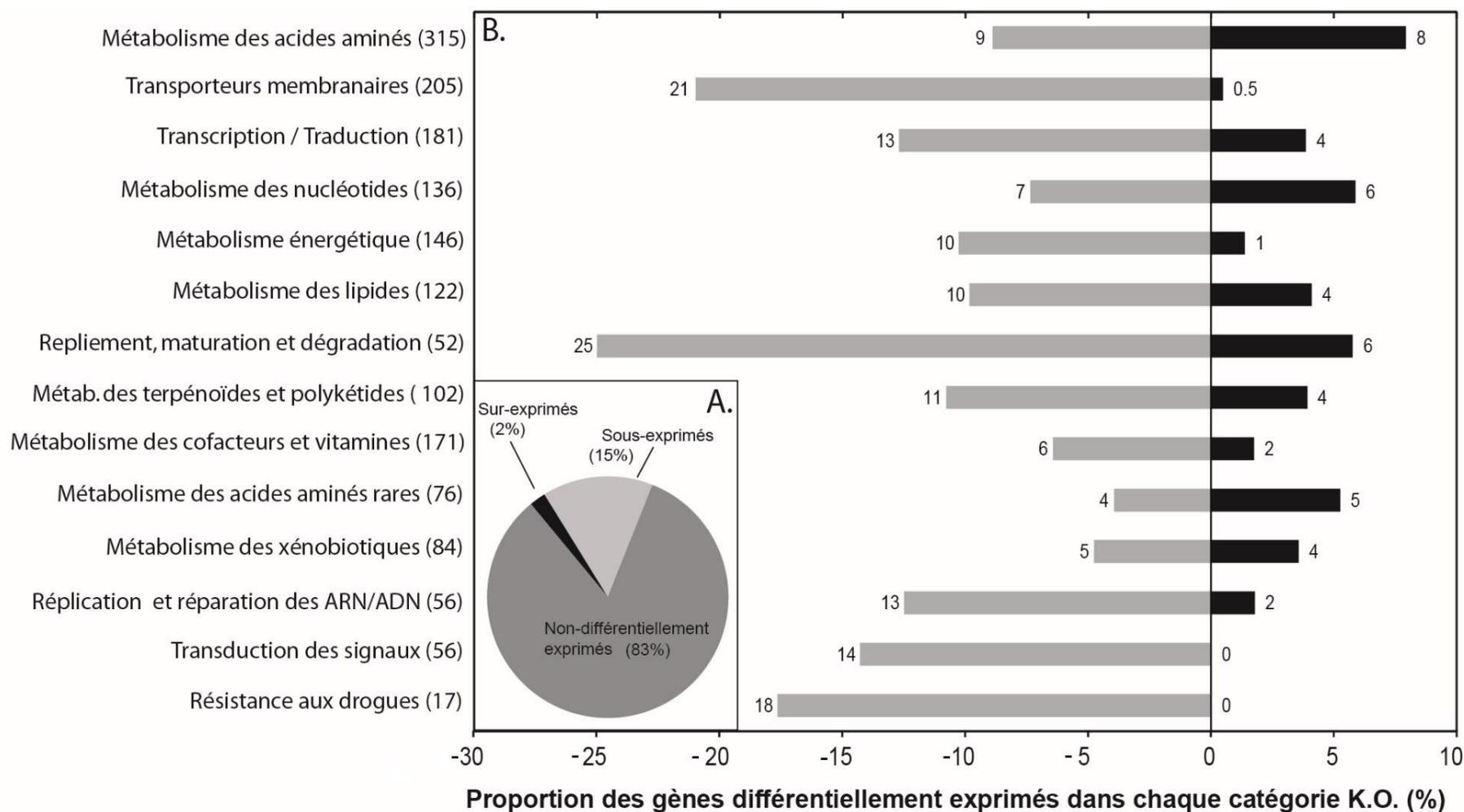
En parallèle du système de sécrétion Sec, les gènes codant pour les systèmes d'import de nutriments, et en particulier les transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*), ont été globalement sous-exprimés en présence d'une concentration élevée de H<sub>2</sub>. Les *Streptomyces* sont connus pour avoir une large variété de perméases (e.g. 53 chez *S. coelicolor*, et 91 chez *S. avermitilis*), *S. avermitilis* tenant le record du plus grand nombre de transporteurs ABC dans un génome avec au moins 202 gènes impliqués, représentant la plus large catégorie KO dans cette bactérie (Ikeda *et al.*, 2003). Au total, 21% (43 gènes sur 202)

des transporteurs ont été exprimés différemment. Seule exception, le transporteur de sidérophores inclus dans l'opéron *sidABCDEF*, a été surexprimé dans cette catégorie (Ueki *et al.*, 2009). Les autres transporteurs, tous sous-exprimés, sont impliqués dans l'import des sucres, des acides aminés ramifiés, des polyols et des oligopeptides. Le schéma général de ces régulations suggère une sous-expression des gènes codants pour les protéines responsables de la prospection, l'hydrolyse et l'importation des nutriments dans les spores, lorsque l'H<sub>2</sub> est largement disponible, présumément parce que ce dernier est suffisamment abondant pour les remplacer d'un point de vue énergétique.

#### **4.6. L'exposition à l'H<sub>2</sub> influence de nombreuses voies métaboliques des acides aminés**

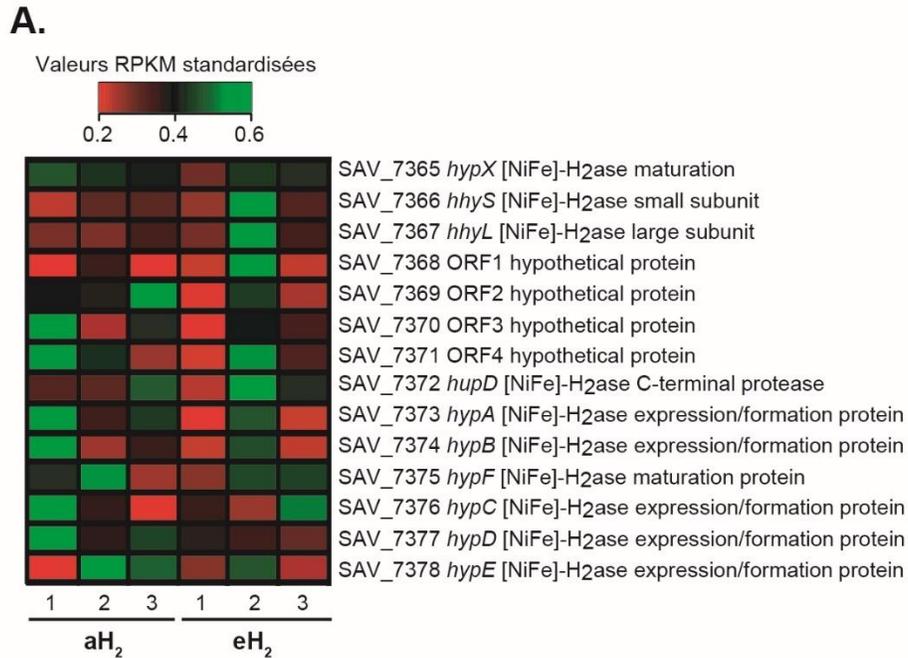
De toutes les catégories de gènes, celle avec le plus grand nombre absolu de gènes exprimés différemment concerne la synthèse et la dégradation des acides aminés (Fig. 8). Les gènes des enzymes impliqués dans les voies de synthèse des acides aminés glutamate, glutamine, lysine, leucine, aspartate et serine sont sous-exprimés, tandis que ceux impliqués dans les voies responsables de la dégradation des tyrosine, alanine, cystéine et phénylalanine semblent se renforcer, avec pour seule exception la voie de synthèse de l'arginine, dont tous les gènes sont surexprimés. Les acides aminés peuvent être impliqués dans une large gamme de réactions, allant de la synthèse protéique au cycle des acides tricarboxyliques (TCA) en passant par la synthèse de métabolites secondaires. Au sein du cycle TCA, l'acide aspartique peut être converti en oxaloacétate, les tyrosines et phénylalanine en fumarate, l'arginine, glutamate et glutamine en  $\alpha$ -cétoglutarate, les alanine, cystéine, et sérine en pyruvate, et finalement les leucine, lysine, tyrosine et phénylalanine en acétoacétate, précurseur de l'acétyl-Coa (Berg *et al.*, 2002). Nos données ne nous permettent pas de déduire le devenir des acides aminés dans la cellule, mais la baisse de synthèse couplée à l'augmentation du catabolisme des acides aminés mènerait à un épuisement en acides aminés, ce phénomène pouvant être lié à une plus faible synthèse protéique et un ralentissement du cycle TCA. Il est à noter que l'étude de Greening *et al.* (2014) sur un mutant de *M. smegmatis* pour son HHA montre, grâce à une étude métabolomique, une augmentation de la concentration en acides aminés cellulaires en absence de l'hydrogénase.

Figure 8 : Impact de l'exposition au H<sub>2</sub> sur le transcriptome des spores de *S. avermitilis*.



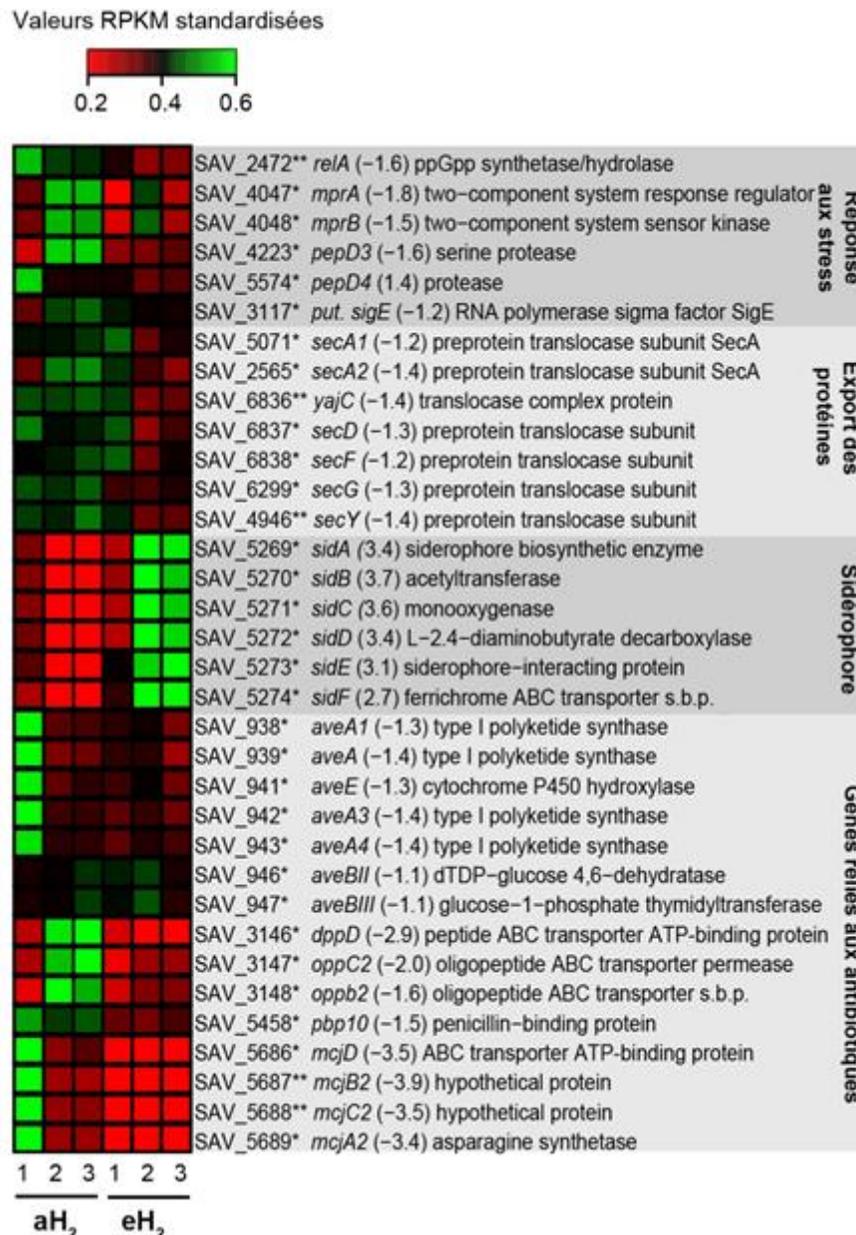
(A) Proportion des gènes montrant soit une baisse, une hausse, ou aucune différence d'expression dans la condition eH<sub>2</sub>. (B) Proportion en pourcentage des gènes exprimés différentiellement (gris : sous-exprimés, noir : sur-exprimés) dans chaque catégorie KEGG. Le nombre total de gènes exprimés différentiellement est visible entre parenthèses. L'expression différentielle a été calculée avec NOISeqBIO.

Figure 9 : Expression de l'opéron de l'HHA de *S. avermitilis*.



(A) La thermocarte représente l'expression standardisée (en RPKM) des gènes encodant pour les gènes structuraux et auxiliaires, ainsi que les 4 ORFs inconnus 1 à 4. Aucun d'eux ne présente de variation d'expression statistiquement significative en réponse au traitement eH<sub>2</sub>. (B) Les gènes encodant pour les sous-unités structurales et auxiliaires de l'HHA sont constitués en 3 opérons selon les prédictions de Rockhopper. Les couleurs rouges et vertes représentent des niveaux de sous- et sur-expression (respectivement) des gènes au sein des spores dans la condition eH<sub>2</sub>. La liste des gènes exprimés différemment cités dans cette étude est disponible dans le Tableau A1 en annexe.

Figure 10 : Sélection de gènes codant pour la réponse au stress, l'export de protéines, un sidérophore, et les gènes liés aux antibiotiques (production et défense), dont l'expression est significativement différente en présence d'une faible vs une haute concentration d'H<sub>2</sub>.



Les couleurs rouges et vertes représentent des niveaux de sous- et sur-expression (respectivement) des gènes au sein des spores dans la condition eH<sub>2</sub>. Le nom des gènes dans KEGG est suivi par leur rapport d'expression (eH<sub>2</sub> / aH<sub>2</sub>) et leur annotation fonctionnelle. L'astérisque représente la p-valeur calculée par NOISeqBIO ou « \* » signifie p ≥ 0,95 et « \*\* » p ≥ 0,99. L'abréviation « s.b.p. » signifie « substrate binding protein ». La liste des gènes exprimés différemment cités dans cette étude est disponible dans le Tableau A1 en annexe.

#### 4.7. Influence de l'exposition à l'H<sub>2</sub> sur le métabolisme primaire du carbone et le métabolisme énergétique

Le génome de *S. avermitilis* possède quatre voies métaboliques énergétiques primaires : la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie du pyruvate, la voie des pentoses phosphates et le cycle TCA (Wu *et al.*, 2005). Au contraire des autres voies, la voie des pentoses phosphates est principalement utilisée lors des phases de croissance en présence de glucose ou de gluconate (Gunnarsson *et al.*, 2004) et non dans les phases de dormance, on ne s'attendait donc pas à y voir une régulation différentielle. Par contre, l'exposition à l'eH<sub>2</sub> a significativement influencé les gènes de la voie EMP et du cycle TCA (Fig. 11). La voie EMP transforme le glucose en pyruvate et en énergie sous forme d'ATP et de NADH. Cette voie partage 7 enzymes avec la voie de la néoglucogenèse. L'activité de certaines enzymes clés (non-partagées entre les deux voies) peuvent indiquer si le catabolisme (via la voie EMP) ou l'anabolisme (via la néoglucogenèse) est favorisé au sein de la cellule. Par exemple, la phosphofructokinase (Pfk) catalyse la conversion en sens unique du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. Cette réaction unidirectionnelle nécessitant de l'ATP est une étape limitante dans la voie EMP (Berg *et al.*, 2002). La réaction inverse est catalysée par la fructose-1,6-biphosphatase (GlpX), enzyme de la néoglucogenèse. Chez *S. avermitilis*, on retrouve exceptionnellement trois homologues de la Pfk, codées par les gènes *pfkA1* -A2 et -A3, *pfkA2* conférant l'activité majeure dans la voie EMP, les deux autres semblant avoir des rôles plus spécifiques à des stades de développement précis (Hesketh *et al.*, 2002). En présence d'eH<sub>2</sub>, la *pfkA2* est sous-exprimée, tandis que *glpX* est surexprimée (Fig. 11). Même si la Pfk est sujette à une régulation allostérique (Fenton *et al.*, 2003), cette observation suggère un débalancement en faveur de la néoglucogenèse plutôt que la glycolyse dans les spores exposée à l'eH<sub>2</sub>.

A la fin de la voie EMP, le pyruvate est converti en acétyl-CoA, mais ce dernier peut aussi être produit via le catabolisme des acides aminés ramifiés. Justement, dans la condition eH<sub>2</sub>, le complexe de la déshydrogénase des  $\alpha$ -céto-acides à chaînes ramifiées est surexprimé, suggérant que le catabolisme de la leucine, la valine et l'isoleucine a été favorisé dans le sens de la production d'acétyl-CoA, pour alimenter à la fois le cycle TCA et la voie de biosynthèse des acides gras. Communément, le complexe de la déshydrogénase des  $\alpha$ -céto-acides ramifiés peut permettre d'alimenter les voies de biosynthèse des polykétides, mais il existe chez *S. avermitilis* deux homologues de ce complexe : celui codé par les gènes *bkcFGH* est impliqué dans la synthèse des polykétides, au contraire de celui encodé par *bkcABC*. Ce dernier est

celui dont les gènes sont surexprimés, ce qui suggérerait que l'acétyl-CoA ne serait pas destiné 1préférentiellement à la synthèse des polykétides (Denoya *et al.*, 1995) (Fig. 12 A), ce résultat appuyant nos données dans un paragraphe suivant.

### *Métabolisme énergétique*

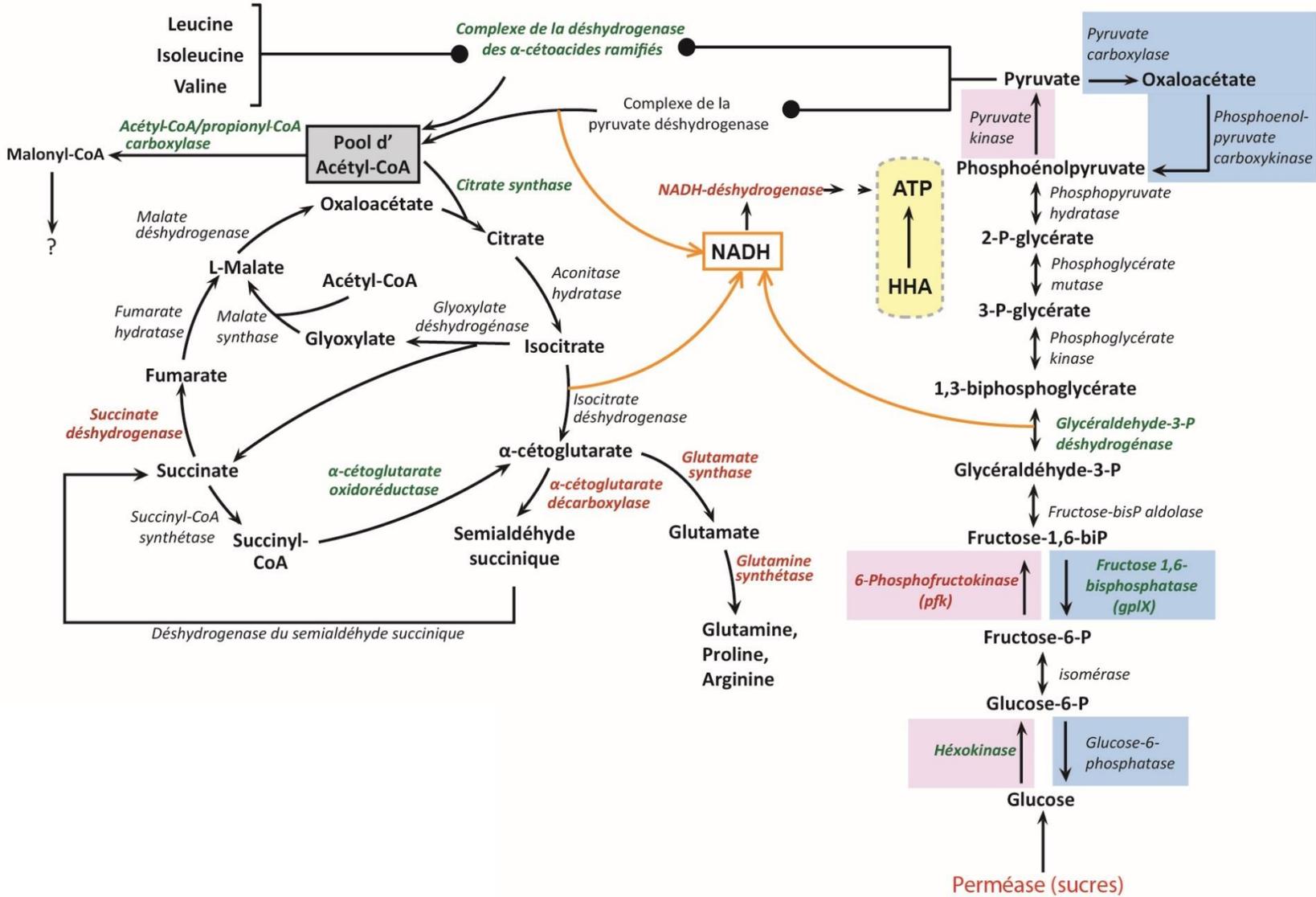
Le métabolisme central de *S. avermitilis* est caractérisé par un TCA alternatif, où les voies oxydative et réductrice diffèrent par deux enzymes : l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase canonique est absente, remplacée par deux enzymes : l' $\alpha$ -cétoglutarate décarboxylase (Kgd) et la semialdéhyde succinique déshydrogénase (Ssd). Ces enzymes faisant le lien entre la voie réductrice et oxydative ont été originellement identifiées et biochimiquement caractérisées chez *M. tuberculosis* (Tian *et al.*, 2005). La réaction inverse, dans le sens de la réduction, est catalysée par l' $\alpha$ -cétoglutarate oxydoréductase (Kgor). Tandis que l'expression de la Kgd est 1sous-réglée en présence d'eH<sub>2</sub>, l'expression de Kgor montre le schéma inverse (Fig. 12). Combiné avec la baisse d'expression de la succinate déshydrogénase, de la glutamate synthase et de la glutamine synthétase, ces observations suggèrent que la voie de dérivation via le glyoxylate a été favorisée lors de l'exposition à l'eH<sub>2</sub>. Cette dernière voie est responsable des réactions anapleurotiques, reconstituant les intermédiaires du cycle TCA, permettant la croissance en présence d'acides gras et/ou d'acétate. Par contre, le profil transcriptomique ne montrait aucune variation d'expression claire dans les gènes impliqués dans la synthèse ou la conservation des lipides. Cela dit, mis à part une documentation fournie concernant la déplétion en glycogène et l'accumulation du tréhalose durant la sporogénèse, très peu de choses sont connues sur le métabolisme des spores (Brana *et al.*, 1986, Rueda *et al.*, 2001). Effectivement, les études intensives sur les *Streptomyces* concernent très majoritairement le métabolisme au stade de différenciation en mycélium aérien, où sont synthétisés en grande quantité les nombreux antibiotiques produits par ce genre bactérien, au contraire des spores. Nos données transcriptomiques suggèrent que le métabolisme énergétique des spores serait alimenté par des réserves internes d'énergie ainsi que des sources exogènes de carbone, mais de plus amples investigations impliquant la métabolomique seront nécessaires pour déterminer la distribution des flux de carbone et le métabolisme général au sein des spores.

### *Chaîne respiratoire*

En plus de générer de l'ATP, la voie EMP et le cycle TCA génèrent du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH), utilisé comme transporteur d'électron alimentant la chaîne respiratoire à travers la NADH déshydrogénase. Dans la condition eH<sub>2</sub>, 10 des 28 gènes codant pour les sous-unités de la NADH déshydrogénase étaient sous-exprimés. Même si l'accepteur

d'électrons physiologique de l'HHA est encore inconnu, la sous-expression des gènes de cette enzyme suggère que l'HHA participe à la génération de la force protomotrice nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase, produisant de l'ATP. Chez *M. smegmatis*, la délétion des gènes structuraux de l'HHA n'a pas entraîné de variation significative dans l'expression de la NADH déshydrogénase. Cela dit, l'observation de l'activité HHA dans la fraction membranaire (Greening *et al.*, 2014a, Greening *et al.*, 2014b) est un argument supplémentaire en faveur d'un lien entre HHA et chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP.

A.



## B.

Valeurs RPKM standardisées

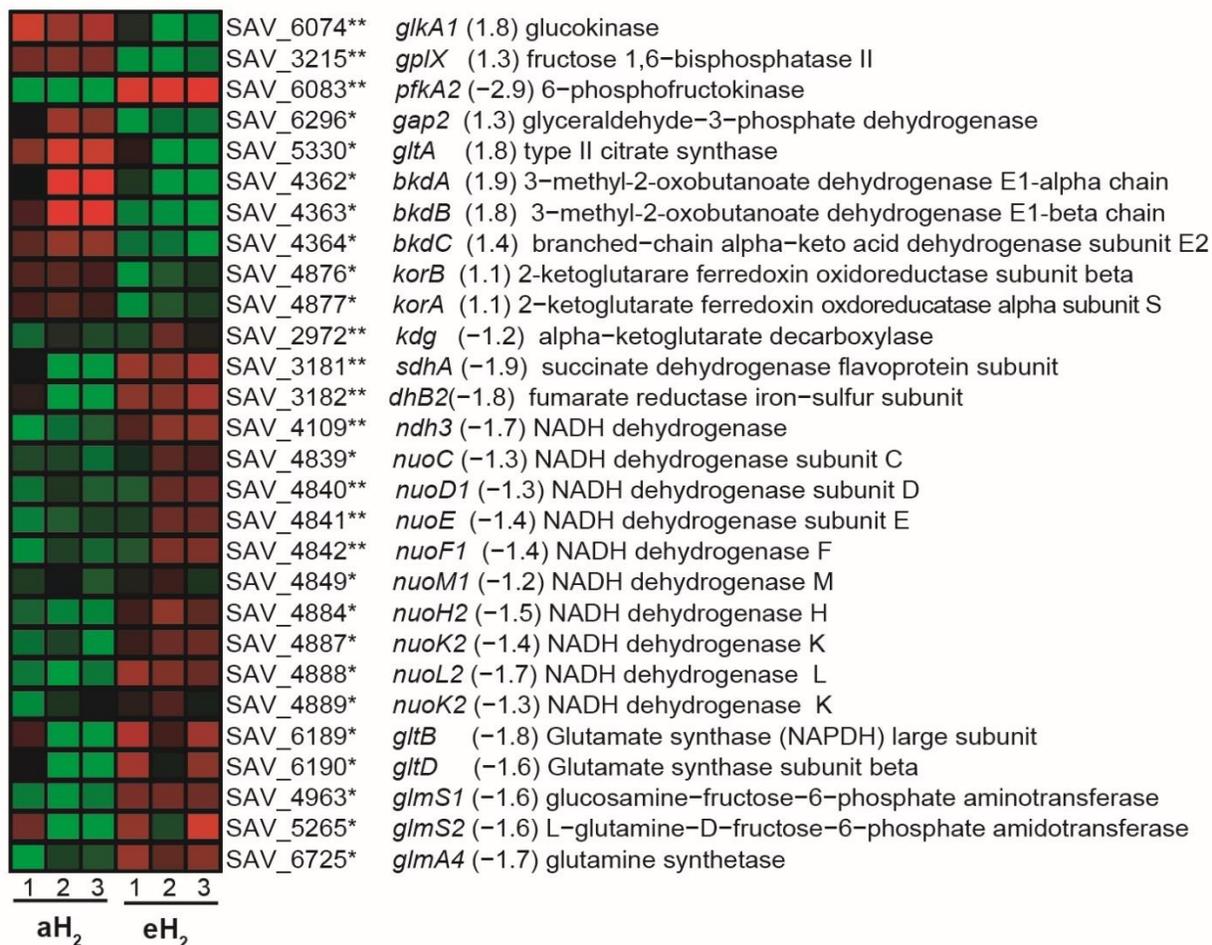
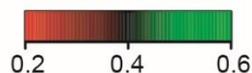


Figure 11 : Expression altérée des voies métaboliques énergétiques et glucidiques dans les spores de *S. avermitilis* en réponse à la condition eH<sub>2</sub>.

(A) Expression différentielle des gènes de la voie EMP, du cycle TCA, et de la NADH déshydrogénase. En rouge et vert sont représentés les gènes sous- et sur-exprimés (respectivement) dans la condition eH<sub>2</sub>. Les flèches orange représentent les sources de NADH. Les gènes mis en évidence sur fond bleu sont spécifiques à la gluconéogénèse, ceux sur fond rouge spécifiques à la glycolyse. L'HHA, sur fond jaune, montre son rôle potentiel dans la génération d'ATP au sein de la spore. (B) La thermocarte montre les niveaux d'expression des gènes présentés en (A), où rouge et vert représentent les gènes sous- et sur-exprimés (respectivement) dans la condition eH<sub>2</sub>. Le nom des gènes est suivi par le rapport d'expression (eH<sub>2</sub> / aH<sub>2</sub>) ainsi que l'annotation fonctionnelle. L'astérisque représente la p-valeur calculée par NOISeqBIO ou « \* » signifie p ≥ 0,95 et « \*\* » p ≥ 0,99. L'abréviation « s.b.p. » signifie « substrate binding protein ». La liste des gènes exprimés différentiellement cités dans cette étude peut être retrouvée dans le Tableau A1.

#### 4.8. L'exposition à des concentrations élevées en H<sub>2</sub> abaisse le stress cellulaire

##### *Réponse stringente*

Durant la traduction des ARNm en protéines, un déficit en nutriments mène à la création d'ARNt désacétylés, qui, lorsqu'ils lient le site A du ribosome, bloquent ce dernier. Cette interaction provoque une réponse stringente induite par la protéine RelA (encodée par le gène *relA*), enzyme synthétisant l'alarmone pléiotropique (p)ppGpp (guanosine (penta)tétraphosphate). Cette alarmone change l'affinité de l'ARN polymérase pour certains promoteurs (incluant des ribosomes), enclenchant l'expression de ceux impliqués dans la réponse au stress (Hauryliuk *et al.*, 2015). Dans le cas des *Streptomyces*, cette molécule indique l'état de famine, induisant la différenciation cellulaire accompagnée par la production de métabolites secondaires (Hoyt & Jones, 1999, Kang *et al.*, 1998). Les spores exposées à de hautes concentrations en H<sub>2</sub> ont démontré une diminution de l'expression du gène *relA* (Fig. 10). Cette observation, corrélée à nos résultats présentés précédemment, appuie l'hypothèse d'une autosuffisance énergétique en présence d'H<sub>2</sub>.

##### *Résistance et synthèse d'antibiotiques*

Le ppGpp est connu pour influencer positivement de nombreuses voies de réponse au stress, comme la synthèse d'antibiotiques ou des facteurs impliqués dans la réparation de la membrane, de l'ADN, etc. (Chakraborty & Bibb, 1997, Gatewood & Jones, 2010, Hauryliuk *et al.*, 2015). Une plus faible concentration de ppGpp dans la cellule pourrait expliquer la sous-expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des polykétides (7 gènes), des gènes liés à l'activité bêta-lactamase (3 gènes) et des gènes impliqués dans la biosynthèse d'un peptide antimicrobien de la famille des microcines. Contrairement aux bactériocines, grosses protéines de 20 kDa environ et principalement produites lors des phases de croissance, les microcines ont un poids moléculaire inférieur à 10 kDa, et sont connues pour être exprimées lors des phases de dormance (Veselovskii *et al.*, 2004). Le ppGpp pouvant aussi moduler les autres formes de réponse au stress de la cellule, il pourrait être lié à la baisse d'expression de plusieurs autres gènes. Par exemple, le facteur sigma  $\sigma^E$  et les gènes *mprAB*, codant potentiellement pour un système de détection du stress (transduction des signaux), ou la protéase codée par *pepD*, exprimée lors de la perte d'intégrité de la membrane en réponse à des attaques externes (White *et al.*, 2010). Finalement, la baisse d'expression des gènes des voies de synthèse de certains acides aminés, et l'augmentation de ceux impliqués dans leur catabolisme, pourrait aussi être reliées à la persistance en affaiblissant, entre autre, l'impact de certains antibiotiques sur la cellule (Fung *et al.*, 2010).

## Récapitulatif

Tous ces éléments mènent à penser que l'énergie fournie par l'HHA lors d'une exposition constante à de hautes concentrations en H<sub>2</sub> abaisse la dépendance au milieu extérieur, ceci entraînant une réduction du stress lié au manque de nutriments via la réponse stringente, avec pour effet collatéral une atténuation de l'expression de *relA* et des gènes liés à la biosynthèse des métabolites secondaires.

## 4.9. Synthèse

Dans la littérature, les transcriptomes impliquant des *Streptomyces* ciblent toujours les mêmes phases de développement, soit le mycélium aérien ou végétatif (Yagüe *et al.*, 2013), parfois le mycélium de germination, mais jamais les spores en dormance, à cause d'un intérêt biotechnologique moindre. Chez les autres espèces bactériennes, les spores les plus étudiées sont de loin celles du genre *Bacillus*, où l'on retrouve des transcriptomes de spores en germination, mais pas de spores en dormance, celle-ci étant souvent considérées comme inertes métaboliquement. Néanmoins, ce dogme commence à évoluer depuis peu (Segev *et al.*, 2012). Les spores de ce dernier genre sont principalement vouées à la survie dans des conditions extrêmes de température, pression, rayonnement et dessiccation. Au contraire, les spores des *Streptomyces* ont pour rôle d'aider à la dispersion et à la dormance. Ainsi, notre transcriptome de spores de *S. avermitilis* en dormance est le premier de son genre, et a permis de mettre en lumière la présence d'un métabolisme énergétique et secondaire actif et régulé. L'absence d'autres transcriptomes de spores en dormance ne permet malheureusement pas de comparer nos résultats avec ceux d'autres espèces sporulantes, mais ils pourront à l'avenir servir de référence pour toute autre étude transcriptomique de spores bactériennes.

Dans un sol, l'augmentation de l'H<sub>2</sub> de 0,53 ppmv à 500 ppmv permettrait de soutenir une population de *Streptomyces* 30 fois plus importante, passant de  $2,3 \times 10^7$  à  $6,9 \times 10^8$  bactéries par g de sol (Conrad, 1996, Tjihuis *et al.*, 1993). Dans le cas d'une population équivalente comme sur nos géloses, on peut considérer que l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub> va procurer 30 fois plus d'énergie aux spores présentes. L'étude du transcriptome des spores de *S. avermitilis* exposées à différentes concentrations d'H<sub>2</sub> montre effectivement un impact majeur sur l'expression des gènes du métabolisme primaire autant que secondaire. Pris dans leur globalité, ces résultats suggèrent que plus le H<sub>2</sub> est disponible, plus la cellule va réduire sa dépendance aux nutriments extérieurs. Effectivement, l'utilisation d'une seule protéine produisant de l'énergie en oxydant une molécule très simple et ubiquitaire, plutôt que de

nombreuses protéines convertissant de multiples nutriments complexes en énergie, pourrait être une stratégie efficace dans le but de réduire les dépenses énergétiques comme la synthèse protéique (consommant énergie et acides aminés) tout en fournissant assez d'énergie pour maintenir le métabolisme minimal. L'énergie amenée par l'HHA mènerait donc à une baisse d'interaction avec le milieu extérieur.

En parallèle, la baisse de la réponse stringente amène une sous-expression des gènes liés à la biosynthèse des métabolites secondaires tout comme ceux impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Ces variations dans le métabolisme secondaire tout comme la baisse de prospection des nutriments pourraient modifier à plus ou moins grande échelle les interactions entre les bactéries du sol ainsi que la stabilité à long terme du microbiota, selon l'abondance des bactéries exprimant ces HHA, le rôle physiologique de l'hydrogénase chez celles-ci, et plus globalement l'écophysiologie de ces bactéries.

Il est essentiel de rappeler que toutes ces hypothèses sont à prendre au conditionnel à cause des limites de l'analyse transcriptomique :

1. Il existe une différence entre transcriptome, protéome, et métabolome
2. Parmi les gènes exprimés différemment, la majorité sont des gènes de fonction inconnue
3. L'interprétation devient facilement spéculative, en particulier concernant les gènes impliqués dans la synthèse et le métabolisme des acides aminés dont l'implication reste floue.

De fait, pour confirmer la viabilité de notre hypothèse (*i.e.* l'implication de l'HHA dans la viabilité des spores), nous avons entrepris la mutation de l'HHA chez *S. avermitilis*, pour prouver que son absence affecterait directement la viabilité de ses spores mais aucunement sa phase végétative. Ceci sera le thème du chapitre IV.

## IV. Mutation de délétion des gènes codant pour une hydrogénase à haute affinité du groupe 5 chez *Streptomyces avermitilis* :

### 1. Problématique

Les 4 premiers groupes d'hydrogénases [NiFe] ont été largement étudiés et sont constitués d'enzymes ayant une faible affinité pour l'H<sub>2</sub> (K<sub>m</sub> > 1000 ppmv). Au contraire, les enzymes du groupe 5 récemment découvertes n'ont pas encore été indiscutablement reliées à l'oxydation à haute affinité que l'on retrouve chez la plupart des bactéries possédant ces hydrogénases dans leur génome. Deux études majeures ont ciblé ces hydrogénases particulières. La première étude visait à étudier une HHA chez *R. eutropha* H16, bactérie modèle dans l'étude des hydrogénases. Cette bactérie possède effectivement 4 hydrogénases différentes : une du groupe 1 liée à la membrane (notée MBH) couplée à la chaîne respiratoire, une du groupe 2b (HR) induisant l'expression d'une hydrogénase oxydative cytoplasmique du groupe 3 (HOC), et finalement une hydrogénase du groupe 5, issue d'un transfert latéral. Cette hydrogénase est très faiblement exprimée, et sa purification démontre, en présence d'un accepteur d'électron artificiel, une affinité faible pour l'H<sub>2</sub>, avec un K<sub>m</sub> au-dessus des 1000 ppmv au lieu de l'affinité inférieure à 100 ppmv observé dans le cas d'une oxydation à haute affinité. La seconde étude, publiée par Greening *et al.* en 2014, s'intéresse à l'hydrogénase du groupe 5 chez *Mycobacterium smegmatis*. Cette bactérie possède 3 hydrogénases différentes, et la mutation de l'hydrogénase du groupe 3 (encodée par les gènes MSMEG\_3931-3928) abolit l'oxydation à faible affinité, mais préserve l'oxydation à haute affinité, laissant croire qu'au moins une des deux hydrogénases restantes possèderaient cette capacité à oxyder l'H<sub>2</sub> troposphérique, bien que l'une des deux seulement soit du groupe 5.

Ces différents résultats maintiennent donc encore le doute sur la capacité oxydative des hydrogénases du groupe 5, en particulier dans les spores, qui sont des structures bien particulières non-présentes chez ces deux précédentes espèces. De plus, dans le premier chapitre, nous avons vu que l'augmentation de la concentration en H<sub>2</sub> dans l'environnement des spores a bel et bien un impact sur le transcriptome des spores de *S. avermitilis*, l'analyse suggérant un lien entre l'HHA et l'approvisionnement des spores en énergie, et donc une possible implication dans la survie des spores.

Notre but était donc de prouver que les hydrogénases du groupe 5 sont responsables de l'oxydation à haute affinité de l'H<sub>2</sub>, en particulier chez notre organisme modèle. Dans ce but, nous avons généré un mutant de *S. avermitilis* dépourvu des gènes structuraux *hhySL*, dans le but d'observer une perte l'activité oxydative et d'en découvrir son impact sur le phénotype de la bactérie et de ses spores, siège de l'activité oxydative. Des tests de croissance du mycélium et de persistance des spores des souches sauvage et mutante ont aussi été entrepris pour vérifier l'hypothèse liant oxydation de l'H<sub>2</sub> et viabilité des spores.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Microorganismes

Tableau 5 : détails des souches bactériennes et vecteurs utilisés dans cette étude

Souches	Vecteurs transportés	Rôle	Référence
<i>E. coli</i> BW25113	pIJ790	Possède le système λred facilitant la recombinaison et un gène de résistance au chloramphénicol ( <i>cat</i> )	(Datsenko & Wanner, 2000)
<i>E. coli</i> dcm Δ( <i>srl-recA</i> )306::Tn10	pUB307-aph::Tn7	Transfert des vecteurs non-méthylés par conjugaison dans <i>S. avermitilis</i>	(Kitani <i>et al.</i> , 2009)
<i>E. coli</i> B1	pIJ790 et CL_214_G06	Recombinaison entre le CL_214_G06 et la cassette apramycine amplifiée par PCR	Cette thèse
<i>E. coli</i> B2	pIJ790 et cPCΔ1	Recombinaison entre le cPCΔ1 et le gène <i>neo</i> amplifié par PCR	Cette thèse
<i>E. coli</i> B3	pIJ790 et cPCΔ2	Extraction du cosmide cPCΔ2 pour transfert dans <i>E. coli</i> C1 par électroporation	Cette thèse
<i>E. coli</i> C1	pUB307::Tn7 and cPCΔ2	Transfert du cPCΔ2 non-méthylé par conjugaison dans <i>S. avermitilis</i>	Cette thèse
<i>S. avermitilis</i> Δ <i>hhySL</i>	Aucun	Mutant de délétion pour <i>hhySL</i> , double recombinant	Cette thèse

Vecteurs	Gène(s) transportés	Résistance antibiotique (hôte)	Référence
CL_214_G06	<i>hhySL</i>	Carbéniciline ( <i>E. coli</i> )	(Ōmura <i>et al.</i> , 2001)
pIJ790	<i>aac3(IV)</i> cassette	Apramycine ( <i>E. coli</i> )	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pUC4K	<i>neo</i>	Kanamycine ( <i>E. coli</i> )	GE HealthCare Life Science
cPCΔ1	<i>aac3(IV)</i> cassette et <i>bla</i>	Carbéniciline et apramycine ( <i>E. coli</i> )	Cette thèse
cPCΔ2	<i>aac3(IV)</i> cassette et <i>neo</i>	Apramycine et kanamycine ( <i>E. coli</i> , vecteur suicide dans <i>S. avermitilis</i> )	Cette thèse

Outre *S. avermitilis* décrite dans le chapitre III, la souche *E. coli* F<sup>-</sup> *dcm*  $\Delta$ (*srI-recA*)306::Tn10 (pUB307-*aph*::Tn7) gracieusement fournie par le Prof. H. Ikeda, Kitasato (Institut des Sciences de la Vie, Université de Kitasato, Japon) a été utilisée pour la conjugaison. La souche *E. coli* DH5 $\alpha$  a été utilisée pour les clonages de routine. Pour la recombinaison entre les cassettes de délétion et les cosmides CL\_214\_G06 et cPC $\Delta$ 1, la souche *E. coli* BW25113 disposant des gènes de la recombinaison *lambda Red* (Gust *et al.*, 2004) a été utilisée. Toutes les souches d'*E. coli* ont été cultivées sur LB-agar. Les antibiotiques suivants ont été utilisés comme marqueurs de sélection et pour le maintien des plasmides (en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) : carbéniciline (100), apramycine (50), streptomycine (50) chloramphenicol (25) et kanamycine (12,5) pour *E. coli* (Tableau 5). La résistance à la streptomycine sur le plasmide pUB307::Tn7 amène aussi la résistance à spectinomycine (100) (Tableau 5).

## 2.2. Délétion des gènes *hhySL*

Les travaux ayant mené à la construction de la souche mutante ont été compliqués en raison de certaines particularités de *S. avermitilis* (e.g. système de restriction de l'ADN méthylé plus complexe que ceux retrouvés chez les souches de *Streptomyces* modèles). Plusieurs protocoles décrits dans la littérature ont été tenté sans succès. En raison des difficultés rencontrées lors des manipulations génétiques, la méthodologie adaptée à *S. avermitilis* qui s'est avérée efficace est décrite en détail dans les prochaines sections.

### *Transformation d'E. coli* BW25113 par le cosmide CL\_214\_G06

La délétion totale des gènes *hhySL* a été entreprise via une approche dite de *PCR-targeting*, décrite par Gust *et al.* (Gust *et al.*, 2003) avec quelques modifications (Fig. 12). Le cosmide CL\_214\_G06, utilisé pour le séquençage du génome de *S. avermitilis*, a été choisi car incluant le fragment du génome encodant pour l'HHA, entouré de plus de 15 kb de séquence génomique. Approximativement 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  de ce cosmide ont été transformés dans *E. coli* BW25113, rendues compétentes (voir Protocole 1 en annexe).

### *Insertion de la cassette de disruption dans le cosmide CL\_214\_G06*

Au moins trois cassettes sont disponibles pour la délétion par recombinaison chez les Streptomyces, se distinguant par le gène de résistance porté : apramycine, spectinomycine/streptomycine, ou viomycine. Des oligonucléotides possédant exactement 39

nucléotides complémentaires aux régions 5' et 3' de la cassette de délétion conférant la résistance à l'apramycine, possédant en 5' des séquences homologues aux régions en amont et en aval de *hhySL* ont été synthétisés puis utilisées pour amplifier la cassette (Tableau A2 amorces B). L'extrémité 5' des amorces sens et anti-sens ont été conçues de telle façon que l'insertion de la cassette de délétion se fera en conservant le cadre de lecture des gènes *hhySL*. De même, le choix de l'ADN polymérase est important, car certaines sont inefficaces en présence d'ADN matriciel à haut taux de GC. Dans notre cas, l'enzyme la plus efficace était la FastTaq de Feldan®. Le produit PCR a été ensuite transféré par électroporation dans *E. coli* BW25113 (pIJ790) contenant le cosmide CL\_214\_G06 (voir Protocole 2 en annexe).

Cette transformation a entraîné une recombinaison entre les gènes *hhySL* présents sur le cosmide et les portions homologues sur la cassette de délétion, grâce à l'induction de la recombinaison  $\lambda$ -Red porté sur le plasmide pIJ790 (Datsenko & Wanner, 2000). Ce dernier augmente les probabilités de recombinaison homologue en exprimant des protéines issues du bactériophage  $\lambda$  aidant à la recombinaison. Ce premier cosmide a été nommé cPC $\Delta$ 1.

La souche *S. avermitilis* MA-4680 étant naturellement résistante à la carbéniciline, le gène *neo* (conférant la résistance à la kanamycine) a été inséré dans le cosmide cPC $\Delta$ 1 en remplaçant le gène *bla* (amenant la résistance à l'ampicilline) en utilisant une stratégie de recombinaison et un protocole identique. Effectivement, après avoir obtenu le premier cosmide cPC $\Delta$ 1, et fait la conjugaison, nous étions censé obtenir 10% de double-recombinants (Gust *et al.*, 2004, Tobias *et al.*, 2000). Après avoir criblé plus d'une centaine de colonies, seuls de simples recombinants ont été trouvés. Nous avons donc décidé d'insérer un second marqueur sur le cosmide (soit le gène *neo*, apportant une résistance à la kanamycine) pour pouvoir différencier les simples des doubles recombinants, les doubles étant sensibles à la kanamycine.

Le gène *neo* a été amplifié par PCR à partir du vecteur pUC4K, (Tableau A2, amorces A-F et A-R, les régions soulignées pouvant recombiner avec le cosmide et remplacer le gène *bla*). Le fragment ainsi obtenu a été transféré dans la souche *E. coli* B2, entraînant une recombinaison entre le gène *bla* du cosmide et le gène *neo*, remplaçant la résistance à l'ampicilline par celle à la kanamycine. Le cosmide obtenu a été nommé cPC $\Delta$ 2, dans la souche nommée *E. coli* B3. La souche *E. coli* B3 a ensuite été cultivée à 37°C au lieu de 30°C pour expulser le plasmide thermosensible pIJ790. Les bactéries sensibles à l'ampicilline et résistantes à la kanamycine ont été mises en culture pour extraction du cosmide. L'absence des gènes *hhySL* et la

présence de la cassette ApraR, du gène *neo* (KanR) et l'absence du gène *bla* (AmpR) ont été vérifiées par PCR à l'aide des amorces E, B, C et D respectivement.

### *Conjugaison entre E. coli et Streptomyces avermitilis pour transférer le cosmide cPCΔ2*

Le cosmide cPCΔ2 a été purifié et transféré par électroporation dans la bactérie conjugative *E. coli dcm- Δ(slr-recA)306::Tn10* (pUB307-*aph::Tn7*) en suivant le premier protocole d'électroporation (Protocole 1 en annexe), pour donner la souche *E. coli* C1. Le plasmide pUB307-*aph::Tn7* contient les gènes nécessaires à l'expression des protéines permettant la conjugaison entre *E. coli* et *S. avermitilis*. Cette bactérie est utilisée à la place de la souche *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdS*) pUZ8002 décrite dans la méthode de Gust *et al* (2004), car cette dernière ne semble pas conjuguer efficacement avec *S. avermitilis* à cause de l'émergence de révertants au phénotype Dam+ Dcm+. *S. avermitilis* possédant des endonucléases méthyl-dépendantes, nous devons donc transférer le cosmide cPCΔ2 dans une souche générant de l'ADN non méthylé. Durant la conjugaison, le complexe relaxosome-transférasome génère un brin simple d'ADN, transféré via un pilus dans la bactérie réceptrice, ici *S. avermitilis* (Eisenberg & Pardee, 1969, Flett *et al.*, 1997). Le brin transféré étant simple et non double, *S. avermitilis* est sensible aux méthylations Dcm seulement (MacNeil, 1988). Les colonies d'*E. coli* C1 obtenues sont sélectionnées sur un milieu LB-agar Apra/Kan. Par la suite, la conjugaison entre *S. avermitilis* et *E. coli* C1 est faite suivant le protocole de conjugaison (voir Protocole 3 en annexe). La double-recombinaison du cosmide cPCΔ2 est vérifiée par PCR

### **2.3. Activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> par les spores**

Les spores matures de *S. avermitilis* (WT et *ΔhhySL*) ont été récoltées à partir de cultures à confluence sur MS-agar, obtenues après 7 jours d'incubation à 30°C. La biomasse a été détachée par grattage et pipetage répétés de la surface de l'agar dans 1 ml de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,2). La suspension a été ensuite transférée dans un tube de 15 ml puis la gélose a été rincée avec 2 ml du même tampon. La suspension de spores (3 ml) a été filtrée à travers de la laine de verre stérile pour enlever les débris de mycélium aérien, et le volume final a été ajusté à 10 ml. Les suspensions de spores ont été transférées dans des bouteilles en verre Gibco® de 500 ml (volume nominal) fermées par des bouchons étanches munis d'un septum. Un volume d'air contenant 525 ±10 ppmv H<sub>2</sub> (GST-Welco, Pennsylvania, U.S.A.) a été injecté dans la phase statique du microcosme, menant à une concentration finale en H<sub>2</sub> de 3-5 ppmv.

La suspension a ensuite été incubée à 30°C dans l'obscurité et sous agitation (300 rpm). L'activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> a été suivie via une mesure des concentrations d'H<sub>2</sub> par chromatographie en phase gazeuse (Khdhiri *et al.*, 2015). La concentration en H<sub>2</sub> a été mesurée durant 2 jours. Chaque expérience a été faite en triplicata biologiques indépendants, chaque réplica consistant en une suspension de spores matures récupérées sur une unique gélose à confluence.

## 2.4. Viabilité des spores

Il est difficile de mesurer la viabilité des spores des *Streptomyces* : certaines spores peuvent perdre leur capacité de germination et réplication mais restent malgré tout physiologiquement actives, tandis que des enzymes peuvent rester actives même après la mort de la spore, protégées par la paroi (Ensign, 1978). Ainsi, nous avons décidé de prendre la capacité des spores à germiner et former de nouvelles colonies comme indicateur de viabilité, plutôt que l'activité physiologique.

Le comptage des spores de *S. avermitilis* (WT et  $\Delta hhySL$ ) a été fait avec un hémacytomètre (Bright Line Neubauer, Hausser scientific, Horsham, PA, USA), et la quantité de spores calculée suivant l'équation :

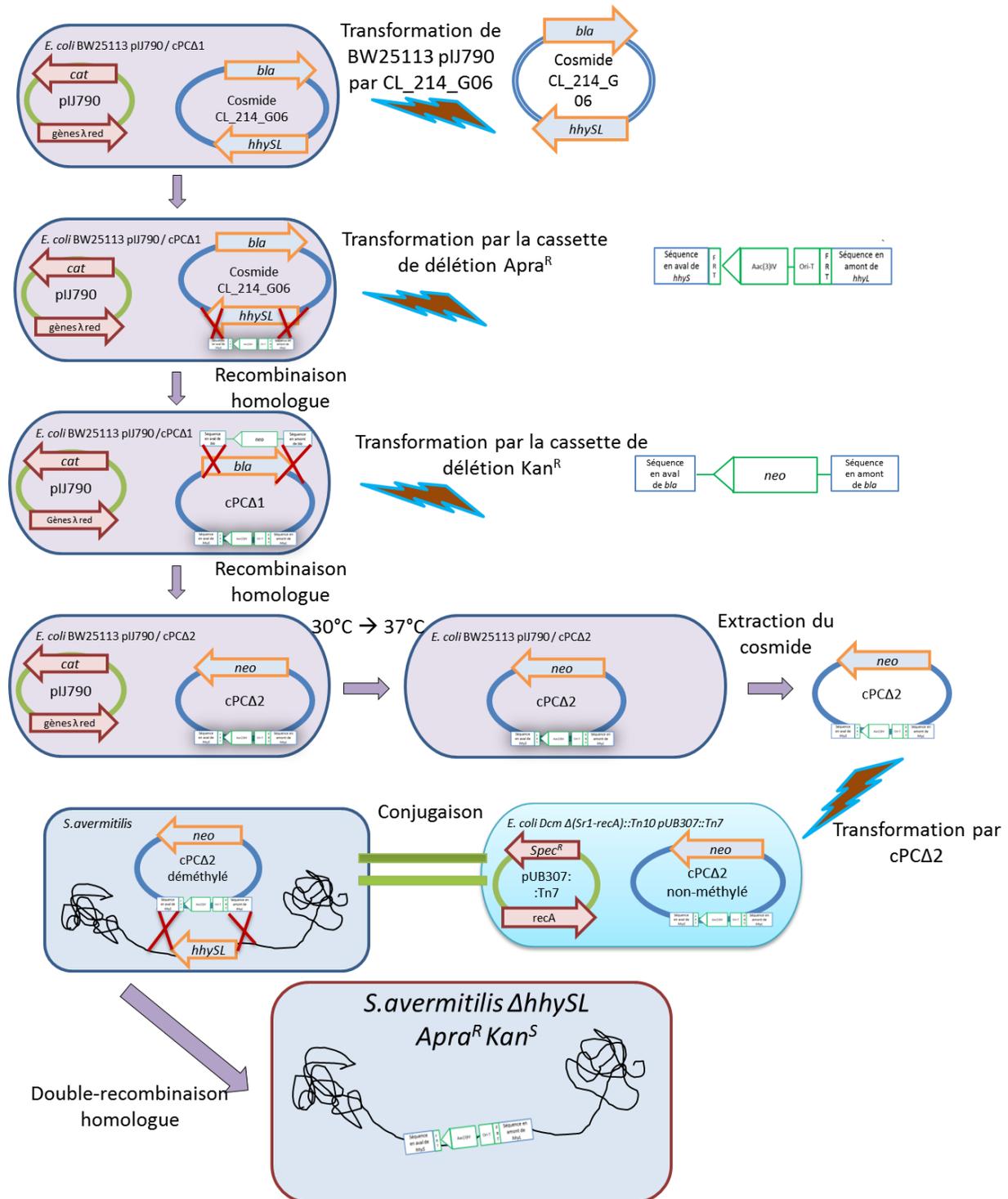
$$C(s) = \frac{\bar{x}}{4} \times 10^6 \times FD$$

avec  $C_{(s)}$  la concentration de spores,  $x$  la moyenne du nombre de spores dans un carré de 4 nl et FD le facteur de dilution, selon le fabricant. Les hyphes sont différenciés par la couleur plus claire de leurs spores et par leur forme de chaîne possédant souvent plus de 4 spores. Une filtration efficace doit les avoir retiré de la solution. Ensuite, les spores ont été diluées en série dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,0, et 100  $\mu$ l étalés sur MS-agar avec des billes de verre de 0,2 mm. Les UFC sont comptées après 7 jours, donnant  $C(ufc) = y * FD$ , avec  $y$  le nombre d'UFC et FD le facteur de dilution. Le pourcentage de viabilité est considéré égal à  $\frac{C(UFC)}{C(s)} \times 100$ .

## 2.5. Analyse statistique

Les comparaisons de la viabilité des spores, l'oxydation cellulaire spécifique de l' $H_2$  et les rendements de biomasse avec les souches sauvage et  $\Delta hhySL$  de *S. avermitilis* ont été faites à l'aide d'une analyse de la variance selon les rangs de type Kruskal-Wallis, utilisant le test statistique *post-hoc* Tukey implémenté dans SigmaPlot 12.3.

Figure 12 : Schématisation des différentes étapes du protocole de mutation des gènes *hhySL* chez *S. avermitilis*.



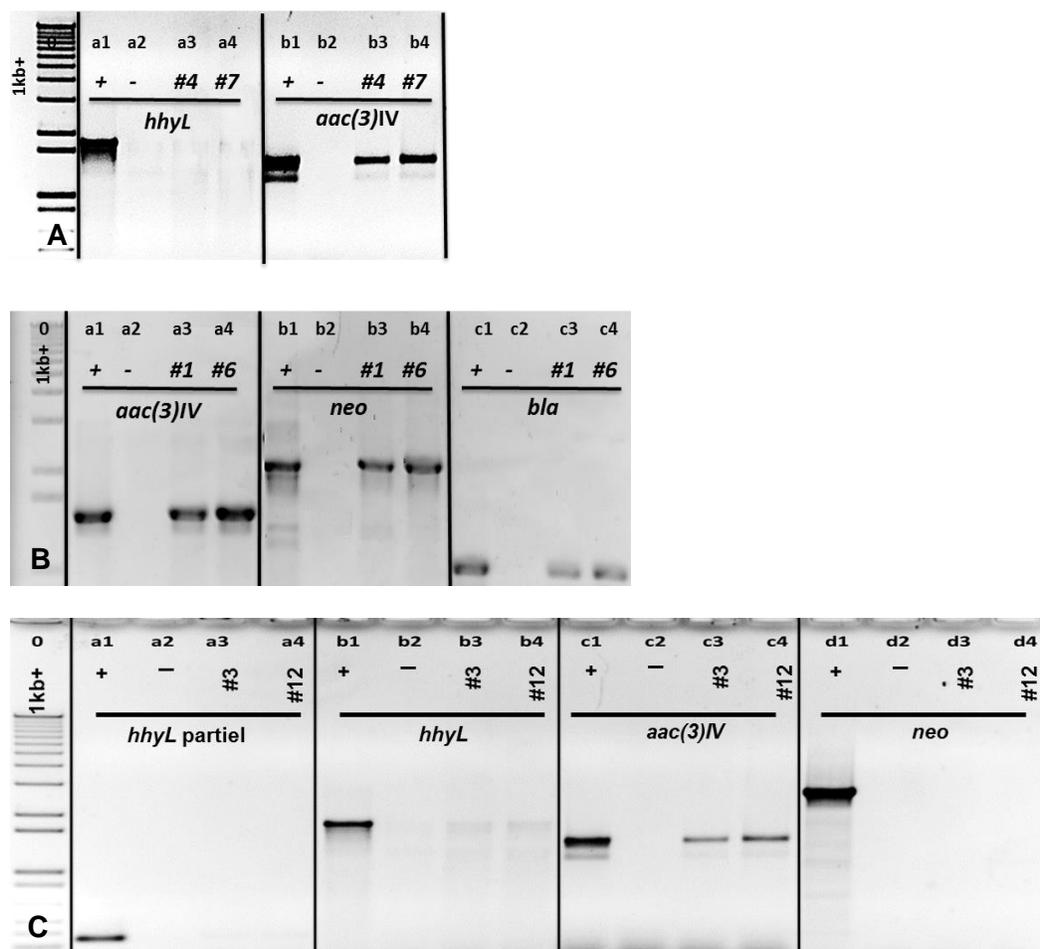
Selon notre protocole de *PCR-targeting* modifié et adapté à cette souche. Ces différentes étapes sont décrites dans la section Matériels et méthodes du chapitre IV.

### 3. Résultats

#### 3.1. Mutation de délétion pour les gènes *hhySL* chez *S. avermitilis* :

L'inactivation des gènes structuraux de l'HHA chez *S. avermitilis* a été faite suivant un protocole déjà établi pour *S. coelicolor*, adapté pour faire face aux différences entre ces deux espèces, principalement la résistance à la carbénicilline de *S. avermitilis*, ainsi que son clivage de l'ADN méthylé. Le cosmide CL\_214\_G06 a tout d'abord été transformé dans la souche *E. coli* BW25113, suivi par la cassette de recombinaison contenant une allèle de *hhySL* tronquée par l'insertion d'une cassette de résistance à l'apramycine. Après recombinaison, le vecteur résultant cPCΔ1, possède encore le gène *bla*, conférant la résistance à l'ampicilline/carbénicilline. Dans *E. coli* BW25113, la transformation d'une cassette de délétion remplaçant le gène *bla* par le gène *neo* a permis de changer la résistance apportée par le vecteur, donnant le vecteur cPCΔ2, conférant la résistance à l'apramycine et à la kanamycine. Ce vecteur est transformé dans la souche *E. coli dcm Δ(srl-recA)306::Tn10 pUB307-aph::Tn7* qui ne méthyle pas l'ADN et permet la conjugaison avec les tubes germinatifs des spores de *S. avermitilis*. Le vecteur cPCΔ2 non-méthylé est donc ensuite transformé par conjugaison dans *S. avermitilis*. La double-recombinaison de l'allèle de *hhySL* tronquée par l'insertion d'un cassette de résistance à l'apramycine, portée sur le cosmide cPCΔ2 avec le génome de *S. avermitilis* a été vérifiée par PCR en ciblant les gènes *hhyL*, *aac(3)-IV* et *neo* (Fig. 13). Les différentes souches positives pour *aac(3)-IV* et négatives pour *hhySL* et *neo* ont été repiquées sur gélose MS-agar sans antibiotiques, et en milieu liquide dans du TSB sans antibiotique.

Figure 13 : Confirmation par PCR des constructions cPCΔ1 (A) et cPCΔ2 (B), et de la double recombinaison dans *S. avermitilis* Δ*hhySL* (C).



Les fragments amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose comme suit :

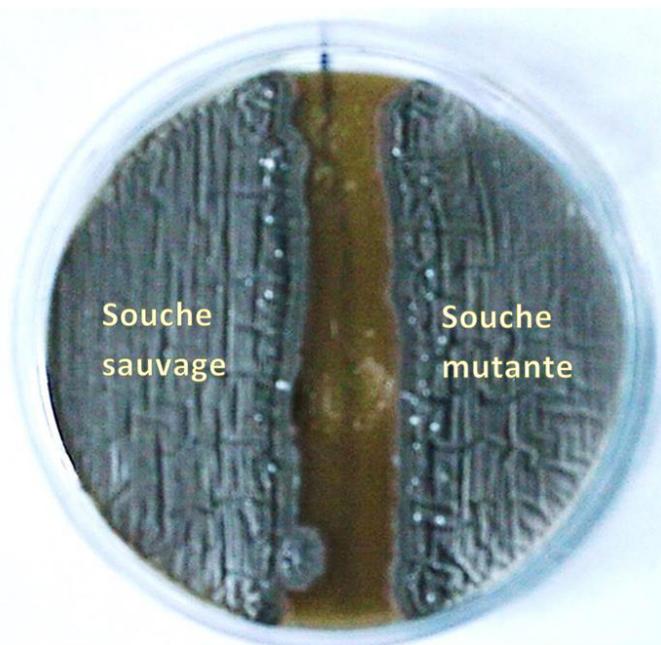
**(A)** voie 0 : échelle d'ADN 1Kb+ (Feldan, Québec, QC, Canada), a : cassette *hhyL* (amorces E), b : cassette *aac(3)IV* (amorces B); 1 : contrôle positif (CL\_214\_G06 pour *hhyL*, fragment PCR de la cassette *aac(3)IV* pour *aac(3)IV*), 2 : contrôle négatif, 3 : ADN circulaire de *E. coli* B2 #4, 4 : ADN circulaire de *E. coli* B2 #7. **(B)** voie 0 : échelle d'ADN 1Kb+ (Feldan, Québec, QC, Canada), a : cassette *aac(3)IV* (amorces B), b : *neo* (amorces C), c : *bla* (amorces D); 1 : contrôle positif (CL\_214\_G06 pour *hhyL*, fragment PCR de la cassette *aac(3)IV* pour *aac(3)IV*, et pUC4K pour *neo*), 2 : contrôle négatif, 3 : ADN circulaire de *E. coli* B3 #1, 4 : ADN circulaire de *E. coli* B3 #6. **(C)** voie 0 : échelle d'ADN 1Kb+ (Feldan, Québec, QC, Canada), a : *hhyL* partiel (amorces F), b : *hhyL* (amorces E), c : cassette *aac(3)IV* (amorces B), d : *neo* (amorces C); 1 : contrôle positif (ADN génomique de *S. avermitilis* sauvage pour *hhyL*, fragment PCR de la cassette *aac(3)IV* pour *aac(3)IV*, et pUC4k pour *neo*), 2 : contrôle négatif, 3 : ADN génomique de *S. avermitilis* Δ*hhySL* #3, 4 : ADN génomique de *S. avermitilis* Δ*hhySL* #12. La souche #3 a été choisie pour continuer cette étude.

### 3.2. Comparaison des phénotypes des souches sauvage et mutant de délétion pour *hhySL*

Lors d'une culture en milieu liquide, aucune différence significative n'a été remarquée dans la quantité de biomasse produite après avoir atteint la phase stationnaire : la souche sauvage produisait  $1053 \text{ mg} \pm 119$  de biomasse sèche pour 100ml de culture, lorsque le mutant en produisait  $1135 \text{ mg} \pm 80$ . Sur gélose, la croissance, la sporulation puis la maturation, menaient à des spores d'un brun sombre, sans aucune différence visible entre les deux souches en termes d'aspect ou de vitesse de développement (Fig. 14).

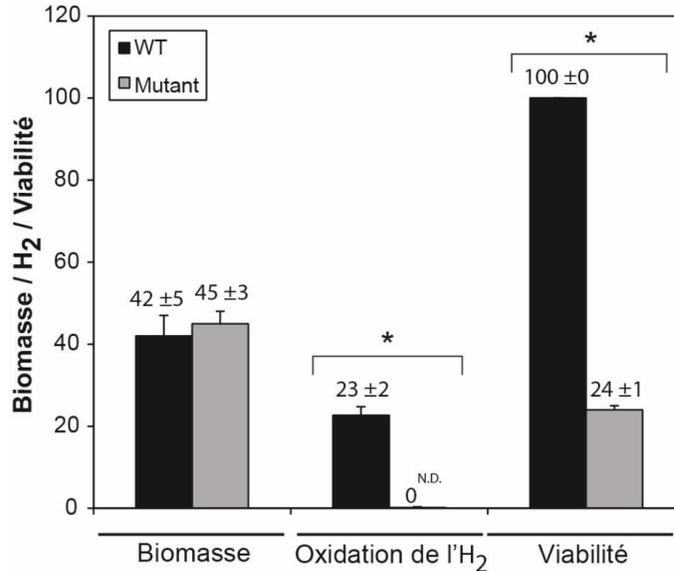
Par contre, tandis que les spores de la souche sauvage possédaient une capacité d'oxydation de l' $\text{H}_2$  à faible concentration ( $36 \pm 4 \text{ amoles UFC}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ), les spores du mutant ne possédaient plus cette capacité (Fig. 15). Après un étalement sur MS-agar de spores issues de géloses à confluence de 7 jours, la souche mutante montrait une régénération des spores 4,2 fois moindre que la souche sauvage (Fig. 15).

Figure 14 : Photographie d'une culture confluyente sur MS-agar de *S. avermitilis* et muté pour *hhySL*



Photographie d'une culture confluyente sur MS-agar de *S. avermitilis* WT (à gauche) et muté pour *hhySL* (à droite), montrant l'absence de différence visuelle entre les deux souches, après 7 jours d'incubation à  $30^\circ\text{C}$  dans l'obscurité.

**Figure 15 : Impact de l'inactivation de l'HHA sur le phénotype de *S. avermitilis*.**



Sont présentés l'oxydation cellulaire spécifique dans les spores (exprimée en amoles UFC<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), la viabilité des spores (exprimée en %) et les rendements de biomasse des cultures végétatives en milieu TSB liquide (exprimé en mg ml<sup>-1</sup>) des souches WT et  $\Delta hhySL$ . L'astérisque « \* » dénote une différence significative dans l'oxydation de l'H<sub>2</sub> et dans la viabilité entre les deux souches. (ANOVA, P > 0,95). Le terme « N.D. » dénote l'absence de toute activité détectable d'oxydation de l'H<sub>2</sub> dans les spores de la souche  $\Delta hhySL$ . Chaque expérience a été faite en triplicatas biologiques indépendants, avec pour exception la viabilité de la souche sauvage (2 réplicas).

### 3.3. Complémentation

L'essai de complémentation a été fait en utilisant un vecteur d'expression pIAF-C209 (Francois Shareck, communication personnelle), pouvant se répliquer dans *S. avermitilis* et dans *E. coli*. Il possède un gène de résistance à la carbéniciline, et un gène de résistance à thioestreptone sous contrôle d'un promoteur spécifique aux *Streptomyces*. Le plasmide possède deux promoteurs fort, T7 (dépendant de l'ARN polymérase T7) et C109 (constitutif) en aval d'un site de restriction unique HindIII, utilisé pour l'expression de protéines recombinantes, à l'origine dans *S. lividans* (Lussier *et al.*, 2010). Ce vecteur a permis dans un premier temps le clonage par recombinaison des gènes *hhySL*, sous contrôle du promoteur constitutif fort C109, puis le clonage des gènes *hypX-hhySL*, pour obtenir *hhySL* sous contrôle du promoteur natif (voir Protocole 4 en annexe).

Les constructions génétiques ont été complétées et transformées avec succès, mais aucune des deux constructions testées n'a permis de restaurer l'activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> dans les spores. À l'heure actuelle, trois causes possibles à l'échec de cette complémentation sont envisagées: une mutation de délétion avec un effet polaire, même si la cassette est censée éviter cet effet, la présence de mutations ponctuelles générées lors des épisodes de recombinaison du cosmide, ou bien la surexpression des gènes structuraux clonés, ne permettant pas une maturation adéquate de l'enzyme, ceci dû au trop grand débalancement

entre l'expression des protéines de maturation et celle des protéines structurales surnuméraires.

D'après de récentes recherches, la recombinaison de cosmides pour la mutagenèse dirigée peut induire des mutations ponctuelles dans les séquences tant codantes que non-codantes entourant la séquence modifiée, pouvant empêcher une complémentation fonctionnelle même lors d'une expression correcte du gène inséré (Munnoch *et al.*, 2016). De plus, la simple recombinaison du cosmide peut amener une sur-expression de certains gènes alors présents en double dans le génome, pouvant provoquer des problèmes de développement et de maturation. Ainsi, dans notre cas, il semble plus prudent de compléter la mutation à l'aide d'un vecteur réplcatif à faible nombre de copies contenant la totalité de l'opéron nécessaire à l'expression fonctionnelle de l'enzyme, et de séquencer le génome à la recherche de mutation ponctuelle potentiellement délétères pour la bactérie. Dans le futur, il serait préconisé de préférer l'édition de génome utilisant le système CRISPR-Cas9 (Huang *et al.*, 2015) plutôt que l'utilisation de cosmides.

L'échec de la complémentation peut aussi être lié au vecteur utilisé: la première construction utilisait un promoteur fort présent sur le vecteur d'expression et idéal pour la production de protéines en grande quantité chez les *Streptomyces*. La seconde voit remplaçait ce promoteur fort par le promoteur d'origine de *hhySL*, mais sans plus de succès, possiblement compte-tenu d'un grand nombre de copies du vecteur (40 à 300 copies par génome) (Gusek & Kinsella, 1992). Dans le but d'obtenir un rapport d'expression efficace de chaque gène, deux stratégies sont possibles : comme *S. avermitilis* possède un site d'intégration du phage Phi, il serait possible d'intégrer les gènes *hhySL* et leur promoteur dans un vecteur lysogénique dérivé du phage Phi et de transformer et intégrer ce vecteur dans *S. avermitilis* (Gregory *et al.*, 2003), ce qui impliquerait la présence d'une seule copie de ces gènes par chromosome. La seconde serait le clonage de la totalité des opérons impliqués dans la synthèse et la maturation de l'hydrogénase dans le vecteur pIAF-C209. Dans le 1<sup>er</sup> cas, la fréquence de transformation inférieure à celle d'un vecteur réplcatif, à cause de la nécessaire double recombinaison avec le génome, rend l'expérience plus difficile qu'une complémentation via un vecteur réplcatif.

## 4. Discussion

La perte d'oxydation de l'H<sub>2</sub> par les spores de la souche mutante  $\Delta hhySL$  confirmait que l'HHA hypothétique est bel et bien fonctionnelle et responsable de l'activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> à haute affinité chez *S. avermitilis*. L'absence d'impact de cette mutation sur la quantité de mycélium

produite durant la phase de croissance et la phase stationnaire en milieu liquide est en accord avec l'activité d'oxydation détectée uniquement dans les spores. L'estimation de l'énergie apportée par cette hydrogénase montre que celle-ci suffirait à maintenir un métabolisme minimal au sein des spores, et la forte baisse de viabilité des spores mutantes montre que l'HHA a effectivement un rôle majeur dans le maintien du bilan énergétique, ses propres réserves ainsi que les nutriments extérieurs ne suffisant pas à maintenir la population de façon aussi efficace. Par contre, ceci implique que *S. avermitilis* doit se situer dans des milieux aérobies ou à proximité de sources d'H<sub>2</sub> pour maintenir sa population de spores dense.

Ces résultats sont à remettre en perspective avec les autres *Streptomyces* : sur 223 génomes recensés sur la base de données publique du NCBI, seulement 15, soit moins de 10%, possèdent dans leur génome cette hydrogénase atypique. Ceci indique que la grande majorité des *Streptomyces* utilisent d'autres mécanismes pour la préservation de leurs spores et maintenir leur métabolisme minimal. Une grande question qui demeure donc sans réponse est l'avantage procuré par l'HHA chez les streptomycètes. Pour répondre à cette question, il serait envisageable de mettre au point des bioessais où la cinétique de croissance des streptomycètes et la survie des spores, possédant ou pas d'HHA, seraient examinées (Schlatter *et al.*, 2010). Une première hypothèse qui pourrait alors être testée est l'impact de l'HHA sur la vitesse et les rendements de croissance des streptomycètes. De même, l'effet de l'H<sub>2</sub> pourrait être analysé en établissant une relation dose-réponse entre la croissance des streptomycètes possédant l'HHA et la concentration d'H<sub>2</sub> à laquelle elles sont exposées. S'il s'avère que le métabolisme des spores sans HHA est aussi efficace en milieu aérobie que les spores avec HHA, alors un métabolome comparant ces deux mécanismes permettrait de comprendre comment la spore sans HHA fait pour soutenir son métabolisme minimal. Comme il a déjà été démontré que les populations de streptomycètes peuvent être très différentes selon leur localisation (Schlatter *et al.*, 2013), il est aussi possible que l'H<sub>2</sub> influe sur cette localisation. Une hypothèse serait que les spores sans HHA seraient confinées ou adaptées à des environnements en moindre contact avec l'atmosphère ou la rhizosphère des légumineuses, où l'HHA serait inefficace. Ceci impliquerait une différence dans la répartition spatiale des spores selon que l'espèce possède ou non une HHA. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant la viabilité des spores avec et sans HHA lors de séries temporelles en milieux aérobies et anoxiques. Ceci permettrait de lever le voile sur la différence entre les stratégies de survie de ces espèces proches : les streptomycètes avec ou HHA se différencient-ils juste par leur métabolisme, ou bien aussi par leur environnement ?

Il restera finalement à découvrir par quel biais cette énergie se transmet depuis l'hydrogénase aux réserves énergétiques de la cellule. Il est probable, mais reste à démontrer, que l'enzyme soit impliquée dans la génération d'un gradient de concentration de protons dans la membrane périplasmique, en plus de confier ses électrons à un accepteur physiologique encore inconnu, pour ensuite les transférer au *pool* de quinones membranaires.

## V. Synthèse

### *Continuum de l'affinité à l'H<sub>2</sub>*

Les microorganismes du sol oxydant l'H<sub>2</sub> en aérobie sont exposés à deux sources majeures de ce substrat : l'atmosphère, avec 0,53 ppmv d'H<sub>2</sub>, et les nodules racinaires fixateurs de N<sub>2</sub> autour desquelles des concentrations en H<sub>2</sub> peuvent grimper jusqu'à 20 000 ppmv d'H<sub>2</sub> (Constant *et al.*, 2009, Hunt *et al.*, 1988, Witty, 1991). Ces microniches sont donc caractérisées par un gradient d'H<sub>2</sub> variant entre ces deux extrêmes. La capacité des communautés microbiennes à exploiter ces sources d'H<sub>2</sub> est démontrée par la cinétique diphasique de l'activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> dans le sol, expliquée par l'existence de deux sous-populations de bactéries oxydant l'H<sub>2</sub>, l'une ayant une faible et l'autre une forte affinité envers l'H<sub>2</sub> (Häring & Conrad, 1994). De plus, lorsque l'on enrichit le milieu en H<sub>2</sub>, la population à faible affinité est enrichie ou activée proportionnellement à l'augmentation de l'H<sub>2</sub> (Dong & Layzell, 2001, La Favre & Focht, 1983, Popelier *et al.*, 1985). Ces deux éléments menaient à penser que la juxtaposition des deux sous-populations dépendrait du gradient de concentration en H<sub>2</sub>, l'énergie apportée par l'H<sub>2</sub> dépendant directement de l'affinité et du seuil à partir duquel l'hydrogénase ne capte plus l'H<sub>2</sub>. Mais la récente découverte de bactéries possédant une affinité intermédiaire pour l'H<sub>2</sub> (Schuler & Conrad, 1991), suggère davantage l'existence d'un continuum dans l'affinité que les membres des communautés microbiennes démontrent envers l'H<sub>2</sub>.

### *La position des hydrogénévores au sein des gradients d'H<sub>2</sub>*

À la lumière de ces études récentes, il était assumé que l'affinité de leurs HHA déterminait la position des bactéries au sein des gradients de concentration d'H<sub>2</sub> dans l'environnement. Ce concept est appuyé par le mode de croissance en mixotrophie classique où l'énergie apportée par l'H<sub>2</sub> est proportionnelle à la vitesse d'oxydation du substrat. Les résultats de cette thèse de doctorat suggèrent que la juxtaposition des microorganismes oxydant l'H<sub>2</sub> est plus complexe. Au-delà de l'affinité de l'HHA pour son substrat, la régulation de son expression, différente en fonction des espèces, pourrait contribuer à déterminer le succès des bactéries à coloniser les niches écologiques exposées à l'H<sub>2</sub>. Effectivement, la combinaison des études transcriptomique et génétique a permis de proposer un nouveau mode trophique nommé mixotrophie de survie, retrouvé chez les streptomycètes oxydant l'H<sub>2</sub> atmosphérique, et au moins différent de la mixotrophie classique par l'absence de croissance et de course au cumul des sources d'énergie.

### *Mécanisme de la mixotrophie de survie*

Premièrement, notre étude transcriptomique a démontré que les spores de *S. avermitilis* sont métaboliquement actives, exprimant, outre l'HHA, une large gamme de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, et dans le métabolisme secondaire. Ainsi, contrairement aux spores du genre *Bacillus*, les spores des *Streptomyces* possèdent bien un métabolisme minimal impliquant l'import de nutriments extérieurs. L'augmentation de la concentration d'H<sub>2</sub> dans l'environnement de ces spores entraîne une sous-expression globale des transporteurs et des gènes du métabolisme central (glycolyse, cycle TCA...). La spore semble réduire par ce biais sa dépendance aux sources d'énergie d'origine organique, impliquant des biomolécules diverses, complexes, et limitées, métabolisées par de nombreuses enzymes, tout en préservant son bilan énergétique en oxydant l'H<sub>2</sub>, molécule inorganique, simple, et ubiquitaire, métabolisée par une unique enzyme. A la lumière de ces résultats, nous pensons que l'oxydation de l'H<sub>2</sub> permettrait de soutenir le métabolisme des populations de spores de *Streptomyces* grâce à une stratégie énergétique originale, modifiant le bilan énergétique de façon à privilégier l'H<sub>2</sub>. Ceci rendrait la spore moins dépendante des ressources organiques moins accessibles, et serait contraire à l'addition des ressources telle que dans une mixotrophie classique.

### *Importance de l'HHA dans le bilan énergétique des spores*

Deuxièmement, la baisse drastique de la viabilité des spores du mutant de délétion pour *hhySL* montre l'importance de cette énergie dans le maintien du bilan énergétique des spores. Cette activité, confinée aux spores matures, pourrait alors être impliquée dans la persistance durant la dissémination, rôle que nous avons attribué à la mixotrophie de survie. Néanmoins, l'apport en H<sub>2</sub> entraîne une baisse d'expression des gènes du métabolisme secondaire. En particulier la baisse d'expression de *relA* est un signal majeur montrant que la spore abaisse sa réponse stringente, habituellement déclenchée par la baisse des ressources nutritionnelles, mais impactant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse ou la défense contre les antibiotiques, ainsi que d'autres signaux de stress cellulaire. La question d'amélioration de la persistance en présence de plus d'H<sub>2</sub> est donc à considérer avec précaution lorsque l'on replace cette espèce dans son milieu naturel.

### *Différents rôles physiologiques pour une même enzyme retrouvée chez deux actinobactéries*

Les mutations de délétion chez *S. avermitilis* tout comme chez *M. smegmatis* prouvent que les gènes considérés comme candidats potentiels dans l'expression d'une HHA, codent bien pour cette enzyme longtemps considérée comme abiotique. Mais, tandis qu'elle est exprimée et active uniquement dans les spores chez *S. avermitilis*, on la retrouve dans les phases végétative et stationnaire chez *M. smegmatis*. Chez cette dernière bactérie, elle semble impliquée dans la chaîne respiratoire durant la phase stationnaire mais aussi dans la régénération des accepteurs d'électrons oxydés (comme le NADH) lors de la croissance pour soutenir le métabolisme primaire (Greening *et al.*, 2014b). Ainsi, lorsque l'on compare ces deux études sur une hydrogénase du groupe 5 dans deux organismes différents, on remarque que celle-ci se voit attribuer deux rôles physiologiques différents, fait atypique sachant que les hydrogénases [NiFe] des 4 autres groupes sont connues pour n'avoir qu'un seul rôle qu'importe l'espèce. Ceci suggère que cette enzyme pourrait avoir plusieurs rôles selon la phase de développement et la structure cellulaire où elle est exprimée, suggérant un impact plus complexe que ses homologues des autres groupes en termes d'écophysiologie. Ainsi, nos résultats montrent que l'impact de l' $H_2$  sur une population bactérienne peut être relié à d'autres paramètres que la concentration en  $H_2$  et le  $K_{m(app)}$  de cette population : tandis qu'une augmentation de l' $H_2$  augmenterait directement la biomasse et la survie des *Mycobacterium* oxydant l' $H_2$ , cette réponse pourrait être différée chez les *Streptomyces* qui verraient plutôt un taux de survie plus élevé sur le long terme. Ceci implique donc que la versatilité métabolique apportée par l'HHA dépend de la régulation de son expression et serait, par exemple, plus importante chez *M. smegmatis* que chez les streptomycètes. Ce concept est important une fois replacé dans un contexte écologique où différentes espèces se côtoient et sont en compétition pour les ressources énergétiques, car nous avons deux bactéries modèles réagissant différemment à la présence d' $H_2$  à faible concentration, complexifiant dès lors la modélisation des mécanismes régissant la succession des bactéries oxydant l' $H_2$  dans le sol. Ainsi, même si l'impact de cette versatilité métabolique sur la juxtaposition des bactéries au sein de gradients de concentration d' $H_2$  demeure encore obscur, cette thèse de doctorat renforce la nécessité d'étudier l'activité d'oxydation de l' $H_2$  des différents groupes taxonomiques possédant l'HHA (Fig. 2). Ces études qui étaient à l'époque justifiées pour documenter la relation entre la phylogénie des HHA et leur affinité pour l' $H_2$  devraient maintenant considérer également la régulation de l'expression des gènes codant pour l'enzyme, déterminant sa versatilité métabolique. Il faudrait également étudier les liens possibles entre cette versatilité métabolique et le transfert latéral de l'enzyme. Le rôle physiologique de l'HHA a été étudié chez deux

actinobactéries seulement. Il est donc possible que l'étude d'un organisme issu d'un groupe taxonomique différent, telle qu'une acidobactérie dont l'activité de consommation du H<sub>2</sub> à haute affinité a été démontrée récemment (Greening *et al.*, 2015b), présente un autre rôle physiologique.

#### *Portée potentielle de la mixotrophie de survie en écologie microbienne*

En se tournant vers les études impliquant la survie bactérienne, on peut distinguer au moins trois domaines où ces résultats concernant la mixotrophie de survie pourraient apporter une avancée significative : la stabilité du microbiota de différents environnements, la dormance impliquée dans une survie à très long terme, ou bien la persistance au sein d'environnements agressifs pour la bactérie.

#### *La survie à très long terme*

Au sein d'environnements très anciens tels le permafrost ou des fragments d'ambres préhistoriques, on retrouve des bactéries viables après des milliers, voire millions d'années, de vie cryptique dans un environnement où les nutriments et l'énergie solaire sont quasi-inexistants (Gilichinsky *et al.*, 2008, Lambert *et al.*, 1998). Ainsi, malgré des conditions potentiellement optimales pour une préservation à long terme (froid, salinité ou dessiccation extrêmes), l'absence de source d'énergie aurait dû entraîner la dépurination de l'ADN et la racémisation des acides aminés, et ainsi empêcher l'anabiose après un aussi long terme. La survie sur un aussi long terme implique que l'organisme ait eu accès à une source d'énergie suffisante, constante, et biodisponible pour préserver sa structure et son matériel génétique, durant une période couvrant plusieurs périodes géologiques (Gilichinsky *et al.*, 2008). Son omniprésence dans la biosphère, sa faible énergie d'activation, sa capacité à diffuser au travers des membranes et sa transformation en électron et proton en présence de Fe(II), font de l'H<sub>2</sub> un candidat idéal comme source d'énergie dans ce type de survie (Morita, 1999). De fait, les résultats de cette thèse de doctorat montrent que, même à des concentrations inférieures au seuil nécessaire à la croissance, l'H<sub>2</sub> peut servir d'énergie et être au cœur d'une mixotrophie de survie, permettant une préservation du métabolisme minimal. La mixotrophie de survie pourrait ainsi être un des maillons manquant à la compréhension de la survie bactérienne à très long terme.

### *La stabilité du microbiota*

A bien plus court terme, la stabilité d'un microbiota dépend directement de la survie à long terme des espèces en dormance qui le compose, Cette population en dormance est plus ou moins importante selon l'environnement. Par exemple, en moyenne 20% des espèces microbiennes du microbiota intestinal humain, et jusqu'à 80% des espèces microbiennes dans le sol, sont en dormance (Lennon & Jones, 2011). Cette dormance permet de constituer une banque bactérienne permettant, en cas de perturbation de l'écosystème, la restauration de la diversité microbienne de l'environnement, et donc le maintien de ses services écosystémiques. Dans le cas contraire, la perte des services écosystémiques peut mener à des infections dans les cas médicaux, et, dans une optique plus agro-environnementale, à la perte de la qualité d'un sol et une prolifération des phytopathogènes, ou la prolifération d'espèces nuisibles dans l'eau (Clemente *et al.*, 2012, Giaramida *et al.*, 2013, Zaccardelli *et al.*, 2013). Ainsi, connaître l'abondance des bactéries en dormance utilisant cette mixotrophie de survie permettrait de mieux prévenir ces perturbations en préservant le cas échéant la banque de diversité bactérienne soutenue par ce métabolisme, à travers des pratiques médicales ou agricoles adéquates.

### *La survie face à un environnement hostile*

La dormance est aussi utilisée par les bactéries pour se protéger d'un environnement hostile à leur développement, comme des environnements contaminés par des produits toxiques, saturés en antibiotiques, ou disposant d'un système immunitaire. Plutôt que d'essayer de croître dans ces environnements hostiles, certaines bactéries vont préférer rentrer en dormance. La bactérie *M. smegmatis*, pathogène opportuniste possédant une HHA impliquée dans la survie lors de la phase stationnaire, sert justement de modèle à un pathogène très étudié : *Mycobacterium tuberculosis*. Durant sa phase végétative, responsable d'infections mortelles, cette bactérie possède une croissance rapide impliquant un métabolisme actif, et est sensible à certains antibiotiques tout comme au système immunitaire. Ceci contraste avec son stade de dormance, durant lequel la bactérie est extrêmement résistante aux antibiotiques. Sous cette forme, elle peut survivre durant plusieurs années avec un métabolisme quasi indétectable mais présent, sa susceptibilité sur le long terme à des antibiotiques étant signe d'un métabolisme actif (Comstock *et al.*, 1979).

Contrairement à *M. smegmatis*, la souche *M. tuberculosis* H37Rv possède dans son génome une CO-déshydrogénase, mais aucune hydrogénase. Cela dit, le corps humain rejetant

naturellement 2,3 ppmv de CO dans l'air expiré (jusqu'à 20 ppmv en cas d'infection ou de maladie pulmonaire, soit 100 fois plus que dans l'atmosphère), cette enzyme pourrait, à l'instar de l'HHA chez *M. smegmatis*, être au cœur du support énergétique de ce métabolisme minimal. Il a de plus été démontré que le CO est un activateur spécifique de la dormance chez cette espèce (Shiloh *et al.*, 2008), y compris à faibles concentrations. Bien que le rôle précis de cette CO-déshydrogénase soit encore controversé durant la phase végétative (détoxification du NO, du CO, source d'énergie et de carbone...), les résultats de l'étude concernant l'HHA chez *M. smegmatis* ont montré qu'une même enzyme peut avoir plusieurs rôles dépendamment de la phase de développement et la structure dans laquelle cette enzyme est exprimée.

Ainsi, son état de dormance, son métabolisme extrêmement réduit et la présence de cette CODH dans le génome, correspondraient aux prérequis à l'existence d'une mixotrophie de survie chez *M. tuberculosis*. Confirmer la présence de ce mode métabolique particulier permettrait alors de mieux éliminer les populations pathogènes en dormance en ciblant le cœur du métabolisme que serait la CODH. La bactérie *M. tuberculosis* n'est sans doute qu'un exemple parmi de nombreuses bactéries pathogènes oxydant les gaz traces et capables de dormance. À travers un angle d'approche différent, l'idée concernant des antibiotiques ciblant les hydrogénases a d'ailleurs déjà été émise (Nie *et al.*, 2012), mais pourrait s'élargir à d'autres enzymes si l'on prend en compte les résultats de cette thèse.

En résumé, la mixotrophie de survie pourrait être importante dans diverses thématiques de recherche, tout en impliquant d'autres enzymes que l'HHA étudiée dans cette thèse. C'est donc pour quantifier la distribution de ce mode métabolique au sein de populations en dormance, que je compte présenter dans le prochain chapitre de nouvelles perspectives de recherches dont le but est de mieux caractériser la mixotrophie de survie d'un point de vue fonctionnel, pour ensuite partir à sa recherche au sein de divers environnements.

## VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos résultats a permis de poser les bases du concept de mixotrophie de survie, pouvant se révéler fondamental en écologie microbienne. Néanmoins, il paraît nécessaire d'étoffer nos résultats via d'autres techniques dans le but d'affiner et rendre plus robuste notre modèle de métabolisme.

Dans ces perspectives, je commencerai donc par décrire les étapes nécessaires pour poursuivre des recherches à partir de nos résultats transcriptomiques des spores de *S. avermitilis* afin de générer une base de connaissances fondamentales sur la régulation de la mixotrophie de survie. Ensuite, je proposerai des solutions pratiques visant à estimer la distribution et la diversité de substrat de la mixotrophie de survie au sein des bactéries du sol, ainsi que son influence dans la juxtaposition des bactéries hydrogénévores au sein des gradients d'H<sub>2</sub>.

### 1. Au sein de *Streptomyces avermitilis*

#### *Régulation de la mixotrophie de survie*

L'expression de l'HHA exclusive aux spores soulève une question fondamentale sur les mécanismes de régulation de la mixotrophie de survie chez les streptomycètes. Les données obtenues jusqu'à maintenant ne permettent pas de savoir si l'expression de l'HHA est constitutive ou modulée en fonction de la disponibilité des sources d'énergies organiques dans le milieu. Cette question est essentielle pour bien comprendre les bases fondamentales de la mixotrophie de survie chez les streptomycètes, mais également prédire la réponse de l'activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> suite à des perturbations de l'environnement (e.g. application de fertilisants, labour, inondations, etc.). Comme l'HHA n'est exprimée que dans les spores de *S. avermitilis*, il est *a priori* impossible de connaître son impact et sa régulation dans une mixotrophie en présence de nutriments organiques et inorganiques en grandes quantités, car la spore risquerait de rentrer en germination. Un mutant de délétion pour la protéine MreB, nécessaire au déclenchement de la germination, pourrait être utilisé pour disposer des spores face à différents environnements riches ou pauvres en nutriments organiques et en H<sub>2</sub>, sans déclencher la germination. Dès lors, une quantification des métabolites dans le milieu, et de l'expression de certains gènes du métabolisme central par qPCR, permettrait de s'assurer que, malgré une saturation en nutriments organiques, la spore privilégie toujours l'H<sub>2</sub>.

### *Localisation de l'HHA*

Selon le modèle métabolique proposé, l'HHA de *S. avermitilis* serait en lien avec la membrane pour générer un gradient de protons tout en dirigeant ses électrons dans le *pool* de quinones. Démontrer clairement cette localisation membranaire est donc une priorité pour confirmer son rôle physiologique de maintien de l'équilibre énergétique, sachant qu'aucune séquence connue d'ancrage à la membrane n'est détectée dans les différentes hydrogénases du groupe 5. Certains arguments indirects, comme la baisse d'expression de la NADH déshydrogénase observée en saturant l'HHA de *S. avermitilis* avec l'H<sub>2</sub> ou plus directs, comme les études biochimiques de base chez *M. smegmatis* (Greening *et al.*, 2014b) et *Pyrinomonas methylaliphatogenes* (Greening *et al.*, 2015b), sont compatibles avec une localisation de l'HHA au niveau de la membrane cytoplasmique. Par exemple, le lysat de *P. methylaliphatogenes* fractionné puis séparé sur gel de polyacrylamide, montre des résidus de l'activité d'oxydation à haute affinité dans la fraction membranaire, suggérant selon les auteurs, une association faible avec la membrane. Mais ces résultats, par ailleurs spéculatifs dans ce dernier cas, ne donnent aucune indication quant à la formation d'un gradient de protons.

Établir le lien entre hydrogénase et gradient de protons (et donc interaction avec la membrane) pourra être fait via l'utilisation de ionophores comme le carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) ou le 2,4-Dinitrophénol (2,4-DNP). En servant de transporteurs d'ions mobiles à l'intérieur de la bicouche lipidique ou en agissant comme des canaux ioniques, ces ionophores augmentant la perméabilité spécifique de la membrane pour certains ions inorganiques comme l'H<sup>+</sup>, et donc découplent l'ATP synthase. Cela entraînerait l'inhibition de l'oxydation de l'H<sub>2</sub> par l'hydrogénase (en supprimant l'efflux d'H<sup>+</sup>) si celle-ci est en lien avec le gradient de protons périplasmique. Il serait aussi possible d'isoler la membrane des spores de *Streptomyces* avec des protocoles standards (Quiros *et al.*, 1986) et d'en séparer les protéines sur gel natif de polyacrylamide, puis de rechercher une activité d'oxydation de l'H<sub>2</sub> (Nishimura *et al.*, 2010, Quiros *et al.*, 1986).

### *L'accepteur physiologique d'électrons*

Comprendre le rôle physiologique de l'HHA passe aussi par la découverte de son accepteur d'électron physiologique. La recherche de cette molécule est, chez *S. avermitilis*, une piste complexe, étant donné la présence dans le génome de *S. avermitilis* d'au moins 33 gènes codant pour des cytochromes P450 potentiels, et quatre pour des ferredoxines, chacun pouvant

faire théoriquement office d'accepteur physiologique d'électrons, en plus d'autres métabolites (e.g.: FADH, NADH, etc.) et de gènes inconnus. Néanmoins, il semble que cette hydrogénase fut acquise par transfert latéral (Constant *et al.*, 2011b, Schwartz *et al.*, 2013), l'on peut donc penser que son accepteur physiologique d'électron fut transféré en même temps, et donc proche ou dans l'un des opérons codant pour les différentes protéines impliquées dans la synthèse et la maturation de l'enzyme. Il existe effectivement 4 *ORF* inconnus entre *hhyL* et *hupD*, dont l'*ORF SAV\_7369* qui contient 8 résidus Cystéines potentiellement impliqués dans la formation et la coordination de structures [FeS], classiquement utilisées dans les transferts d'électrons. Cette protéine inconnue pouvant correspondre à l'accepteur physiologique primaire d'électron, une investigation plus approfondie devrait nécessairement précéder toute autre recherche d'un accepteur d'électrons différent.

#### *Complémenter l'étude transcriptomique*

L'étude transcriptomique des spores de *S. avermitilis* a amené beaucoup d'informations sur les voies modulées par l'oxydation de l'H<sub>2</sub>. Néanmoins, il faut tenir compte de l'absence possible de corrélation entre transcriptome, protéome et métabolome. Le transcriptome d'une cellule est un ensemble de gènes transcrits, le protéome est l'ensemble des protéines résultant de la traduction des ARNm, tandis qu'un métabolome est l'ensemble des métabolites intra- et/ou extracellulaires, incluant sucres, lipides, acides aminés, peptides et autres biomolécules, dont la chimie est très diversifiée. Il existe dans la littérature des exemples de corrélations entre ces trois expériences (le plus souvent seulement deux), un exemple intéressant étant celui de *Pyrococcus furiosus* cultivée à 95 et 72°C (Trauger *et al.*, 2008). Dans cette étude, le métabolome sert de base pour le reste de l'étude, ce qui diffère de la plupart des autres articles se basant avant tout sur le transcriptome pour donner une direction à la suite des recherches. Se baser sur le transcriptome permet de savoir sur quelles protéines et biomolécules diriger l'analyse par spectrométrie de masse car, tandis que le transcriptome procure des données précises sur le niveau d'expression de la majorité des gènes exprimés, la spectrométrie de masse ne permet pas d'avoir autant de protéines et biomolécules dont l'identification est sûre au-delà du seuil de confiance de 95% nécessaire. Par exemple, pour 2065 transcrits détectés sur la micropuce de l'étude menée par Trauger *et al.* (Trauger *et al.*, 2008), seules 195 protéines ont pu leur être clairement associées par les auteurs de l'étude. Chez les bactéries, on retrouve souvent une bonne corrélation entre abondance des ARNm et des protéines correspondantes (Vogel & Marcotte, 2012). La différence d'abondance des protéines entre les deux conditions est souvent supérieure à celui prédit par le transcriptome, étant donné que le recyclage des

ARNm (en moyenne ~7 min chez les bactéries) (Vogel & Marcotte, 2012) est bien plus rapide que celui des protéines, et qu'un ARNm peut être traduit plusieurs fois. Effectivement, dans l'article sur *P. furiosus*, lorsque le transcriptome montre des sous-expressions entre -2 et -4, le protéome se situe plus dans des ratios entre -4 et -8, montrant qu'une faible différence de transcrits peut se traduire par une différence plus large dans l'abondance des protéines. Il est donc important de ne pas sous-estimer une variation d'expression subjectivement faible.

L'identification des métabolites ainsi que leur position dans les voies métaboliques permet deux choses : d'une part, appuyer les conclusions tirées de l'étude transcriptomique et éclaircir certaines zones d'ombres (concentration en NADH, en ATP, en antibiotiques, etc.), et d'autre part, permet de découvrir des métabolites différentiellement abondants dont les voies de synthèse sont soit inconnues, soit dont l'abondance n'est pas due à une différence d'expression de gènes mais plutôt une régulation allostérique. Cela peut être le cas pour certaines enzymes du métabolisme central (Chubukov *et al.*, 2013). L'étude de ces métabolites peut aussi potentiellement mener à la découverte de nouvelles voies de synthèse (Loots du, 2014) étant donné le grand nombre de gènes et opérons dont les fonctions sont inconnues.

A la suite de nos résultats, notre hypothèse est que l'énergie provient plus de l'hydrogénase et moins du métabolisme central, mais que la quantité d'ATP / mg de protéines ne varie pas obligatoirement, le bilan énergétique restant le même pour maintenir le métabolisme minimal. Ceci pourrait être démontré grâce à une quantification par spectrométrie de masse de métabolites spécifiques :

1. On pourrait comparer le rapport phosphoénolpyruvate (PEP) / pyruvate dans les spores en condition aH<sub>2</sub> ou eH<sub>2</sub>. Effectivement, plus la glycolyse est inhibée, plus le rapport PEP / pyruvate augmente. Par exemple, lors de la croissance de *Staphylococcus lactis* et d'autres bactéries à Gram-positif, le rapport PEP / Pyruvate est inférieur à 0,1, tandis qu'il est supérieur à 10 lors de la dormance (Mason *et al.*, 1981, Thompson & Torchia, 1984). Ceci est dû à l'activation de la pyruvatekinase par le fructose 1,6-biphosphate. Cette synthase est d'ailleurs sous-exprimée en condition eH<sub>2</sub> dans notre étude (Tableau A1). Ainsi, un rapport PEP / Pyruvate supérieur en condition eH<sub>2</sub> par rapport à la condition aH<sub>2</sub> confirmerait l'inhibition de la glycolyse.
2. Suivant la même logique, on pourrait comparer le rapport succinyl-CoA / Semialdehyde succinique dans les deux conditions d'exposition à l'H<sub>2</sub>. En cas d'inhibition du catabolisme de l'acétyl-CoA par le cycle TCA, le rapport succinyl-CoA / Semialdehyde succinique devrait être supérieur dans la condition eH<sub>2</sub> par rapport à la condition aH<sub>2</sub>.

Ceci démontrerait que le cycle TCA va effectivement dans le sens de l'anabolisme ou vers la voie du glyoxylate pour ne pas entraîner l'arrêt du cycle TCA lors d'une baisse dans l'apport de nutriments (Cronan & Laporte, 2006). L'utilisation de la voie du glyoxylate augmentant la concentration en malate ou en oxaloacétate, ces métabolites pourraient aussi être quantifiés pour confirmer ou infirmer une utilisation supérieure de cette voie de dérivation dans la condition eH<sub>2</sub> par rapport à la condition aH<sub>2</sub>.

3. Finalement, on pourrait quantifier l'ATP dans les spores. Si la concentration d'ATP par unité de biomasse est identique dans les conditions aH<sub>2</sub> et eH<sub>2</sub>, ceci indique que le bilan énergétique reste effectivement le même, seul l'apport des sources d'énergie change. Si la concentration d'ATP augmente lors de l'enrichissement en H<sub>2</sub>, cela suggère que l'HHA amène un surplus d'énergie, dont le devenir devrait être étudié. Une quantification des molécules connues pour servir de réserves énergétiques chez les actinobactéries, comme le tréhalose (McBride & Ensign, 1987) ou les triacylglycérols (Olukoshi & Packter, 1994), pourrait alors être entreprise. Si finalement ce taux baisse, ceci peut être à cause de la sous-expression des enzymes des métabolismes primaire et secondaire, entraînant une baisse de l'énergie nécessaire à la synthèse protéique, à confirmer à l'aide d'une étude protéomique.

La seconde hypothèse concerne le métabolisme secondaire est que la sous-expression de *relA* dans la condition eH<sub>2</sub> entraîne une baisse de la synthèse des antibiotiques. Encore une fois, le métabolome permettra de quantifier tout d'abord le ppGpp, puis les différents antibiotiques connus dans cet organisme, en particulier les polykétides et les microcines dont les gènes ont montré une sous-expression dans la condition eH<sub>2</sub> de notre transcriptome

Toutes ces expériences ont pour but d'obtenir une base expérimentale et des connaissances solides pour le développement des deux derniers points présenté ci-dessous.

## **2. Diversité et abondance de la mixotrophie de survie**

Dans mon introduction, j'ai présenté deux concepts centraux pour saisir l'importance des perspectives qui vont suivre. Tout d'abord, la majorité des genres bactériens ont adopté la mixotrophie comme mode trophique pour leur croissance, ceci autant sur terre qu'en mer (Eiler, 2006). Ensuite, dans les sols, les bactéries sont le plus souvent en présence d'une grande diversité de nutriments et alternent entre festin et famine, le manque de nutriments étant plus

fréquent que l'abondance (Kjelleberg, 1998). Pour résumer, dans les sols, où la mixotrophie est ubiquitaire, les bactéries sont fréquemment en survie, plus rarement en croissance.

Les résultats de notre étude transcriptomique ainsi que la mutation de délétion de l'HHA de *S. avermitilis* ont permis de poser les bases du concept de la mixotrophie de survie, équilibrant le bilan énergétique d'origine organique et inorganique dans les spores, censé privilégier la persistance plutôt que la biomasse. Etant donné l'ubiquité de la mixotrophie de croissance dans le monde bactérien, il est envisageable que la mixotrophie de survie puisse se retrouver elle aussi au sein de nombreux genres bactériens, en œuvre tant dans des spores que lors de phases de dormance, et ce à travers l'utilisation d'autres molécules inorganiques que l'H<sub>2</sub>. Dans une logique de simplification, nous allons ici nous concentrer sur les gaz atmosphériques à état de traces comme substrats inorganiques. Ces derniers ont effectivement l'avantage d'être disponibles de façon virtuellement illimitée pour les bactéries.

L'activité hydrogénase à haute affinité atteint son pic lors de la carence en nutriments, soit lorsque les microorganismes entrent dans une phase de dormance ou de spore (Constant *et al.*, 2008, Greening *et al.*, 2014b). Grâce aux modèles permettant d'estimer la population bactérienne soutenue par un métabolite précis (Conrad, 1996, Tjihuis *et al.*, 1993), nous savons que l'H<sub>2</sub> atmosphérique peut subvenir au métabolisme minimal d'une population de  $2,3 \times 10^7$  bactéries par g de sol. La présence dans les sols de  $10^6$  à  $10^8$  copies du gène *hhyL* (Constant *et al.*, 2011b) concorde avec ces données, un plus grand nombre de copies pouvant être expliquée par un métabolisme mixotrophique des nutriments restants, soutenant ainsi une population plus large, la présence de bactéries possédant un gène *hhyL* non-fonctionnel (comme chez *R. eutropha*) ou bien fonctionnel mais non-exprimé (comme lors de la phase de croissance chez les *Streptomyces*).

De même, le CO atmosphérique à état de traces a déjà été identifié comme substrat inorganique en mixotrophie (King & Weber, 2007). Certaines bactéries oxydent donc le CO atmosphérique (0,2 ppmv) à l'aide d'une déshydrogénase du monoxyde de carbone (CODH) sans que cette énergie ne contribue à augmenter la biomasse. Avec une énergie de Gibbs de -235 kJ par mole de CO, ce gaz pourrait soutenir une population de  $2,5 \times 10^7$  carboxydovores par g de sol. En effet, une carence en nutriments d'un sol pourrait être liée à l'augmentation de l'oxydation du CO (Lalonde & Constant, 2015). Ainsi, en l'absence d'énergie d'origine organique, le CO et l'H<sub>2</sub> à eux seuls pourraient maintenir le métabolisme minimal d'une population de  $5 \times 10^7$  bactéries par g de sol, soit 5% de la population bactérienne maximale ( $10^9$  bactéries par g de sol) (Roesch *et al.*, 2007).

Tenant compte de ces éléments, il sera pertinent d'élucider la potentielle existence d'une mixotrophie de survie en reprenant le mode opératoire cité ci-dessus pour *S. avermitilis*, avec différentes bactéries oxydant des gaz à haute affinité : tout d'abord, s'assurer d'une oxydation lors de la phase de dormance sans augmentation de biomasse. Si cette condition est vérifiée, un transcriptome et métabolome durant la phase de dormance (ou sur les spores) permettra de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une mixotrophie de survie. Finalement, une mutation de délétion du gène codant pour l'enzyme oxydant ce gaz (*hhyL* pour les hydrogénovores et *coxL* pour les carboxydovores (Quiza *et al.*, 2014)) permettra d'analyser l'impact de cette délétion sur la viabilité et la survie à plus ou moins long terme des bactéries. Certaines bactéries, telles que *M. smegmatis*, possèdent une HHA ainsi qu'une CODH (King, 2003), pouvant révéler l'existence d'une mixotrophie de survie basée sur plus d'une molécule inorganique, complexifiant encore plus la place des énergies d'origine organique et inorganique dans le bilan énergétique. Ainsi, ces données permettront de mesurer l'étendue de la mixotrophie de survie au sein des populations capables de dormance, au sein de divers environnements.

### **3. Facteurs déterminant la juxtaposition des populations**

Comme nous l'avons vu précédemment, le paradigme voulant que la juxtaposition des populations hydrogénovores soit dépendante de la seule concentration en  $H_2$  est remis en cause par une régulation différente de l'expression des HHA chez différentes espèces, malgré une même affinité pour leur substrat. Effectivement, ce modèle était basé sur l'implication de l'HHA au sein du seul type de mixotrophie classique, et dans lequel l'augmentation de l'énergie disponible pour chaque espèce est proportionnelle à la concentration en substrat. La découverte pour cette enzyme, d'un rôle écophysologique alternatif au sein d'une nouvelle forme de mixotrophie, n'impliquant aucune croissance, remet ce modèle en cause. Ainsi, il devient nécessaire de déterminer le poids de ces deux facteurs (affinité et régulation) dans la juxtaposition des espèces au sein de leur biotope, et ce durant les phases de croissance, de famine, et de retour des nutriments dans l'environnement.

L'expérience pourrait prendre la forme de compétitions inter-bactériennes au sein d'un sol stérile impliquant deux espèces dont les HHA auraient une même affinité mais un rôle écophysologique différent, et ce durant plusieurs cycles de développement. A l'aide d'une quantification d'un marqueur spécifique pour ces deux espèces, il sera ainsi possible de déterminer leur distribution au fil du temps, en fonction du nombre de cycles de vie et de la durée de la période de famine. Ceci permettra de pondérer l'importance de l'affinité et de la

régulation de l'expression de l'HHA dans la juxtaposition des populations de bactéries exprimant une HHA, en fonction des variations de l'environnement. Ces mêmes expériences pourront être transposées aux populations oxydant d'autres gaz à état de traces, si toutefois on y retrouve la même versatilité métabolique que chez les bactéries ayant une haute affinité pour l'H<sub>2</sub>.

#### **4. Conclusion**

La synthèse des résultats qui seraient obtenus suivant les expériences proposées ici devrait servir à estimer l'ubiquité et la diversité de substrat impliquée dans la mixotrophie de survie, ainsi que l'abondance et la distribution de ce mode trophique au sein des différents genres bactériens dans le sol. Si ce mode trophique se révèle largement répandu et non une exception, nous pourrions alors avoir une meilleure compréhension des mécanismes et du dynamisme de la persistance du microbiota du sol lors des périodes de famine, ouvrant ainsi à de nouvelles possibilités concernant sa préservation. Il restera à espérer que ce concept gagne en notoriété et s'élargisse aux autres environnements, la question de persistance bactérienne étant, comme vu dans le chapitre précédent, un enjeu fondamental, englobant tant l'environnement (Conrad, 1996), l'agriculture (Cardon & Whitbeck, 2011) que la santé (Zacharia & Shiloh, 2012).

## VII. RÉFÉRENCES

- Alf S, Per JH & Diane KS (2000) Physiology of the Mixotrophic Dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. I. Effects of Phagotrophy and Irradiance on Photosynthesis and Carbon Content. *Marine Ecology Progress Series* 201:129-136.
- Angert ER (2005) Alternatives to Binary Fission in Bacteria. *Nat Rev Micro* 3(3):214-224.
- Anuchin AM, Mulyukin AL, Suzina NE, Duda VI, El-Registan GI & Kaprelyants AS (2009) Dormant Forms of *Mycobacterium smegmatis* with Distinct Morphology. *Microbiology* 155(4):1071-1079.
- Barros M, Rawlings D & Woods D (1984) Mixotrophic Growth of a *Thiobacillus ferrooxidans* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* 47(3):593-595.
- Benner SA (2010) Defining Life. *Astrobiology* 10(10):1021-1030.
- Berg J, Tymoczko J & Stryer L (2002) *Biochemistry*  
W H Freeman, New York, 5th edition
- Berney M & Cook GM (2010) Unique Flexibility in Energy Metabolism Allows *Mycobacteria* to Combat Starvation and Hypoxia. *PLoS ONE* 5(1):e8614.
- Bibb M (1996) The Regulation of Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* 142(6):1335-1344.
- Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A & Team tG (2010) Manipulation of FASTQ Data With Galaxy. *Bioinformatics* 26(14):1783-1785.
- Bleijlevens B, Buhrke T, van der Linden E, Friedrich B & Albracht SPJ (2004) The Auxiliary Protein HypX Provides Oxygen Tolerance to the Soluble [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by Way of a Cyanide Ligand to Nickel. *Journal of Biological Chemistry* 279(45):46686-46691.
- Brana A, Mendez C, Diaz L, Manzanal M & Hardisson C (1986) Glycogen and Trehalose Accumulation during Colony Development in *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology* 132(5):1319-1326.
- Brandis A & Thauer RK (1981) Growth of *Desulfovibrio* species on Hydrogen and Sulphate as Sole Energy Source. *Microbiology* 126(1):249-252.
- Brugna-Guiral M, Tron P, Nitschke W, Stetter K, Burlat B, Guigliarelli B, Bruschi M & Giudici-Orticoni M (2003) [NiFe] Hydrogenases from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Properties, Function, and Phylogenetics. *Extremophiles* 7(2):145-157.
- Bryant FO & Adams MW (1989) Characterization of Hydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* 264(9):5070-5079.

- Buhrke T, Lenz O, Porthun A & Friedrich B (2004) The H<sub>2</sub>-sensing Complex of *Ralstonia eutropha*: Interaction Between a Regulatory [NiFe] Hydrogenase and a Histidine Protein Kinase. *Molecular Microbiology* 51(6):1677-1689.
- Buhrke T, Löscher S, Lenz O, Schlodder E, Zebger I, Andersen LK, Hildebrandt P, Meyer-Klaucke W, Dau H, Friedrich B & Haumann M (2005) Reduction of Unusual Iron-Sulfur Clusters in the H<sub>2</sub>-sensing Regulatory Ni-Fe Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Biological Chemistry* 280(20):19488-19495.
- Burgdorf T, Lenz O, Buhrke T, van der Linden E, Jones A, Albracht S & Friedrich B (2005) [NiFe]-Hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular Enzymes for Oxygen-Tolerant Biological Hydrogen Oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 10(2-4):181-196.
- Cardon Z & Whitbeck J (2011) *The Rhizosphere: An Ecological Perspective*. Academic press,
- Casalot L & Rousset M (2001) Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends in Microbiology* 9(5):228-237.
- Chakraborty R & Bibb M (1997) The ppGpp Synthetase Gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Plays a Conditional Role in Antibiotic Production and Morphological Differentiation. *Journal of Bacteriology* 179(18):5854-5861.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N & Alland D (2007) A Detailed Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene Segments for the Diagnosis of Pathogenic Bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 69(2):330-339.
- Chubukov V, Uhr M, Le Chat L, Kleijn RJ, Jules M, Link H, Aymerich S, Stelling J & Sauer U (2013) Transcriptional Regulation is Insufficient to Explain Substrate-Induced Flux Changes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology* 9(1).
- Claessen D, Stokroos I, Deelstra HJ, Penninga NA, Bormann C, Salas JA, Dijkhuizen L & Wösten HAB (2004) The Formation of the Rodlet Layer of Streptomyces is the Result of the Interplay Between Rodlins and Chaplins. *Molecular Microbiology* 53(2):433-443.
- Clemente Jose C, Ursell Luke K, Parfrey Laura W & Knight R (2012) The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 148(6):1258-1270.
- Comstock G, Baum C & Snider DJ (1979) Isoniazid Prophylaxis Among Alaskan Eskimos: a Final Report of the Bethel Isoniazid Studies. *The American review of respiratory disease* 119(5):827-830.
- Conrad R (1996) Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiology Review* 60(4):609-640.
- Conrad R, Aragno M & Seiler W (1983) The Inability of Hydrogen Bacteria to Utilize Atmospheric Hydrogen is Due to Threshold and Affinity for Hydrogen. *FEMS Microbiology Letters* 18(3):207-210.

- Conrad R, Phelps T & Zeikus J (1985) Gas Metabolism Evidence in Support of the Juxtaposition of Hydrogen-Producing and Methanogenic Bacteria in Sewage Sludge and Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 50(3):595-601.
- Constant P, Chowdhury SP, Hesse L & Conrad R (2011a) Co-Localization of Atmospheric H<sub>2</sub> Oxidation Activity and High Affinity H<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria in Non-Axenic Soil and Sterile Soil Amended with *Streptomyces* sp. PCB7. *Soil Biology and Biochemistry* 43(9):1888-1893.
- Constant P, Chowdhury SP, Hesse L, Pratscher J & Conrad R (2011b) Genome Data Mining and Soil Survey for the Novel Group 5 [NiFe]-Hydrogenase to Explore the Diversity and Ecological Importance of Presumptive High Affinity H<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 77(17):6027–6035.
- Constant P, Chowdhury SP, Pratscher J & Conrad R (2010) Streptomycetes Contributing to Atmospheric Molecular Hydrogen Soil Uptake are Widespread and Encode a Putative High-Affinity [NiFe]-Hydrogenase. *Environmental Microbiology* 12(3):821-829.
- Constant P, Poissant L & Villemur R (2008) Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the First Microorganism Demonstrating High-Affinity Uptake of Tropospheric H<sub>2</sub>. *The ISME Journal* 2(10):1066-1076.
- Constant P, Poissant L & Villemur R (2009) Tropospheric H<sub>2</sub> budget and the Response of Its Soil Uptake Under the Changing Environment. *Science of The Total Environment* 407(6):1809-1823.
- Cramm R (2009) Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16(1-2):38-52.
- Cronan J, J & Laporte D (2006) Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass. *EcoSal Plus* doi:10.1128/ecosalplus.3.5.2.
- Cunningham SD, Kapulnik Y & Phillips DA (1986) Distribution of Hydrogen-Metabolizing Bacteria in Alfalfa Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 52(5):1091-1095.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12):6640-6645.
- Deckers HM, Wilson FR & Voordouw G (1990) Cloning and Sequencing of a [NiFe] Hydrogenase Operon from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Microbiology* 136(10):2021-2028.
- DeJong P & McCoy E (1966) Qualitative Analyses of Vegetative Cell Walls and Spore Walls of Some Representative Species of *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology* 12(5):985-994.
- Denoya C, Fedechko R, Hafner E, McArthur H, Morgenstern M, Skinner D, Stutzman-Engwall K, Wax R & Wernau W (1995) A Second Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Gene Cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces avermitilis* : Its Relationship to Avermectin Biosynthesis and the Construction of a *bkdF* Mutant Suitable for the Production of Novel Antiparasitic Avermectins. *Journal of Bacteriology* 177(12):3504-3511.

- Deppenmeier U (2002) Redox-Driven Proton Translocation in Methanogenic Archaea. *Cellular and Molecular Life Science* 59:1513-1533.
- Dong Z & Layzell D (2001) H<sub>2</sub> Oxidation, O<sub>2</sub> Uptake and CO<sub>2</sub> Fixation in Hydrogen Treated Soils. *Plant and Soil* 229(1):1-12.
- Ehhalt D & Rohrer F (2009) The Tropospheric Cycle of H<sub>2</sub> : a Critical Review. *Tellus B* 61(3):500-535.
- Eiler A (2006) Evidence for the Ubiquity of Mixotrophic Bacteria in the Upper Ocean: Implications and Consequences. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12):7431-7437.
- Elsen S, Duché O & Colbeau A (2003) Interaction Between the H<sub>2</sub> Sensor HupUV and the Histidine Kinase HupT Controls HupSL Hydrogenase Synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* 185(24):7111-7119.
- Eisenberg RJ & Pardee AB (1969) DNA Replication During Episome Transfer as Studied by Bromodeoxyuridine Photosensitization. *Journal of Molecular Biology* 46(2):355-358.
- Ensign J (1978) Formation, Properties, and Germination of Actinomycete Spores. *Annual Review of Microbiology* Vol. 32:(DOI: 10.1146/annurev.mi.32.100178.001153):185-219.
- Fenton AW, Paricharttanakul NM & Reinhart GD (2003) Identification of Substrate Contact Residues Important for the Allosteric Regulation of Phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42(21):6453-6459.
- Flårdh K & Buttner MJ (2009) *Streptomyces* Morphogenetics: Dissecting Differentiation in a Filamentous Bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 7(1):36-49.
- Flett F, Mersinias V & Smith CP (1997) High Efficiency Intergeneric Conjugal Transfer of Plasmid DNA from *Escherichia coli* to Methyl DNA-Restricting Streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 155(2):223-229.
- Friedrich C (1982) Depression of Hydrogenase During Limitation of Electron Donors and Derepression of Ribulosebisphosphate Carboxylase During Carbon Limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 149(1):203-210.
- Friedrich CG, Friedrich B & Bowien B (1981) Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism During Heterotrophic Growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology* 122(1):69-78.
- Fritsch J, Scheerer P, Frielingsdorf S, Kroschinsky S, Friedrich B, Lenz O & Spahn CMT (2011) The Crystal Structure of an Oxygen-Tolerant Hydrogenase Uncovers a Novel Iron-Sulphur Centre. *Nature* 479(7372):249-252.
- Fung DK, Chan EW, Chin ML & Chan RC (2010) Delineation of a Bacterial Starvation Stress Response Network Which Can Mediate Antibiotic Tolerance Development. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 54(3):1082-1093.
- Gatewood ML & Jones GH (2010) (p)ppGpp Inhibits Polynucleotide Phosphorylase from *Streptomyces* but Not from *Escherichia coli* and Increases the Stability of Bulk mRNA in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* 192(17):4275-4280.

- Gene Ontology Consortium (2004) The Gene Ontology (GO) Database and Informatics Resource. *Nucleic acids research* 32(suppl 1):D258-D261.
- Giaramida L, Manage PM, Edwards C, Singh BK & Lawton LA (2013) Bacterial Communities' Response to Microcystins Exposure and Nutrient Availability: Linking Degradation Capacity to Community Structure. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84:111-117.
- Gilichinsky D, Vishnivetskaya T, Petrova M, Spirina E, Mamykin V & Rivkina E (2008) Bacteria in Permafrost. *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, Margesin R, Schinner F, Marx J-C & Gerday C (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 10.1007/978-3-540-74335-4\_6. p 83-102.
- Gottschal J & Kuenen JG (1980) Mixotrophic Growth of *Thiobacillus* A2 on Acetate and Thiosulfate as Growth Limiting Substrates in the Chemostat. *Arch. Microbiol.* 126(1):33-42.
- Greening C, Berney M, Hards K, Cook GM & Conrad R (2014a) A Soil Actinobacterium Scavenges Atmospheric H<sub>2</sub> Using Two Membrane-Associated, Oxygen-Dependent [NiFe] Hydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(11):4257-4261.
- Greening C, Biswas A, Carere CR, Jackson CJ, Taylor MC, Stott MB, Cook GM & Morales SE (2015a) Genomic and Metagenomic Surveys of Hydrogenase Distribution Indicate H<sub>2</sub> is a Widely Utilised Energy Source for Microbial Growth and Survival. *ISME Journal* 10.1038/ismej.2015.153.
- Greening C, Carere CR, Rushton-Green R, Harold LK, Hards K, Taylor MC, Morales SE, Stott MB & Cook GM (2015b) Persistence of the Dominant Soil Phylum Acidobacteria by Trace Gas Scavenging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(33):10497-10502.
- Greening C, Villas-Bôas SG, Robson JR, Berney M & Cook GM (2014b) The Growth and Survival of *Mycobacterium smegmatis* Is Enhanced by Co-Metabolism of Atmospheric H<sub>2</sub>. *PLoS ONE* 9(7):e103034.
- Gregory MA, Till R & Smith MCM (2003) Integration Site for Streptomyces Phage φBT1 and Development of Site-Specific Integrating Vectors. *Journal of Bacteriology* 185(17):5320-5323.
- Guiral M, Aubert C & Giudici-Ortoni M (2005) Hydrogen Metabolism in the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochemical Society Transaction* 33:22-24.
- Gunnarsson N, Mortensen UH, Sosio M & Nielsen J (2004) Identification of the Entner–Doudoroff Pathway in an Antibiotic-Producing Actinomycete Species. *Molecular Microbiology* 52(3):895-902.
- Gusek TW & Kinsella JE (1992) Review of the *Streptomyces lividans*/vector pIJ702 System for Gene Cloning. *Critical reviews in microbiology* 18(4):247-260.
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T & Chater KF (2003) PCR-Targeted *Streptomyces* Gene Replacement Identifies a Protein Domain Needed for Biosynthesis of the Sesquiterpene Soil Odor Geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(4):1541-1546.

- Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ & Chater KF (2004)  $\lambda$  Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. *Advances in Applied Microbiology* 54:107-128.
- Häring V & Conrad R (1994) Demonstration of Two Different H<sub>2</sub>-Oxidizing Activities in Soil Using an H<sub>2</sub> Consumption and a Tritium Exchange Assay. *Biology and Fertility of Soils* 17(2):125-128.
- Hauriyluk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T & Gerdes K (2015) Recent Functional Insights Into the Role of (p)ppGpp in Bacterial Physiology. *Nature Review Microbiology* 13(5):298-309.
- Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell DB, Bibb MJ & Chater KF (2002) Primary and Secondary Metabolism, and Post-Translational Protein Modifications, as Portrayed by Proteomic Analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 46(4):917-932.
- Hey-Ferguson A, Mitchell M & Elbein A (1973) Trehalose Metabolism in Germinating Spores of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology* 116(2):1084-1085.
- Hoch GE, Little HN & Burris RH (1957) Hydrogen Evolution from Soy-Bean Root Nodules. *Nature* 179(4556):430-431.
- Horch M, Lauterbach L, Saggiu M, Hildebrandt P, Lenzian F, Bittl R, Lenz O & Zebger I (2010) Probing the Active Site of an O<sub>2</sub>-Tolerant NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by In Situ EPR and FTIR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* 49(43):8026-8029.
- Hoyt S & Jones GH (1999) *relA* Is Required for Actinomycin Production in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Bacteriology* 181(12):3824-3829.
- Huang H, Zheng G, Jiang W, Hu H & Lu Y (2015) One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47(4):231-243.
- Hunt S, Gaito S & Layzell D (1988) Model of Gas Exchange and Diffusion in Legume Nodules. *Planta* 173(1):128-141.
- Hunt S & Layzell DB (1993) Gas Exchange of Legume Nodules and the Regulation of Nitrogenase Activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44(1):483-511.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M & Omura S (2003) Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology* 21(5):526-531.
- Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T & Omura S (1999) Organization of the Biosynthetic Gene Cluster for the Polyketide Anthelmintic Macrolide Avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(17):9509-9514.

- Kang SG, Jin W, Bibb M & Lee KJ (1998) Actinorhodin and Undecylprodigiosin Production in Wild-Type and *relA* Mutant Strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown in Continuous Culture. *FEMS Microbiology Letters* 168(2):221-226.
- Kaserer H (1905) Über die Oxidation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikroorganismen. *Z. landw. Versuchsw. in Osterreich.* 8:4.
- Keith FC (1998) Taking a Genetic Scalpel to the *Streptomyces* Colony. *Microbiology* 144:1465-1478.
- Khdhiri M, Hesse L, Popa ME, Quiza L, Lalonde I, Meredith LK, Röckmann T & Constant P (2015) Soil Carbon Content and Relative Abundance of High Affinity H<sub>2</sub>-Oxidizing Bacteria Predict Atmospheric H<sub>2</sub> Soil Uptake Activity Better Than Soil Microbial Community Composition. *Soil Biology and Biochemistry* 85:1-9.
- Kim S, Yoon J & Park MG (2015) Obligate Mixotrophy of the Pigmented Dinoflagellate *Polykrikos lebourae* (Dinophyceae, Dinoflagellata). *Algae* 30(1):35-47.
- Kim SB & Goodfellow M (2002) *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a Taxonomic Home for the Avermectin-Producing Streptomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(6):2011-2014.
- King GM (2003) Uptake of Carbon Monoxide and Hydrogen at Environmentally Relevant Concentrations by Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12):7266-7272.
- King GM & Weber CF (2007) Distribution, Diversity and Ecology of Aerobic CO-Oxidizing Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 5(2):107-118.
- Kirby R, Sangal V, Tucker NP, Zakrzewska-Czerwińska J, Wierzbicka K, Herron PR, Chu C-J, Chandra G, Fahal AH, Goodfellow M & Hoskisson PA (2012) Draft Genome Sequence of the Human Pathogen *Streptomyces somaliensis*, a Significant Cause of Actinomycetoma. *Journal of Bacteriology* 194(13):3544-3545.
- Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S & Nihira T (2009) Characterization of a Regulatory Gene, *aveR*, for the Biosynthesis of Avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Applied microbiology and biotechnology* 82(6):1089-1096.
- Kjelleberg S (1998) Surviving Starvation. *Trends in Microbiology* 6(6):251.
- Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, Buhrke T & Friedrich B (2000) The H<sub>2</sub> Sensor of *Ralstonia eutropha* Is a Member of the Subclass of Regulatory [NiFe] Hydrogenases. *Journal of Bacteriology* 182(10):2716-2724.
- Kovács ÁT, Rákhely G, Balogh J, Maróti G, Cournac L, Carrier P, Mészáros LS, Peltier G & Kovács KL (2005) Hydrogen Independent Expression of *hupSL* Genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS Journal* 272(18):4807-4816.
- Kuenen J & Gottschal J (1982) Competition Among Chemolithotrophs and Methylotrophs and their Interactions with Heterotrophic Bacteria. *Microbial interactions and communities* 1:153-187.

- La Favre JS & Focht DD (1983) Conservation in Soil of H<sub>2</sub> Liberated from N<sub>2</sub> Fixation by Hup<sup>-</sup> Nodules. *Applied and Environmental Microbiology* 46(2):304-311.
- Lalonde I & Constant P (2015) Succession of Bacterial Communities, *coxL* Genotypes and Carbon Monoxide Oxidation Activity in Soil Microcosms to Identify Unknown Carboxydovore Bacteria Dominating Deciduous Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 10.1128/aem.03595-15.
- Lambert L, Cox T, Mitchell K, Rossello-Mora R, Del Cueto C, Dodge D, Orkand P & Cano R (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., Isolated from Dominican Amber. *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 2:511-518.
- Lamichhane-Khadka R, Kwiatkowski A & Maier RJ (2010) The Hyb Hydrogenase Permits Hydrogen-Dependent Respiratory Growth of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *mBio* 1(5).
- Lennon J & Jones S (2011) Microbial Seed Banks: the Ecological and Evolutionary Implications of Dormancy. *Nature Reviews Microbiology* 9(2):119-130.
- Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Schwartz E & Friedrich B (2002) The Hydrogen-Sensing Apparatus in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4(3):255-262.
- Lenz O & Friedrich B (1998) A Novel Multicomponent Regulatory System Mediates H<sub>2</sub> Sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(21):12474-12479.
- Lenz O, Ludwig M, Schubert T, Bürstel I, Ganskow S, Goris T, Schwarze A & Friedrich B (2010) H<sub>2</sub> Conversion in the Presence of O<sub>2</sub> as Performed by the Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem* 11(6):1107-1119.
- Lerat S, Simao-Beauvoir AM & Beaulieu C (2009) Genetic and Physiological Determinants of *Streptomyces scabies* Pathogenicity. *Molecular plant pathology* 10(5):579-585.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L & Law M (2012a) Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012:11.
- Liu Z, Frigaard N-U, Vogl K, Iino T, Ohkuma M, Overmann J & Bryant DA (2012b) Complete Genome of *Ignavibacterium album*, a Metabolically Versatile, Flagellated, Facultative Anaerobe From the Phylum Chlorobi. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Loots du T (2014) An Altered *Mycobacterium tuberculosis* Metabolome Induced by *katG* Mutations Resulting in Isoniazid Resistance. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy* 58(4):2144-2149.
- Lukey MJ, Roessler MM, Parkin A, Evans RM, Davies RA, Lenz O, Friedrich B, Sargent F & Armstrong FA (2011) Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenases: The Individual and Collective Importance of Supernumerary Cysteines at the Proximal Fe-S Cluster. *Journal of the American Chemical Society* 133(42):16881-16892.

- Lussier F-X, Denis F & Shareck F (2010) Adaptation of the Highly Productive T7 Expression System to *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(3):967-970.
- Lyon EJ, Shima S, Buurman G, Chowdhuri S, Batschauer A, Steinbach K & Thauer RK (2004) UV-A/Blue-Light Inactivation of the 'Metal-Free' Hydrogenase (Hmd) from Methanogenic Archaea. *European Journal of Biochemistry* 271(1):195-204.
- MacNeil D (1988) Characterization of a Unique Methyl-Specific Restriction System in *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Bacteriology* 170(12):5607-5612.
- Mason PW, Carbone DP, Cushman RA & Waggoner AS (1981) The Importance of Inorganic Phosphate in Regulation of Energy Metabolism of *Streptococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* 256(4):1861-1866.
- Matin A (1978) Organic Nutrition of Chemolithotrophic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 32(1):433-468.
- Mayfield C, Williams S, Ruddick S & Hatfield H (1972) Studies on the Ecology of Actinomycetes in Soil IV. Observations on the Form and Growth of Streptomyces in Soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4(1):79-91.
- McBride MJ & Ensign JC (1987) Metabolism of Endogenous Trehalose by *Streptomyces griseus* Spores and by Spores or Cells of Other Actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 169(11):5002-5007.
- Meredith LK, Rao D, Bosak T, Klepac-Ceraj V, Tada KR, Hansel CM, Ono S & Prinn RG (2014) Consumption of Atmospheric Hydrogen During the Life Cycle of Soil-Dwelling Actinobacteria. *Environmental Microbiology Reports* 6(3):226-238.
- Meuer J, Bartoschek S, Koch J, Künkel A & Hedderich R (1999) Purification and Catalytic Properties of Ech Hydrogenase From *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry* 265(1):325-335.
- Montet Y, Garcin E, Volbeda A, Hatchikian C, Frey M & Fontecilla-Camps J (1998) Structural Bases for the Catalytic Mechanism of [NiFe]-Hydrogenase. *Pure and applied chemistry* 70(1):25-31.
- Morita R (1999) Is H<sub>2</sub> the Universal Energy Source for Long-Term Survival? *Microbial ecology* 38(4):307-320.
- Munnoch JT, Widdick DA, Chandra G, Sutcliffe IC, Palmer T & Hutchings MI (2016) Cosmid Based Mutagenesis Causes Genetic Instability in *Streptomyces coelicolor*, as Shown by Targeting of the Lipoprotein Signal Peptidase Gene. *Scientific Reports* 6:29495.
- Nicolet Y, Cavazza C & Fontecilla-Camps JC (2002) Fe-Only Hydrogenases: Structure, Function and Evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91(1):1-8.
- Nie W, Tang H, Fang Z, Chen J, Chen H & Xiu Q (2012) Hydrogenase: the Next Antibiotic Target? *Clinical science (London, England : 1979)* 122(12):575-580.

- Nishimura H, Kitano Y, Inoue T, Nomura K & Sako Y (2010) Purification and Characterization of Membrane-Associated Hydrogenase From the Deep-Sea Epsilonproteobacterium *Hydrogenimonas thermophila*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74(8):1624-1630.
- Novelli PC, Lang PM, Masarie KA, Hurst DF, Myers R & Elkins JW (1999) Molecular Hydrogen in the Troposphere: Global Distribution and Budget. *Journal of Geophysical Research* 104(D23):30427-30444.
- O'Brien JM, Wolkin R, Moench T, Morgan J & Zeikus J (1984) Association of Hydrogen Metabolism With Unitrophic or Mixotrophic Growth of *Methanosarcina barkeri* on Carbon Monoxide. *Journal of bacteriology* 158(1):373-375.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H & Kanehisa M (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 27(1):29-34.
- Ogata H, Kellers P & Lubitz W (2010) The Crystal Structure of the [NiFe] Hydrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Allochromatium vinosum*: Characterization of the Oxidized Enzyme (Ni-A State). *Journal of Molecular Biology* 402(2):428-444.
- Olukoshi ER & Packter NM (1994) Importance of Stored Triacylglycerols in *Streptomyces*: Possible Carbon Source for Antibiotics. *Microbiology* 140(4):931-943.
- Ōmura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y & Hattori M (2001) Genome Sequence of an Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis* : Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(21):12215-12220.
- Pandelia M-E, Lubitz W & Nitschke W (2012) Evolution and Diversification of Group 1 [NiFe] Hydrogenases. Is There a Phylogenetic Marker for O<sub>2</sub>-Tolerance? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817(9):1565-1575.
- Peters V, Janssen PH & Conrad R (1998) Efficiency of Hydrogen Utilization During Unitrophic and Mixotrophic Growth of *Acetobacterium woodii* on Hydrogen and Lactate in the Chemostat. *FEMS Microbiology Ecology* 26(4):317-324.
- Popelier F, Liessens J & Verstraete W (1985) Soil H<sub>2</sub>-Uptake in Relation to Soil Properties and Rhizobial H<sub>2</sub>-Production. *Plant and Soil* 85(1):85-96.
- Pronk JT, de Bruijn P, van Dijken JP, Bos P & Kuenen JG (1990) Energetics of Mixotrophic and Autotrophic C1-Metabolism by *Thiobacillus acidophilus*. *Arch. Microbiol.* 154(6):576-583.
- Qin W, Amin SA, Martens-Habbena W, Walker CB, Urakawa H, Devol AH, Ingalls AE, Moffett JW, Armbrust EV & Stahl DA (2014) Marine Ammonia-Oxidizing Archaeal Isolates Display Obligate Mixotrophy and Wide Ecotypic Variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(34):12504-12509.
- Quirós L, Hardisson C & Salas J (1986) Isolation and Properties of *Streptomyces* Spore Membranes. *Journal of Bacteriology* 165(3):923-928.

- Quiza L, Lalonde I, Guertin C & Constant P (2014) Land-Use Influences the Distribution and Activity of High Affinity CO-Oxidizing Bacteria Associated to Type I-coxL Genotype in Soil. *Frontiers in Microbiology* 5:271.
- Richardson DJ (2000) Bacterial Respiration: a Flexible Process for a Changing Environment. *Microbiology* 146 ( Pt 3):551-571.
- Risso D, Schwartz K, Sherlock G & Dudoit S (2011) GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC bioinformatics* 12(1):480.
- Rittenberg SC & Goodman NS (1969) Mixotrophic Growth of *Hydrogenomonas eutropha*. *Journal of Bacteriology* 98(2):617-622.
- Robinson J & Tiedje J (1984) Competition Between Sulfate-Reducing and Methanogenic Bacteria for H<sub>2</sub> Under Resting and Growing Conditions. *Archives of Microbiology* Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG & Triplett EW (2007) Pyrosequencing Enumerates and Contrasts Soil Microbial Diversity. *The ISME journal* 1(4):283-290.
- Rueda B, Miguélez EM, Hardisson C & Manzanal MB (2001) Changes in Glycogen and Trehalose Content of *Streptomyces brasiliensis* Hyphae During Growth in Liquid Cultures Under Sporulating and Non-Sporulating Conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 194(2):181-185.
- Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Sawers RG (2005) Formate and its Role in Hydrogen Production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 33 pt1:42-46.
- Sawers RG, Ballantine SP & Boxer DH (1985) Differential Expression of Hydrogenase Isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a Third Isoenzyme. *Journal of Bacteriology* 164(3):1324-1331.
- Schäfer C, Friedrich B & Lenz O (2013) Novel, Oxygen-Insensitive Group 5 [NiFe]-Hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology* 79(17):5137-5145.
- Schäfer C, Hennig S, Jeoung J, Dobbek H & Lenz O (2015) Structure of an Actinobacterial-Type [NiFe]-Hydrogenase Reveals Insight into O<sub>2</sub>-Tolerant H<sub>2</sub> Oxidation. *Structure* 24(2):285-292.
- Schlatter D, DavelosBaines A, Xiao K & Kinkel L (2013) Resource Use of Soilborne *Streptomyces* Varies with Location, Phylogeny, and Nitrogen Amendment. *Microbial ecology* 66(4):961-971.
- Schlatter DC, Samac DA, Tesfaye M & Kinkel LL (2010) Rapid and Specific Method for Evaluating *Streptomyces* Competitive Dynamics in Complex Soil Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 76(6):2009-2012.
- Schuler S & Conrad R (1990) Soils Contain Two Different Activities for Oxidation of Hydrogen. *FEMS Microbiology Letters* 73(1):77-83.

- Schuler S & Conrad R (1991) Hydrogen Oxidation in Soil Following Rhizobial H<sub>2</sub> Production Due to N<sub>2</sub> Fixation by a *Vicia faba* - *Rhizobium leguminosarum* symbiosis. *Biology and Fertility of Soils* 11(3):190-195.
- Schwartz E, Buhrke T, Gerischer U & Friedrich B (1999) Positive Transcriptional Feedback Controls Hydrogenase Expression in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology* 181(18):5684-5692.
- Schwartz E, Fritsch J & Friedrich B (2013) H<sub>2</sub>-Metabolizing Prokaryotes. *The Prokaryotes*, Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E & Thompson F (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, 10.1007/978-3-642-30141-4\_65. p 119-199.
- Schwartz E, Gerischer U & Friedrich B (1998) Transcriptional Regulation of *Alcaligenes eutrophus* Hydrogenase Genes. *Journal of Bacteriology* 180(12):3197-3204.
- Segev E, Smith Y & Ben-Yehuda S (2012) RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores. *Cell* 148(1–2):139-149.
- Setlow P (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: Their Resistance to and Killing by Radiation, Heat and Chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101(3):514-525.
- Shi L, Belchik SM, Plymale AE, Heald S, Dohnalkova AC, Sybirna K, Bottin H, Squier TC, Zachara JM & Fredrickson JK (2011) Purification and Characterization of the [NiFe]-Hydrogenase of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 77(16):5584-5590.
- Shiloh MU, Manzanillo P & Cox JS (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Senses Host-Derived Carbon Monoxide During Macrophage Infection. *Cell Host & Microbe* 3(5):323-330.
- Shima S & Thauer RK (2007) A Third Type of Hydrogenase Catalyzing H<sub>2</sub> Activation. *The Chemical Record* 7(1):37-46.
- Slonczewski J & Foster J (2013) *Microbiology: An Evolving Science: Third International Student Edition*. WW Norton & Company,
- Soboh B, Linder D & Hedderich R (2004) A Multisubunit Membrane-Bound [NiFe] Hydrogenase and an NADH-Dependent Fe-Only Hydrogenase in the Fermenting Bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiology* 150(Pt 7):2451-2463.
- Stojanowic A, Mander G, Duin E & Hedderich R (2003) Physiological Role of the F420-Non-Reducing Hydrogenase (Mvh) From *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch. Microbiol.* 180(3):194-203.
- Sun J, Hopkins RC, Jenney FE, Jr., McTernan PM & Adams MWW (2010) Heterologous Expression and Maturation of an NADP-Dependent [NiFe]-Hydrogenase: A Key Enzyme in Biofuel Production. *PLoS ONE* 5(5):e10526.
- Thauer R, Kaster A, Seedorf H, Buckel W & Hedderich R (2008) Methanogenic Archaea : Ecologically Relevant Differences in Energy Conservation. *Nature Review Microbiology* 6(8):579-591.

- Thompson J & Torchia DA (1984) Use of  $^{31}\text{P}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and  $^{14}\text{C}$  Fluorography in Studies of Glycolysis and Regulation of Pyruvate Kinase in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* 158(3):791-800.
- Tian J, Bryk R, Itoh M, Suematsu M & Nathan C (2005) Variant Tricarboxylic Acid Cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of  $\alpha$ -ketoglutarate Decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(30):10670-10675.
- Tijhuis L, Van Loosdrecht MC & Heijnen JJ (1993) A Thermodynamically Based Correlation for Maintenance Gibbs Energy Requirements in Aerobic and Anaerobic Chemotrophic Growth. *Biotechnology and Bioengineering* 42(4):509-519.
- Tjaden B (2015) De Novo Assembly of Bacterial Transcriptomes From RNA-seq Data. *Genome Biology* 16(1):1.
- Tobias K, Mervyn JB, Mark JB, Keith FC & David AH (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England,
- Trauger SA, Kalisak E, Kalisiak J, Morita H, Weinberg MV, Menon AL, Poole FL, 2nd, Adams MW & Siuzdak G (2008) Correlating the Transcriptome, Proteome, and Metabolome in the Environmental Adaptation of a Hyperthermophile. *Journal of Proteome Research* 7(3):1027-1035.
- Tresner H, Davies M & Backus E (1961) Electron Microscopy of *Streptomyces* Spore Morphology and Its Role in Species Differentiation. *Journal of Bacteriology* 81(1):70.
- Ueki M, Suzuki R, Takamatsu S, Takagi H, Uramoto M, Ikeda H & Osada H (2009) Nocardamin Production by *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetologica* 23(2):34-39.
- Veselovskii AM, Bass IA, Zolotukhina MA, Mironov AS, Metlitskaia AZ & Khmel IA (2004) Involvement of sigma S and sigma 70 Subunits of RNA Polymerase and the CRP Protein in the Regulation of Microcin C51 Operon Expression. *Genetika* 40(11):1457-1468.
- Vignais PM & Billoud B (2007) Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews* 107(10):4206-4272.
- Vitt S, Ma K, Warkentin E, Moll J, Pierik AJ, Shima S & Ermler U (2014) The F(4)(2)(0)-reducing [NiFe]-Hydrogenase Complex From *Methanothermobacter marburgensis*, the First X-ray Structure of a Group 3 Family Member. *Journal of Molecular Biology* 426(15):2813-2826.
- Vogel C & Marcotte EM (2012) Insights into the Regulation of Protein Abundance From Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Nature Review Genetics* 13(4):227-232.
- Volbeda A, Charon M-H, Piras C, Hatchikian EC, Frey M & Fontecilla-Camps JC (1995) Crystal Structure of the Nickel-Iron Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373(6515):580-587.
- Welte C, Krätzer C & Deppenmeier U (2010) Involvement of Ech Hydrogenase in Energy Conservation of *Methanosarcina mazei*. *FEBS Journal* 277(16):3396-3403.

- White MJ, He H, Penoske RM, Twining SS & Zahrt TC (2010) PepD Participates in the Mycobacterial Stress Response Mediated Through MprAB and SigE. *J Bacteriol* 192(6):1498-1510.
- Williams S & Davies F (1967) Use of a Scanning Electron Microscope for the Examination of Actinomycetes. *Microbiology* 48(2):171-177.
- Witty JF (1991) Microelectrode Measurements of Hydrogen Concentrations and Gradients in Legume Nodules. *Journal of Experimental Botany* 42(6):765-771.
- Wu G, Culley DE & Zhang W (2005) Predicted Highly Expressed Genes in the Genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and The Implications for Their Metabolism. *Microbiology* 151(7):2175-2187.
- Yagüe P, Rodríguez-García A, López-García MT, Martín JF, Rioseras B, Sánchez J & Manteca A (2013) Transcriptomic Analysis of *Streptomyces coelicolor* Differentiation in Solid Sporulating Cultures: First Compartmentalized and Second Multinucleated Mycelia Have Different and Distinctive Transcriptomes. *PLoS ONE* 8(3):e60665.
- Zaccardelli M, De Nicola F, Vilecco D & Scotti R (2013) The Development and Suppressive Activity of Soil Microbial Communities Under Compost Amendment. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13:730-742.
- Zacharia VM & Shiloh MU (2012) Effect of Carbon Monoxide on *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. *Medical Gas Research* 2:30-30.

## VIII. ANNEXES

### 1. Tableaux annexes

Tableau A1 : Liste des gènes exprimés différemment utilisés dans l'analyse des résultats, triés en fonction de leur implication dans les différentes voies métaboliques.

ID du gène	Gène	Expr. Diff.	Annotation KEGG
<b>Métabolisme énergétique</b>			
<b>NADH déshydrogenase</b>			
SAV_4109	<i>ndh3</i>	-1,7	NADH dehydrogenase
SAV_4839	<i>nuoC</i>	-1,3	NADH dehydrogenase subunit C
SAV_4840	<i>nuoD1</i>	-1,3	NADH dehydrogenase subunit D
SAV_4841	<i>nuoE</i>	-1,4	NADH dehydrogenase subunit E
SAV_4842	<i>nuoF1</i>	-1,4	NADH dehydrogenase I chain F
SAV_4849	<i>nuoM1</i>	-1,2	NADH dehydrogenase subunit M
SAV_4884	<i>nuoH2</i>	-1,5	NADH dehydrogenase I chain H
SAV_4887	<i>nuoK2</i>	-1,4	NADH dehydrogenase I chain K
SAV_4888	<i>nuoL2</i>	-1,7	NADH dehydrogenase I chain L
SAV_4889	<i>nuoM2</i>	-1,3	NADH dehydrogenase I chain M
<b>Succinate déshydrogenase / fumarate réductase</b>			
SAV_3181	<i>sdhA</i>	-1,9	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
SAV_3182	<i>sdhB2</i>	-1,8	fumarate reductase iron-sulfur subunit
<b>Transporteurs</b>			
<b>Transporteurs d'acides aminés ramifiés</b>			
SAV_6220	<i>livF</i>	-1,6	ATP-binding protein
SAV_6222	<i>livM</i>	-1,8	permease protein
SAV_6223	<i>livH</i>	-1,7	permease protein
SAV_6224	<i>livK</i>	-1,6	substrate-binding protein
SAV_6167	<i>livM</i>	-2,8	permease protein
SAV_6165	<i>livG</i>	-2,4	ATP-binding protein
SAV_7582	<i>livH</i>	-3,6	permease protein
<b>Transporteur d'oligopeptide</b>			
SAV_3146	<i>oppD</i>	-2,9	ATP-binding protein
SAV_3147	<i>oppC</i>	-2,0	permease protein
<b>Transporteurs de sucres complexes (potentiels)</b>			
SAV_1411	SAV_1411	-1,8	permease protein
SAV_1727	SAV_1727	-1,7	substrate-binding protein
SAV_2144	SAV_2144	-2,4	permease protein

SAV_2145	SAV_2145	-2,3	permease protein
SAV_2818	SAV_2818	-2,1	substrate-binding protein
SAV_2820	SAV_2820	-2,2	permease protein
SAV_3962	SAV_3962	-1,5	ATP-binding protein
SAV_5096	SAV_5096	-1,8	permease protein
SAV_5097	SAV_5097	-1,6	permease protein
SAV_5098	SAV_5098	-1,5	substrate-binding protein
SAV_6368	SAV_6368	-1,7	permease protein
<b>Transporteurs de sucres simples (potentiels)</b>			
SAV_7151	SAV_7151	-1,6	substrate-binding protein
SAV_7152	SAV_7152	-1,5	Permease
SAV_7280	SAV_7280	-1,8	ATP-binding protein
<b>Transporteurs de saccharide, polyol, et lipides</b>			
SAV_1826	<i>rbsB</i>	-2,4	ribose transport system substrate-binding protein
SAV_1827	<i>rbsC</i>	-2,4	ribose transport system permease protein
SAV_2249	SAV_2249	-1,9	N-acetylglucosamine transport system permease prot.
SAV_2251	SAV_2251	-1,7	N-acetylglucosamine transport system substrate-binding prot.
SAV_2577	SAV_2577	-1,5	putative aldouronate transport system substrate-binding prot.
SAV_3962	<i>msmX</i>	-1,5	multiple sugar transport system ATP-binding protein
SAV_4981	<i>msmG</i>	-1,7	raffinose/stachyose/melibiose transport system permease
SAV_5704	<i>frcB</i>	-2,1	fructose transport system substrate-binding protein
SAV_5767	SAV_5767	-1,8	putative multiple sugar transport system permease
SAV_5768	SAV_5768	-1,7	putative multiple sugar transport system ATP-bind
SAV_5769	SAV_5769	-1,8	putative multiple sugar transport system substrat
SAV_6355	<i>smoG</i>	-1,6	sorbitol/mannitol transport system permease protein
SAV_6357	<i>smoE</i>	-1,8	sorbitol/mannitol transport system substrate-binding prot.
SAV_7279	<i>rbsB</i>	-2,3	ribose transport system substrate-binding protein
SAV_970	<i>rbsA</i>	-2,3	ribose transport system ATP-binding protein
SAV_971	<i>rbsB</i>	-2,3	ribose transport system substrate-binding protein
<b>Transporteurs de Fer</b>			
SAV_5269	<i>sidA</i>	3,4	nocardamine synthetase
SAV_5270	<i>sidB</i>	3,7	succinyl-CoA transferase
SAV_5271	<i>sidC</i>	3,6	cadaverine N-monooxygenase
SAV_5272	<i>sidD</i>	3,4	ine decarboxylase
SAV_5273	<i>sidE</i>	3,1	siderophore-interacting protein
SAV_5274	<i>sidF</i>	2,7	siderophore uptake ABC transporter substrate-binding protein
SAV_600	<i>fecC1</i>	-2,4	putative ABC transporter siderophore transport system
SAV_601	<i>fecD1</i>	-2,2	putative ABC transporter siderophore binding protein
SAV_602	<i>fecB</i>	-2,3	putative ABC transporter siderophore binding protein

<b>Système de sécrétion bactérien</b>			
SAV_5071	<i>secA1</i>	-1,2	preprotein translocase subunit SecA
SAV_2565	<i>secA2</i>	-1,4	preprotein translocase subunit SecA
SAV_6836	<i>yajC</i>	-1,4	preprotein translocase subunit YajC
SAV_6837	<i>secD</i>	-1,3	preprotein translocase subunit SecD
SAV_6838	<i>secF</i>	-1,2	preprotein translocase subunit SecF
SAV_6299	<i>secG</i>	-1,3	preprotein translocase subunit SecG
SAV_4946	<i>secY</i>	-1,4	preprotein translocase subunit SecY
<b>Alarmonne à la réponse stringente</b>			
SAV_2472	<i>relA</i>	-1,6	GTP pyrophosphokinase (ppGpp synthase)
<b>Acides aminés</b>			
<b>Tyrosine (dégradation)</b>			
SAV_5362	<i>melC1-2</i>	-2,5	Tyrosinase
<b>Alanine (dégradation)</b>			
SAV_6507	<i>Ald</i>	2,9	L-alanine dehydrogenase
<b>Cysteine (dégradation)</b>			
SAV_2046	<i>metE</i>	2,0	5-MTHPtryglutamate--homocysteine S-methyltransferase
SAV_5053	<i>sahH</i>	1,3	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
<b>Phénylalanine (dégradation)</b>			
SAV_4350	<i>paaE</i>	1,9	phenylacetic acid degradation NADH oxidoreductase
SAV_4351	<i>paaD</i>	2,0	phenylacetic acid degradation protein
SAV_4352	<i>paaC</i>	2,2	phenylacetic acid degradation protein
SAV_4353	<i>paaB</i>	1,8	phenylacetic acid degradation protein
SAV_4354	<i>paaA</i>	2,1	phenylacetate-CoA oxygenase subunit PaaA
SAV_4359	<i>paaH</i>	2,2	3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase
<b>Glutamate (synthèse)</b>			
SAV_6189	<i>gltB</i>	-1,8	glutamate synthase(NADPH) large subunit
SAV_6190	<i>gltD</i>	-1,6	glutamate synthase subunit beta
SAV_4963	<i>glmS1</i>	-1,6	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
SAV_5265	<i>glmS2</i>	-1,6	L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase
<b>Glutamine (synthèse)</b>			
SAV_6725	<i>glnA4</i>	-1,7	glutamine synthetase
<b>Lysine (synthèse)</b>			
SAV_5607	<i>dapA4</i>	-1,8	dihydrodipicolinate synthase
SAV_6343	<i>dapA5</i>	-1,5	dihydrodipicolinate synthase
SAV_3161	<i>dapF</i>	-2,1	diaminopimelate epimerase
<b>Arginine (synthèse)</b>			
SAV_6763	<i>argC</i>	1,4	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
SAV_6764	<i>argJ</i>	1,4	ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase

SAV_6765	<i>argB</i>	1,4	acetylglutamate kinase
SAV_6766	<i>argD</i>	1,5	acetylmethionine aminotransferase
SAV_6778	<i>argG2</i>	1,5	argininosuccinate synthase
<b>Leucine (synthèse)</b>			
SAV_5601	<i>leuA2</i>	-1,5	2-isopropylmalate synthase
SAV_2710	<i>leuA1</i>	-2,0	put. $\alpha$ -isopropylmalate/homocitrate synthase transferase
SAV_1819	<i>ilvB3</i>	-2,3	TPP-requiring enzyme (acetolactate synthase II)
SAV_2686	<i>leuC</i>	1,4	isopropylmalate isomerase large subunit
<b>Asparagine (synthèse)</b>			
SAV_5689	<i>asnH2</i>	-3,4	asparagine synthetase
<b>Sérine (synthèse)</b>			
SAV_1917	<i>pssA</i>	-1,4	phosphatidylserine synthase
<b> Systèmes à deux composants</b>			
SAV_3353	<i>smrB</i>	-1,4	two-component system sensor kinase
SAV_4047	<i>mprA</i>	-1,8	two-component system response regulator
SAV_4048	<i>mprB</i>	-1,5	two-component system sensor kinase
SAV_3116	<i>SAV_3116</i>	-1,2	put. RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor SigE
SAV_4223	<i>SAV_4223</i>	-1,6	putative serine protease PepD
SAV_2650	<i>glnB</i>	-1,3	nitrogen regulatory protein P-II
SAV_6725	<i>glnA</i>	-1,7	glutamine synthetase
<b>Résistances / Synthèse d'antibiotiques et antihelminthiques</b>			
<b>Synthèse d'ivermectin</b>			
SAV_938	<i>aveA1</i>	-1,3	type I polyketide synthase AVES 1
SAV_939	<i>aveA2</i>	-1,4	type I polyketide synthase AVES 2
SAV_941	<i>aveE</i>	-1,3	cytochrome P450 hydroxylase
SAV_942	<i>aveA3</i>	-1,4	type I polyketide synthase AVES 3
SAV_943	<i>aveA4</i>	-1,4	type I polyketide synthase AVES 4
SAV_946	<i>aveBII</i>	-1,1	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
SAV_947	<i>aveBIII</i>	-1,1	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
<b>Résistance aux beta-Lactames</b>			
SAV_3146	<i>dppD</i>	-2,9	peptide ABC transporter ATP-binding protein
SAV_3147	<i>oppC2</i>	-2,0	oligopeptide ABC transporter permease
SAV_3148	<i>oppB2</i>	-1,6	oligopeptide ABC transporter permease
SAV_5458	<i>pbp10</i>	-1,5	penicillin-binding protein
<b>Métabolisme des carbohydrates</b>			
SAV_6074	<i>glkA1</i>	1,8	Glucokinase
SAV_6083	<i>pfkA2</i>	-2,9	6-phosphofructokinase
SAV_3215	<i>glpX</i>	1,3	fructose 1,6-bisphosphatase II
SAV_6296	<i>gap2</i>	1,3	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

SAV_4362	<i>bkdA</i>	1,9	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase E1-alpha chain
SAV_4363	<i>bkdB</i>	1,8	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase E1-beta chain
SAV_4364	<i>bkdC</i>	1,4	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2
SAV_7177	<i>thcA</i>	-1,8	aldehyde dehydrogenase
SAV_2031	<i>acsA4</i>	-2,4	acetyl-CoA synthetase
<b>Cycle TCA</b>			
SAV_2972	<i>kgd</i>	-1,2	alpha-ketoglutarate decarboxylase
SAV_3181	<i>sdhA</i>	-1,9	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
SAV_3182	<i>sdhB2</i>	-1,8	fumarate reductase iron-sulfur subunit
SAV_4362	<i>bkdA</i>	1,9	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase E1-alpha chain
SAV_4363	<i>bkdB</i>	1,8	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase E1-beta chain
SAV_4364	<i>bkdC</i>	1,4	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2
SAV_4876	<i>korB</i>	1,1	2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase subunit beta
SAV_4877	<i>korA</i>	1,1	2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase, alpha subunit
SAV_5330	<i>gltA</i>	1,8	type II citrate synthase

L'ID du gène correspond à son identification dans NCBI, l'expression différentielle (Expr. Diff.) correspond au facteur de différence d'abondance entre les conditions eH<sub>2</sub> / aH<sub>2</sub>. L'annotation KEGG correspond à la protéine synthétisée via la traduction du gène correspondant, selon KEGG.

Tableau A2 : Liste des oligonucléotides utilisés et leurs protocoles PCR associés.

Fragment	Nom	Amorce sens (-F) et antisens (-R)	Conditions PCR (ADN polymérase : FastTaq (Feldan))
<i>neo-in-cPC</i>	A	Sens / Forward : 5'- <u>AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTC</u> <u>GTTTCATCGCTGAGGTCTGCCTCGTG</u> -3' Antisens / Reverse : 5'-TCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGT CACAGAGAAAGCCACGTTGTGTCTC-3'	94°C durant 5 min, 30 cycles de "slowdown" : dénaturation à 94°C durant 30 sec, puis ligation avec une température débutant à 65°C, avec 1°C de baisse chaque 3 cycles pour atteindre une température de 55°C (45 sec / cycle), et une phase d'élongation à 72°C durant 3 min.
cassette apramycine	B	Sens / Forward : 5'-GGACTTTCACCCCATACCTCCCTAGGAGGA GGCGGTCCCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' Antisens / Reverse : 5'-GCTCGGCGGTCACGCGGTTTCGTCGCCGATACCG CGCTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	
<i>neo</i>	C	Sens / Forward : 5'-GGCGCTTTCTCAATGCTCA-3' Antisens / Reverse : 5'-GCCATCCTATGGAAGTGCCT-3'	
<i>bla</i>	D	Sens / Forward : 5'- CCAATGCTTAATCAGTGAGGCA Antisens / Reverse : 5'- ATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGT	
<i>hhyL</i>	E	Sens / Forward : 5'-ATGGCATCGACGACGAAGGC-3' Antisens / Reverse : 5'-TCATCCGCCAGTCCGCTCA-3'	
<i>hhyL</i> partiel	F	Sens / Forward: 5'-ATCTCGGGBATCTGYGGKGACAA-3' Antisens / Reverse : 5'-ATGAGRCAACATCTCYCGGGT-3'	
pIAF- <i>hhySL</i>	G	Sens / Forward: 5'- <u>AGGAGAACGCATGCAAGCTTATGACTGCGGCAACGCC</u> Antisens / Reverse : 5'- ACTCACTATAGGGAAAGCTTTCATCCGCCAGTCCGC	
pIAF-XSL	H	Sens / Forward : 5'- <u>GGACCCCGGCTGCAGCCGGACGGTGGATCGG</u> Antisens / Reverse : 5'- <u>ACTATAGGGAAAGCTTTCATCCGCCAGTCCG</u>	

Les oligonucléotides utilisés pour le remplacement d'un gène par *PCR-targeting* ou par recombinaison ont un certain nombre de nucléotide d'homologie (soulignés) à la région amont en 5' (amorce sens) ou la région aval en 3' (amorce anti-sens) du gène ciblé. Les mélanges PCR consistent en la formule suivante :

tampon de réaction 1X (15 mM MgCl<sub>2</sub>), 10% *Band Sharpener*, 0,2 mM dNTP, 20 µM de chaque amorce, 1,25 U Fast-Taq DNA polymérase (Feldan<sup>®</sup>, QC, Canada), 2 µl d'ADN matrice et de l'eau sans nucléase, pour obtenir un volume final de 50 µL. Exception faite de l'amplification du fragment pIAF-XSL : tampon de réaction 1X, Q5 High GC Enhancer 1X, 0,2 mM dNTP, 20 µM de chaque amorce, 1 U Q5 High Fidelity DNA Polymerase (NEB<sup>®</sup> ...), 2 µl d'ADN matrice et de l'eau sans nucléase, pour obtenir un volume final de 50 µL.

## 2. Protocoles

### 2.1. Généralités

Toutes les souches d'*E. coli* ont été cultivées sur LB-agar. Les antibiotiques suivants ont été utilisés comme marqueurs de sélection et pour le maintien des plasmides (en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) : carbéniciline (100), apramycine (50), streptomycine (50) chloramphenicol (25) et kanamycine (12,5) pour *E. coli* (Tableau 5). La résistance à la streptomycine sur le plasmide pUB307-aph::Tn7 amène aussi la résistance à spectinomycine (100).

### 2.2. Protocole 1 : Transformation d'*E. coli* BW25113 (pIJ790) par le cosmide CL\_214\_G06

La délétion totale des gènes *hhySL* a été entreprise via une approche dite de *PCR-targeting*, décrite par Gust *et al.* (Gust *et al.*, 2003) avec quelques modifications (Fig. 11). Le cosmide CL\_214\_G06, utilisé pour le séquençage du génome de *S. avermitilis*, a été choisi car incluant le fragment du génome encodant pour l'HHA, entouré de plus de 15 kb de séquence génomique. Approximativement  $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  de ce cosmide ont été transformés dans *E. coli* BW25113, rendues compétentes en suivant ces étapes :

1. Cultiver *E. coli* BW25113 (pIJ790) pendant une nuit à  $30^\circ \text{C}$  dans 10 ml de LB (Sambrook & Russell, 2001) contenant du chloramphénicol (Cam) (maintien du plasmide).
2. Inoculer  $100 \mu\text{l}$  de la préculture d'*E. coli* BW25113 (pIJ790) dans 10 ml de milieu SOB Cam (Sambrook & Russell, 2001) contenant 20 mM  $\text{MgSO}_4$  ( $200 \mu\text{l}$  d'une solution stock à 1M pour 10 ml SOB).
3. Cultiver durant 3-4 heures à  $30^\circ\text{C}$  sous agitation à 200 rotations par minute (rpm) jusqu'à une  $\text{DO}_{600}$  de  $\sim 0,4$ .
4. Récupérer les cellules par centrifugation à  $2500 \times g$  pendant 5 min à  $4^\circ\text{C}$ .
5. Décanter le milieu et re-suspendre le culot en mélangeant doucement dans 10 ml de glycérol 10% à  $4^\circ\text{C}$ .

6. Centrifuger comme précédemment et remettre en suspension le culot dans 5 ml de glycérol 10% glacé, centrifuger puis décanter. Remettre en suspension le culot de cellules dans les 100 µl restant en tapotant doucement le tube.
7. Mélanger 50 µl de la suspension cellulaire avec ~ 100 ng (1-2 µl) de cosmide. Électroporer dans une cuvette d'électroporation de 0,2 mm préalablement refroidie sur glace, en utilisant un électroporateur réglé à 200 Ω, 25 µF et 2,5 kV. La constante de temps optimale est située entre 4,5 - 4,9 ms. Répéter l'expérience sans ajouter de cosmide aux cellules (témoin négatif).
8. Immédiatement, ajouter doucement 1 ml de SOC (Sambrook & Russell, 2001) à 4°C aux cellules transformées et incuber en agitant pendant 1h à 30°C.
9. Étaler 100 µl sur LB agar Carb/Cam (maintien des deux plasmides).
10. Incuber une nuit à 30°C.
11. Si le témoin négatif est bien négatif, transférez 12 colonies isolées séparément dans 5 ml de LB contenant les mêmes antibiotiques.
12. Incuber une nuit à 30°C sous agitation à 200 rpm.
13. Extraire l'ADN des différentes souches, vérifier la présence du cosmide sur gel. Au besoin, faire une digestion avec les enzymes de restrictions appropriées.
14. Conserver l'une des souches positives à -80°C dans du LB 1% glycérol. Cette souche a été nommée *E. coli* B1.

### **2.3. Protocole 2 : Transformation de la cassette de résistance à l'apramycine dans *E. coli* B1**

La cassette de résistance a été transférée par électroporation dans *E. coli* B1 suivant ce protocole :

1. Inoculer 10 ml de milieu SOB (sans MgSO<sub>4</sub>) Carb/Cam avec 1% d'une préculture à en phase stationnaire de *E. coli* B1.
2. Ajouter à T<sub>0</sub> 1 ml d'une solution stock de L-arabinose à 1 M (concentration finale 100 mM), afin d'induire l'expression des gènes codant pour la recombinaison λ Red (différent du protocole originel utilisant 10 mM après 1h de croissance).

3. Laisser croître 3-4 heures à 30°C sous agitation à 200 rpm jusqu'à une  $DO_{600}$  de ~ 0,4.
4. Récupérer les cellules par centrifugation à 2500 x *g* pendant 5 min à 4°C.
5. Décanter le milieu et resuspendre le culot en mélangeant doucement dans 10 ml de glycérol 10% à 4°C.
6. Centrifuger comme précédemment et remettre en suspension le culot dans 5 ml de glycérol 10% glacé, centrifuger et décanter. Remettre en suspension le culot de cellules restant dans les 100 µl restant.
7. Mélanger 50 µl de la suspension cellulaire avec ~ 100 ng (1-2 µl) de la cassette de disruption purifiée sur colonne. Électroporer dans une cuvette d'électroporation glacée de 0,2 mm en utilisant un électroporateur réglé à 200 Ω, 25 µF et 2,5 kV. La constante de temps optimale est située entre 4,5 – 4,9 ms.
8. Immédiatement, ajouter doucement 1 ml de SOC à 4°C aux cellules transformées et récupérer ces dernières dans une éprouvette de 15 ml, puis incuber en agitant pendant 1 h à 30°C.
9. Étaler 100-200 µl sur LB agar Carb /Apra
10. Si le contrôle négatif est concluant (absence de colonies), transférez 12 colonies isolées séparément dans 5 ml de LB contenant les mêmes antibiotiques et incuber à 30°C.
11. Extraire l'ADN des différents clones, vérifier la présence du cosmide sur gel et amplifier par PCR la cassette apramycine à l'aide des amorces B-F et B-R (amorces extérieur de la région clonée, voir Tableau A2 en annexe) pour vérifier la présence de l'insert.
12. Conserver l'une des souches positives à -80°C dans du LB 1% glycérol. Cette souche est désormais nommée *E. coli* B2

#### **2.4. Protocole 3 : conjugaison entre *E. coli* C1 et *S. avermitilis* :**

1. Inoculer la souche *E. coli* C1 dans 10 ml de LB Apra/Kan/Str (maintien des plasmides cPC et pUB307-aph::Tn7). Cultiver sur la nuit à 37°C.
2. Inoculer 10 ml de LB Apra/Kan/Str avec 100 µl de la préculture, puis cultiver ~ 4 heures à 37°C jusqu'à une  $DO_{600}$  de 0,4.

3. Laver les cellules deux fois avec 10 ml de LB pour éliminer les antibiotiques qui pourraient inhiber les streptomycètes, et remettre en suspension dans le culot en tapotant très doucement, avant de rajouter 1 ml de LB.
4. Ajouter 10  $\mu$ l ( $10^8$ ) de spores de *S. avermitilis* dans 500  $\mu$ l de milieu 2YT (Sambrook & Russell, 2001), puis induire un choc thermique à 50°C pendant 10 min, et laisser refroidir.
5. Mélanger 500  $\mu$ l de la suspension d'*E. coli* C1 et les 500  $\mu$ l de spores. Centrifuger brièvement à basse vitesse, décanter le surnageant, puis remettre en suspension le culot dans les 50  $\mu$ l de liquide résiduel.
6. Faire une série de dilution  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  dans 100  $\mu$ l d'eau stérile.
7. Étaler 100  $\mu$ l de chaque dilution sur gélose MS-agar + 10 mM  $MgCl_2$  (sans antibiotique) et incuber à 30°C pendant 16-20 h.
8. Recouvrir la plaque avec 1 ml d'agar mou (eau + 0,5% d'agar, à 40°C maximum) contenant acide nalidixique et streptomycine 25 fois concentrés (équivalent à la dose d'antibiotiques d'une gélose normale), inhibant la croissance des *E. coli* et permettant ainsi la croissance des *Streptomyces* sans concurrence. Incuber à 30°C durant 4-5 jours jusqu'à apparition de colonies de *Streptomyces*, caractérisées par la production d'une pigmentation brune diffusant dans la gélose.
9. Repiquer chaque colonie sur deux géloses de MS-agar : une Apra/Kan et l'autre Apra uniquement.
10. Sélectionner les colonies résistantes à l'apramycine (présence de la cassette) mais sensibles à la kanamycine (dénnotant l'absence du cosmide, donc d'une double-recombinaison).
11. Extraire l'ADN total de ces souches pour une amplification des gènes *hhyL*, *aac(3)IV*, et *neo*. Les souches négatives pour *hhyL*, *neo* (KanR) et positives pour *aac(3)IV* (ApraR) sont conservées.

## **2.5. Protocole 4 : Complémentation de la mutation par délétion des gènes *hhySL***

L'essai de complémentation a été fait en utilisant un vecteur d'expression pIAF-C209 (Francois Shareck, communication personnelle), pouvant se répliquer dans *S. avermitilis* et dans *E. coli*. Il possède un gène de résistance à la carbéniciline, et un gène de résistance à thiostreptone sous contrôle d'un promoteur spécifique aux *Streptomyces*. Le plasmide possède un promoteur fort

C109 en aval d'un site de restriction unique HindIII, utilisé pour l'expression de protéines recombinantes dans *S. lividans*.

Ce vecteur a permis dans un premier temps le clonage par recombinaison des gènes *hhySL*, sous contrôle du promoteur constitutif fort C109, puis le clonage des gènes *hypX-hhySL*, pour obtenir *hhySL* sous contrôle du promoteur natif.

#### 1. Synthèse des vecteur pIAF-C209-*hhySL* et pIAF-C209-XSL :

Le vecteur pIAF-C209, obtenu purifié, est digéré par l'enzyme de restriction HindIII (Promega) suivant le protocole du fabricant. Après désactivation thermique de l'enzyme, le produit de digestion est purifié sur colonne (Kit Promega®), puis quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop®).

Le fragment *hhySL*-REC est amplifié à partir des amorces G-F et G-R (voir Tableau A2 en annexe), amplifiant le fragment *hhySL* ainsi que les 15 nucléotides en amont et en aval du site de restriction HindIII du vecteur pIAF-C209. Le fragment est ensuite purifié sur colonne, puis quantifié.

Le fragment XSL-REC est amplifié à partir des amorces H-F et H-R (voir Tableau A2 en annexe), amplifiant les gènes *hypX* et *hhySL* ainsi que les gènes *hhySL*, dans le but de conserver *hhySL* avec son promoteur natif. Contrairement aux autres fragments, la grande taille de celui-ci (presque 5 kb) a nécessité l'utilisation d'une enzyme permettant de générer de long fragments avec une haute fidélité, soit l'enzyme Q5 polymérase (NEB).

La recombinaison est faite à l'aide du kit *GeneArt Seamless Cloning and Assembly*® (Invitrogen) suivant les instructions du fabricant. Lors de la recombinaison entre le fragment *hhySL*-REC ou XSL-REC et le pIAF-C209 purifié, le ratio insert/vecteur est de 2, suivant l'équation suivante :

$$\text{ng insert} = 2 \times (\text{pb de l'Insert}) \times (100 \text{ ng vecteur linéarisé}) / (\text{pb du vecteur})$$

soit :

- pour le fragment *hhySL*-REC :  $2 \times (2983) \times (100 \text{ ng vecteur linéarisé}) / (8094 \text{ pb pIAF-C209}) = 74 \text{ ng}$

- pour le fragment XSL-REC :  $2 \times (4990) \times (100 \text{ ng vecteur linéarisé}) / (8094 \text{ pb pIAF-C209}) = 123 \text{ ng}$

Après réaction, le mélange est transformé chimiquement selon le protocole du fabricant, dans les cellules *E. coli* One Shot® TOP10 fournies.

Les cellules sont sélectionnées sur une gélose LB-Carb. Pour le vecteur pIAF-C209-*hhySL*, huit colonies sont repiquées dans un milieu liquide LB-Carb et incubées durant 24 h à 37°C avec agitation. L'ADN circulaire de ces 8 souches est extrait puis digéré par HindIII. Les produits de digestions sont déposés sur gel. Après migration et coloration au bromure d'éthidium, une bande à approximativement 3 kb, correspondant au fragment *hhySL*, est trouvée dans l'échantillon correspondant à la souche #3. Dans cette souche, une amplification par PCR du gène *hhyL* confirme la présence de l'insert recherché au sein du vecteur pIAF-C209-*hhySL*. La souche a été conservée à -80°C dans du LB 1% glycérol. Dans le cas du vecteur pIAF-XSL, le fragment de 5 kb a été retrouvé dans les souches #1 et #3. L'amplification par PCR du gène *hhyL* dans la souche #1 a confirmé la présence de l'insert. Cette dernière a été conservée à -80°C dans du LB 1% glycérol.

Pour obtenir des vecteurs dont la méthylation n'entraînerait pas de clivage de l'ADN au sein de *S. avermitilis*, ceux-ci ont été transformés au sein de protoplastes de *S. lividans* puis extraits et retransformés dans des protoplastes de *S. avermitilis*  $\Delta hhySL$ . L'extraction des ADN circulaires est faite selon la méthode de lyse alcaline et de précipitation à l'acétate de potassium optimisée pour les *Streptomyces*, issue du manuel « Practical Streptomyces Genetics » (Tobias *et al.*, 2000).

## 2. Génération de protoplastes de *S. avermitilis* et *S. lividans*

Les protoplastes de *S. lividans* et *S. avermitilis*  $\Delta hhySL$  ont été générés en suivant le protocole de Sambrook (Sambrook & Russell, 2001).

## 3. Régénération de protoplastes :

La régénération des protoplastes est faite sur des géloses de milieu R5 (voir Milieux de culture en annexe) séchées à 15% pour *S. lividans* et 50% pour *S. avermitilis*. Un aliquot de 100  $\mu$ l de

protoplastes est étalé sur gélose de R5 (séchées à 15% ou 50%) à l'aide de 5 billes de verre de 2 mm de diamètre, puis la gélose est incubée de façon statique à 30°C.

#### 4. Transformation des protoplastes :

La transformation est la même pour *S. avermitilis* et *S. lividans*. Dans un tube de 1,5 ml contenant 50 µl de protoplastes, introduire 200 ng de vecteur (5 µl), puis 200 µl d'une solution de PEG 25% (50% tampon T, 50 % « PEG 100 50% » de Roche). Après 2 minutes d'incubation à température ambiante, 100 µl sont étalés sur gélose de R5 (séchées à 15% ou 50%) à l'aide de 5 billes de verre de 2 mm de diamètre. Une fois régénérés, les protoplastes sont repiqués sur des géloses MS-agar Ni<sup>2+</sup> Tsr ainsi que dans un milieu TSB Tsr. Les plasmides sont extraits des souches en culture liquide selon la méthode d'extraction par lyse alcaline et précipitation à l'acétate de potassium (Sambrook & Russell, 2001), puis le fragment *hhyL* est amplifié pour confirmer la présence du plasmide. L'activité d'oxydation est recherchée par la méthode présentée dans le chapitre 2.3. en utilisant des spores matures issues de la culture sur gélose MS-agar Ni<sup>2+</sup> Tsr.

### 3. Milieux de culture

#### 3.1. MS-agar (1L)

Farine de soya ..... 20 g

Mannitol .....20 g

Dissoudre dans de l'eau du robinet, puis distribuer 100 ml dans 10 flacons coniques de 250 ml.

Ajouter 2 g d'agar

Autoclaver deux fois.

Avant utilisation, ajouter 0,1 ml d'une solution de Ni<sup>2+</sup> à 10mM, et bien remuer avant de couler les géloses.

#### 3.2. Milieu R5 solide (1L)

Dans un contenant d'1L, ajouter :

Sucrose..... 103 g

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .....0,25 g

MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O ..... 10,12 g

Glucose..... 10 g

Casaminoacides ..... 0,1 g

Solution d'Éléments Traces.... 2 ml

Extrait de Levure..... 5 g

Tampon TES..... 5,73 g

Dissoudre dans 1 L d'eau milliQ à l'aide d'un barreau magnétique.

Faire des aliquots de 200 ml et ajouter 4,4 g d'agar dans chaque aliquot, puis stériliser par autoclave.

Au moment d'utilisation, faire fondre le milieu, attendre une température de 50°C, puis ajouter les solutions suivantes :

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5%)..... 2 ml

CaCl<sub>2</sub> (5M) ..... 0,8 ml  
L-Proline (20%)..... 3 ml  
NaOH (1M) ..... 1,4 ml

**Solution d'Éléments Traces (1L) :**

NaOH (1M) ..... 1,4 ml  
ZnCl<sub>2</sub> ..... 40 mg  
FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O ..... 200 mg  
CuCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O ..... 10 mg  
MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O..... 10 mg  
Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 10 H<sub>2</sub>O..... 10 mg  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4 H<sub>2</sub>O..... 10 mg

## 4. Traitement bio-informatique des données de séquençage d'ARN de *Streptomyces avermitilis*

### 4.1. Traitement des données brutes et alignement des séquences sur génome

Les lignes de commandes et codes sont écrits en rouge pour simplifier la compréhension.

- Téléverser sur le serveur de calcul les programmes suivants :
  - Rockhopper (version pour toute plateforme)
  - Subsamplé.py
- Charger les programmes nécessaires au traitement informatique :
  - `module load fastx_tools`
- Transférer les fichiers de séquences (format .fastq.gz) sur le serveur de CalculQuébec
- Décompresser les fichiers :
  - `gunzip fichier.fastq.gz`
- Renommer les fichiers avec des noms plus simples (e.g. : S1R1.fq pour Sample1R1)
  - Garder une trace du changement de nom dans un fichier texte
- Filtrer les échantillons avec FastxTools
  - `fastq_quality_filter -Q33 -v -q 20 -p 90 -i S1R1.fq -o S1R1f.fq`
  - La commande `-Q33` est là pour la compatibilité avec la notation de la qualité dans les nouveaux formats de fichiers de séquençage.
  - La valeur `q` indique le % de probabilité que la base soit séquencée correctement. Pour `q = 20`, cette probabilité est de 99%. À 10, elle serait de 90%
  - La valeur `p` indique le % de bases devant avoir une valeur de `q` supérieur ou égale à la valeur définie. Toute séquence ayant moins de 90% de ses bases séquencées avec 99% de fiabilité sera donc écartée de l'analyse.

*Standardiser les séquences : sous-échantillonnage aléatoire des séquences pour obtenir un nombre de séquences égal dans chaque fichier (donc égal au plus petit fichier)*

- Calculer le nombre de lignes du plus petit fichier : `wc S1R1.fq`
  - Diviser par 4 le nombre de lignes dans le fichier pour avoir le nombre de séquences (1 séquence = 4 lignes en fastq, 2 lignes en fasta) (e.g.: 2000000)
  - Sous-échantillonner tous les autres fichiers grâce au programme « subsamplé.py » pour avoir autant de séquences dans tous :  
`python subsamplé.py S1R1.fq 2000000 >S1R1.fq`
- Si le fichier est un "pair-end" R1 (antisens) :
    - `fastx_reverse_complement -i S1R1fs.fq -o S1R1fsr.fq`
    - ceci permet d'avoir toutes les séquences dans le même sens
  - Le fichier sera fusionné avec son homologue R2 :
    - `cat S1R2fs.fq S1R1fsr.fq > S1fsm.fq`

- *Effectivement, ces deux fichiers proviennent d'un même échantillon biologique et d'un même séquençage. On peut donc les fusionner pour enrichir le nombre de séquences dans l'échantillon.*

➔ Les séquences sont prêtes à être alignées sur un génome de référence ←

- Télécharger puis téléverser sur le serveur de calcul les fichiers suivants :
  - Fichiers .fna, .gff, .ptt, .rnt
  - *Ces fichiers contiennent toutes les informations concernant la localisation des gènes, leur nom, et le génome complet.*
  - Depuis le site : [ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ASSEMBLY\\_BACTERIA/](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ASSEMBLY_BACTERIA/)
  - Dans un dossier au nom (réduit) de la bactérie (e.g. Saver)
- Lancer Rockhopper :
  - `java -Xmx2G -cp Rockhopper.jar Rockhopper -g genome -e FALSE -o Saver_datedujour -v TRUE S1fsm.fq,S2fsm.fq,S3fsm.fq S4fsm.fq,S5fsm.fq,S6fsm.fq`
  - Les réplicas sont séparés par une virgule, les conditions séparées par un espace
  - *Le logiciel va calculer le nombre de fragments s'alignant spécifiquement avec un gène en particulier. Cet alignement « brut » ne prend pas en compte les biais dus au taux de GC et, surtout, à la longueur du gène. Car plus un gène est long, plus il y aura de fragments alignés dessus.*
  - *L'argument -Xmx2G permet d'allouer une quantité limitée de mémoire vive, évitant une surcharge de la mémoire du serveur. L'argument -e permet de sauter l'étape de calcul d'expression différentielle par un test statistique paramétrique implémenté dans le logiciel. L'argument -V permet d'avoir le nombre brut de transcrits par gène dans chaque condition dans le fichier final.*

➔ Dans le dossier Saver\_datedujour se trouve un fichier Results.txt à éditer à l'aide d'un logiciel de tableur (Excel)

- Créer un nouveau classeur
- Filtrer la colonne Gene\_name et retirer tous les Predicted\_RNA
- Copier les colonnes suivantes :
  - Gene\_name
  - SnRn\_raw\_counts (= 6 colonnes pour 3 \* 2 échantillons)
  - Transcription start
  - Transcription end
  - Faire une colonne « transcription end – transcription start » renommée « length », qui va donner la taille du gène en nombre de bases. *Ceci sera utilisé pour les corrections du biais dû à la longueur du gène.*
  - Supprimer les colonnes Transcription start et end

- Exemple du fichier final :

Genes	C1E1raw	C1E2raw	C1E3raw	C2E1raw	C2E2raw	C2E3raw	length
SAV_1	352	208	196	422	215	237	431
SAV_2	42	46	10	61	38	34	233
SAV_3	68	62	62	73	47	51	545
SAV_4	162	136	137	252	124	146	506
SAV_5	210	255	204	601	301	330	638

- Enregistrer ce fichier sous le nom Saver\_datedujour.txt
  - Ce fichier sera utilisé dans le script NOISeq sous R
- Analyse sous R : télécharger R ainsi que les modules nécessaires (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/NOISeq.html>)

## 2.2. Analyse de l'expression différentielle avec NOISeqBIO

Attention, NOISeq évoluant rapidement, il est probable que ces lignes de commandes datant de l'été 2014 ne soient plus à jour au moment de la publication de ce document, et devrons être réactualisé en fonction de la dernière version de NOISeq.

- Lancer R
- Télécharger le *package* NOISeq
- Copier-coller le code suivant :

```
# Ce programme vise à déterminer les gènes dont l'expression varie de manière
# significative dans deux conditions expérimentales différentes.
```

```
library(BiocGenerics)
```

```
library(Biobase)
```

```
library(NOISeq)
```

```
#Definition du dossier de travail
```

```
setwd("U:/R/Dossier_de_travail")
```

```
#Import du fichier contenant les données du RNAseq après traitement par fastx_tools
```

```
rnaeq <- read.table(file = "saver_20141112.txt", header = TRUE)
```

*## Cette commande va créer une table copiant celles créées dans le tableur.*

*#Créer ensuite le data.frame Counts*

```
Counts = data.frame(WT1 = rnaseq[,2], WT2 = rnaseq[,3], WT3 = rnaseq[,4], Mut1 = rnaseq[,5],  
Mut2 = rnaseq[,6], Mut3 = rnaseq[,7], row.names = rnaseq[,1])
```

```
head(Counts)
```

*## Ceci permet de définir quelles données se trouvent dans chaque colonnes, de définir le nom associé à chaque ligne, en l'occurrence ici le nom de chaque gène, et de visualiser cette table par la suite.*

*#Créer ensuite le data.frame Factors*

```
Factors = data.frame(Condition = c("WT", "WT", "WT", "Mut", "Mut", "Mut"))
```

*## Ceci permet de définir quelles colonnes correspondent à quelles conditions*

*#Je crée ensuite le data.frame Length*

```
Length = data.frame(length = rnaseq[,8], row.names = rnaseq[,1])
```

```
head(Qlength)
```

```
Lvector = as.vector(t(length))
```

*## Cette commande permet d'associer à chaque gène la longueur de ce gène, dans une colonne supplémentaire*

*#Je crée le readData*

```
Data <- readData(data = Counts, factors = Factors, length = Length, gc = NULL, biotype =  
NULL, chromosome = NULL)
```

*## C'est ce fichier complexe qui va être utilisé par NOISeq pour la suite de ses calculs. Les arguments NULL sont des facteurs que nous n'avons pas jugés utiles d'utiliser lors de notre analyse. Néanmoins, dans le cas d'une comparaison inter-espèces, le taux de GC peut s'avérer important. Les autres facteurs sont principalement présents pour une représentation statistique du taux de transcription selon les chromosomes, ou le biotype dans le cas de gènes à l'expression structure-spécifique, chez les espèces supérieures (mitochondrie, noyau, organe, etc.), ou spécifiques à certains stades de développement (spore vs mycélium, par exemple).*

*#J'analyse les différents paramètres : qualité de séquences, biais de longueur, taux de GC, etc :*

*#Saturation de détection :*

```
Saturation = dat(Data, k=5, ndepth = 7, type = "saturation" )
```

```
explo.plot (Qsaturation, toplot = 1, samples = 1:4, yleftlim = NULL, yrightlim = NULL)
```

*## Cette fonction est utile pour savoir si l'on a atteint une saturation au niveau de la détection des gènes exprimés, et à partir de quel nombre de séquences. Ceci peut permettre de prévoir des séquençages plus ou moins profonds pour les prochains réplicas.*

**#Biais longueur :**

**#Lengthbias = dat(Data, factor = "Condition", type = "lengthbias" )**

**#explo.plot(Lengthbias, sample = NULL, toplot = "global")**

**#show(Lengthbias)**

*## Cette fonction permet de visualiser le biais de séquençage lié à la longueur des gènes, un gène plus long étant par principe plus séquencé qu'un gène plus petit.*

**#Ensuite, on normalise en utilisant NoiseqBIO (triplicas) :**

**Results = noiseqbio(Data, k = 0.5, norm = "rpkm", factor = "Condition", lc = 0, r = 1000, nclust = 15, adj = 1.5, plot = FALSE, a0per = 0.9, random.seed = 12345, filter = 3)**

*## Ici, la normalisation est faite grâce la fonction RPKM (Reads Per Kilobase per million Mapped reads). La variable **r** indique le nombre de permutations entre les abondances de séquences des gènes d'un même groupe pour créer le bruit de fond donnant par la suite la valeur  $Z_0$ . A travers la variable **nclust**, les gènes sont séparés en 15 groupes de gènes dont la profondeur de séquençage est proche. La variable **k** remplace les 0 par 0.5 en cas d'abondance nulle dans le nombre de transcrits d'un gène. Finalement, la variable **filter** permet de retirer les gènes faiblement exprimés selon 3 méthodes de calcul différentes (CPM, test de Wilcoxon ou test de proportion), ou bien d'utiliser un seuil choisi au préalable (e.g.  $cv.cutoff = 500$ ).*

**Results.deg = degenes(Results, q = 0.95, M = NULL)**

*# Ici, M permet de choisir si l'on veut tous les gènes différentiellement exprimés ou uniquement ceux sur- ou sous-exprimés entre la condition contrôle et la condition test. La valeur q est égale à 1- le taux de faux positifs acceptable, soit dans notre cas 5%, donnant une valeur  $q = 1 - 0,05 = 0,95$ . Dans le cas de réplicas biologiques, les auteurs préconisent un  $q = 0,8$ .*

**write.table(Results.deg, file = "R\_Saver\_20141112.txt")**

A la fin de l'analyse, aller chercher le fichier Saver\_datedujour.txt.

Ouvrir dans un tableur et :

- Sélectionner la colonne A → Données → Convertir → Séparer → Délimiter → Séparateur : espace.
- Modifier les colonnes pour obtenir 2 colonnes :
  - 1: nom des gènes
  - 2: rapport d'expression condition B/ condition A (avec des points et non des virgules pour les décimales)

- Modifier la ligne 1 et écrire :
  - #organism: [code de l'organisme dans KEGG, *sma* pour *S : avermitilis*]
- Enregistrer en format .txt avec séparation : tabulation
- Ouvrir le fichier avec KegArray (<http://www.genome.jp/kegg/expression/>)
  - Définir le Ratio threshold à 1 (le test statistique de NOISeqBIO ayant déjà séparé les gènes différentiellement exprimés, il n'y a pas lieu de rajouter un second seuil)
  
  - Sélectionner « Mapping to : BRITE » (ou Pathway pour un aperçu des voies). Cette dernière opération renvoi directement sur le site de KEGG, permettant de voir les gènes annotés différentiellement exprimés, soit de façon graphique (Pathway), soit littérale (BRITE).

### **3. Annexe : article publié**

Liot Q & Constant P (2016) : Breathing Air to Save Energy – New Insights Into the Ecophysiological Role of High-Affinity [NiFe]-Hydrogenase in *Streptomyces avermitilis*. *MicrobiologyOpen* 5(1):47-59.

## ORIGINAL RESEARCH

# Breathing air to save energy – new insights into the ecophysiological role of high-affinity [NiFe]-hydrogenase in *Streptomyces avermitilis*

Quentin Liot &amp; Philippe Constant

INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Québec, Canada

**Keywords**Actinobacteria, H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria, microbial seed bank, trace gas**Correspondence**

Philippe Constant, INRS-Institut Armand Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7 Canada.  
Tel: (450) 687-5010 #4117;  
Fax: (450) 686-5501;  
E-mail: philippe.constant@iaf.inrs.ca

**Funding Information**

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant/Award Number: "Discovery/418252-2012").

Received: 24 September 2015; Accepted: 6 October 2015

*MicrobiologyOpen* 2016; 5(1): 47–59

doi: 10.1002/mbo3.310

**Introduction**

With a typical mixing ratio of 530 ppbv, H<sub>2</sub> is the second most abundant reduced trace gas in the atmosphere. Fossil fuel combustion, biomass burning, and methane oxidation are the main sources of atmospheric H<sub>2</sub> (Novelli et al. 1999). Soil represents the most important sink for atmospheric H<sub>2</sub> and very little is known about the ecophysiology of microorganisms involved in this important ecosystem service (Constant et al. 2009; Ehhalt and Rohrer 2009; Greening et al. 2015). *Streptomyces* sp. PCB7 was the first isolate displaying the ability to scavenge atmospheric H<sub>2</sub> (Constant et al. 2008). This metabolic versatility was then demonstrated in other streptomycetes isolates, resulting in the identification of the genes *hhySL* encoding for the small and the large subunits of the putative high-affinity group 5 [NiFe]-hydrogenase (Constant et al.

**Abstract**

The *Streptomyces avermitilis* genome encodes a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase conferring the ability to oxidize tropospheric H<sub>2</sub> in mature spores. Here, we used a combination of transcriptomic and mutagenesis approaches to shed light on the potential ecophysiological role of the enzyme. First, *S. avermitilis* was either exposed to low or hydrogenase-saturating levels of H<sub>2</sub> to investigate the impact of H<sub>2</sub> on spore transcriptome. In total, 1293 genes were differentially expressed, with 1127 and 166 showing lower and higher expression under elevated H<sub>2</sub> concentration, respectively. High H<sub>2</sub> exposure lowered the expression of the Sec protein secretion pathway and ATP-binding cassette-transporters, with increased expression of genes encoding proteins directing carbon metabolism toward sugar anabolism and lower expression of NADH dehydrogenase in the respiratory chain. Overall, the expression of *relA* responsible for the synthesis of the pleiotropic alarmone ppGpp decreased upon elevated H<sub>2</sub> exposure, which likely explained the reduced expression of antibiotic synthesis and stress response genes. Finally, deletion of *hhySL* genes resulted in a loss of H<sub>2</sub> uptake activity and a dramatic loss of viability in spores. We propose that H<sub>2</sub> is restricted to support the seed bank of *Streptomyces* under a unique survival-mixotrophic energy mode and discuss important ecological implications of this finding.

2010). Genes encoding for group 5 [NiFe]-hydrogenase (HAH; High-Affinity NiFe-Hydrogenase) were shown unevenly distributed in *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, and *Acidobacteria* (Constant et al. 2011). Other isolates possessing HAH genes such as *Rhodococcus equi* and *Mycobacterium smegmatis* were also shown to scavenge atmospheric H<sub>2</sub> (Meredith et al. 2013; Greening et al. 2014a).

The high-affinity H<sub>2</sub> oxidation activity ( $_{(app)}K_m < 100$  ppmv) is restricted to mature spores in streptomycetes (Constant et al. 2008, 2010). Considering the free energy of atmospheric H<sub>2</sub> oxidation, it was proposed that actinobacteria use the energy potential of atmospheric H<sub>2</sub> to supply maintenance energy, implying this enzyme in bacterial persistence (Constant et al. 2011). This is in sharp contrast with the other functional groups of [NiFe]-hydrogenases demonstrating low affinity toward

$H_2$  ( $_{(app)}K_m > 1000$  ppmv). These enzymes encompass four distinct phylogenetic groups and are typically involved in energy generation,  $H_2$ -sensing and reductive equivalents turnover during heterotrophic or lithoautotrophic growth (Vignais and Billoud 2007). As observed in the [NiFe]-hydrogenases belonging to groups 1–4, experimental evidences suggest different physiological role within HAH found in taxonomically diverse bacteria. The first genetic investigation of HAH was undertaken in *Ralstonia eutropha* H16, the model aerobic  $H_2$ -oxidizing bacterium. This strain possesses four [NiFe]-hydrogenases: a membrane bound hydrogenase (MBH; group 1), a soluble bidirectional NAD(P)-linked hydrogenase (SH; group 3), a  $H_2$ -sensing hydrogenase (RH; group 2b), and a putative HAH (group 5) that were likely acquired through lateral gene transfer from actinobacteria (Schwartz et al. 2003). It appeared that HAH was weakly expressed in *R. eutropha* and purified HAH displayed low affinity for  $H_2$  in the presence of artificial electron acceptor, with a  $K_m$  of approximately 3  $\mu\text{mol/L}$   $H_2$  instead of the nanomolar range observed in high-affinity  $H_2$ -oxidizing bacteria (Schäfer et al. 2013). Further investigations are necessary to investigate the physiological role and the missing features of HAH for high-affinity  $H_2$  uptake activity in *R. eutropha*. On the other hand, extensive genetic investigation on the three [NiFe]-hydrogenases present in *M. smegmatis* (groups 2a, 5, and 3b) confirmed the high-affinity  $H_2$  oxidation activity of HAH, but raised the doubt that high-affinity feature is restricted to group 5 [NiFe]-hydrogenase since mutant strain harboring group 3 [NiFe]-hydrogenase only also displayed high-affinity  $H_2$  uptake activity (Greening et al. 2014a). It was proposed that HAH provided reductants in carbon metabolism during the exponential mixotrophic growth, while supplying survival energy in resting cells (Greening and Cook 2014; Greening et al. 2014b).

Considering the different properties of HAH found in *R. eutropha* and *M. smegmatis* and the high representation of the genes encoding this enzyme in *Streptomyces*, we have undertaken a genetic investigation on the putative HAH in *S. avermitilis*. Well-documented high-affinity  $H_2$  oxidation activity (Constant et al. 2010) and availability of a genomic cosmid library necessary for efficient gene inactivation (Ōmura et al. 2001) were the main reasons to choose this model bacterium. Using a combination of transcriptomic and genetic approaches, we demonstrate that  $H_2$  metabolism in *Streptomyces* is unique, being restricted to their survival and dissemination. This led us to propose the concept of survival–mixotrophic energy mode and revisit the notion that substrate affinity and concentration are the main factors determining the juxtaposition of  $H_2$ -oxidizing bacteria across  $H_2$  concentration gradients in soil.

## Material and Methods

### Microorganisms

*Streptomyces avermitilis* MA-4680 wild-type strain isolated from Japanese soil (Kim and Goodfellow 2002) was the model high-affinity  $H_2$ -oxidizing bacterium used in this study. The strain purchased from the Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (strain DSM-46492) was cultivated on MS-agar (Kieser et al. 2000). The strain *Escherichia coli* BW25113 harboring the lambda red recombinase system (Datsenko and Wanner 2000) was used for recombination between PCR-amplified gene deletion cassettes and cosmids. The strain *E. coli dcm*  $\Delta$ (*srl-recA*)306::Tn10 carrying pUB307-*aph*::Tn7 kindly provided by Prof. H. Ikeda (Kitasato University, Japan) was used for conjugation with *S. avermitilis*. All *E. coli* strains were grown on Luria–Bertani medium (more details about strains, vectors, and antibiotic selections are provided in Table S1).

### Transcriptomic analysis

Spore suspension of *S. avermitilis* wild-type strain (approximately  $10^8$  spores in 100  $\mu\text{L}$ ) was inoculated on MS-agar amended with 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NiCl}_2$  and incubated at 30°C. After 5 incubation days, the plates showing confluent growth of aerial mycelium were transferred into enclosed systems consisting of a bottom-free 1000 mL glass bottle mounted on a plastic support (Fig. S1). A rubber gasket sealed the bottle at the bottom of the plastic support. The enclosed system was equipped with a two-port septum used for headspace air circulation. The first port supplied air mixture consisting either of synthetic air (0.53 ppmv  $H_2$  in synthetic air, designated as ambient  $H_2$  incubation condition; a $H_2$ ) or  $H_2$  gas mixture (500 ppmv  $H_2$  in synthetic air, designated as elevated  $H_2$  incubation condition; e $H_2$ ), while the second port was used as a vent. The flow rate of air mixtures supplying the enclosed system was set to 40 mL  $\text{min}^{-1}$  using rotameters. The system allowed a controlled  $H_2$  exposure of the aerial mycelia during their differentiation into mature spores. The plates were incubated 48 h in the enclosed system. Incubation under a $H_2$  or e $H_2$  concentration was done using three biologically independent replicates, each replicate consisting of one plate displaying confluent growth. After incubation, mature spores were rapidly harvested with a scalpel blade, transferred into 2 mL screw-tubes containing 100 mg of 0.2 mm diameter glass beads, 700  $\mu\text{L}$  of TM buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.0), and 35  $\mu\text{L}$  20% SDS and immediately frozen in liquid  $\text{N}_2$ . Each tube containing the harvested biomass from a unique agar plate was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until RNA extraction. Total RNA was extracted using a

chemically assisted mechanical lysis procedure (Mettel et al. 2010). A DNase treatment was performed using TurboDNase™ kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Absence of residual DNA was confirmed by running the samples on agarose gel and by the absence of PCR-amplified 16S rRNA gene with the universal primers 27F and V3R (Chakravorty et al. 2007; Frank et al. 2008). Quantification of RNA was made using a Rotor-Gene 6000 qPCR thermocycler (Corbett Life Science®, New South Wales, Australia) with a QuantiFluor™ RNA System (Promega, Madison, WI). Total RNA samples (200 ng in 40 µL per replicate) were shipped to the technical staff of *Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill* for quality control, library preparation, and Illumina HiSeq 2000 PE100 sequencing. Library preparation was done with TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit™ (Illumina, San Diego, CA) and Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit (Epicentre, Madison, WI).

Demultiplexed raw sequencing results were received in paired ends fastq file format (R1 and R2 files) without barcode. The reads were 100 bases long and displayed good quality (Qphred score mean > 30 for each base). Data were filtered with *fastx\_tools* ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) to discard low-quality fragments ( $q = 20$ ,  $p = 90$ ; the reads with <90% base calls with quality above Qphred score  $\geq 20$  were removed). Next, R1 files were reverse-complemented and merged with R2 files. The six libraries were standardized to the sequencing effort of the smallest library to avoid biases in comparative analyses introduced by the sampling depth. After quality filtering and merging, each of the six independent libraries were equalized to 48 million reads, as in the smallest library, by random subsampling using the python script “*subsampler.py*” (David Eccles, unpubl.). The software Rockhopper (Tjaden 2015) was next used to align and annotate the reads on the genome of *S. avermitilis*. Raw sequences were deposited to the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information under the BioProject PRJNA288961.

### Deletion of *hhySL* genes

Complete deletion of *hhySL* genes was performed using the PCR-targeting approach described by Gust et al. (2003) with some modifications. The cosmid CL\_214\_G06 part of the library used to sequence the genome of *S. avermitilis* (Ikeda et al. 2003) was selected because it included the genomic fragment encoding for the HAH flanked by more than 15 kb genomic sequence. The cosmid was transferred in *E. coli* BW25113 by electroporation for two series of PCR-targeting gene inactivation using the lambda red recombination system, induced with 100 mmol/L arabinose. The genes *hhySL* were replaced by apramycin resistance cassette (*aac3(IV)* gene disruption cassette), resulting in cosmid cPCA1. For this purpose, the primers B-F and

B-R were used to amplify the *aac3(IV)* gene disruption cassette from the plasmid pIJ773 (Table S2). As *S. avermitilis* is resistant to ampicillin, *bla* gene of the cosmid cPCA1 was replaced by kanamycin resistance cassette (*neo* gene disruption cassette), resulting in cosmid cPCA2 (Table S1). The *neo* gene disruption cassette was PCR-amplified from pUC4K using the primers A-F and A-R (Table S2). The resulting cosmid cPCA2 was transferred in the stable non-DNA-methylating and conjugative *E. coli dcm*  $\Delta$ (*srl-recA*)306::Tn10 carrying pUB307-*aph*::Tn7 by electroporation. The cosmid was mobilized to *S. avermitilis* by conjugation. Apramycin-resistant *S. avermitilis* exconjugants incapable of growth in the presence of kanamycin were selected as potential double recombinants. Double recombination was confirmed by PCR-targeting *hhyL* and apramycin resistance and kanamycin resistance genes (Table S2).

### H<sub>2</sub> oxidation activity in spores

Mature spores of *S. avermitilis* (wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> strains) were harvested from confluent cultures on MS-agar amended with 10 µmol/L NiCl<sub>2</sub> obtained after 7 days of incubation in the dark at 30°C. Biomass was detached by scratching and repeated pipetting of 1 mL Tris-HCl buffer (100 mmol/L, pH 7.2) on the agar surface. The suspension was transferred in a 15 mL tube and the plate was rinsed with 2 mL Tris-HCl buffer. The resulting spore suspension (3 mL) was next filtered on glass wool fiber and the final volume was adjusted to 10 mL Tris-HCl buffer (Kieser et al. 2000). Spore suspension was transferred into 500 mL Gibco® glass bottles fitted with gastight caps equipped with butyl septa. A defined volume of air mixture containing  $525 \pm 10$  ppm H<sub>2</sub> (GST-Welco, Reading, PA, USA) was injected to the static headspace of the sealed bottles, resulting in a H<sub>2</sub> level of 3–5 ppmv. The spore suspensions were then incubated in the dark at 30°C under agitation (300 rpm). H<sub>2</sub> oxidation activity was monitored using the gas chromatographic assay described by Khdhiri et al. (2015). H<sub>2</sub> concentrations were monitored during 2 days. Spore concentration in the assay was measured with MS-agar plate enumeration technique and H<sub>2</sub> oxidation rate was then expressed in  $\text{amol}_{(\text{H}_2)} \text{c.f.u.}^{-1} \text{h}^{-1}$ . All experiments were done with three biological independent replicates, each replicate consisting of spore suspension harvested from one plate displaying confluent growth with mature spores.

### Biomass yield and spore viability in *S. avermitilis* wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> mutant strains

Biomass yield was calculated as the total amount of dry cell material grown in liquid culture. Both wild-type and mutant strains were cultivated in 25 mL Bacto™ tryptic

soy broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) at 30°C under agitation (300 rpm) during 7 days. Biomass was next collected in 15 mL tubes, centrifuged (5000g, 5 min), dried 24 h at 60°C, and weighted. A spore suspension containing a defined cell concentration determined with hemocytometer (Bright Line Neubauer, Hausser scientific, Horsham, PA, USA) was used to assess the viability of the spores in wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> mutant strains, by agar plate enumeration. Spore suspensions in 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) were obtained from confluent cultures on MS-agar, after filtration on glass wool fiber (Kieser et al. 2000). The viability was expressed as the fraction of total spores determined by hemocytometer that formed c.f.u. on MS-agar after 7 incubation days in the dark at 30°C.

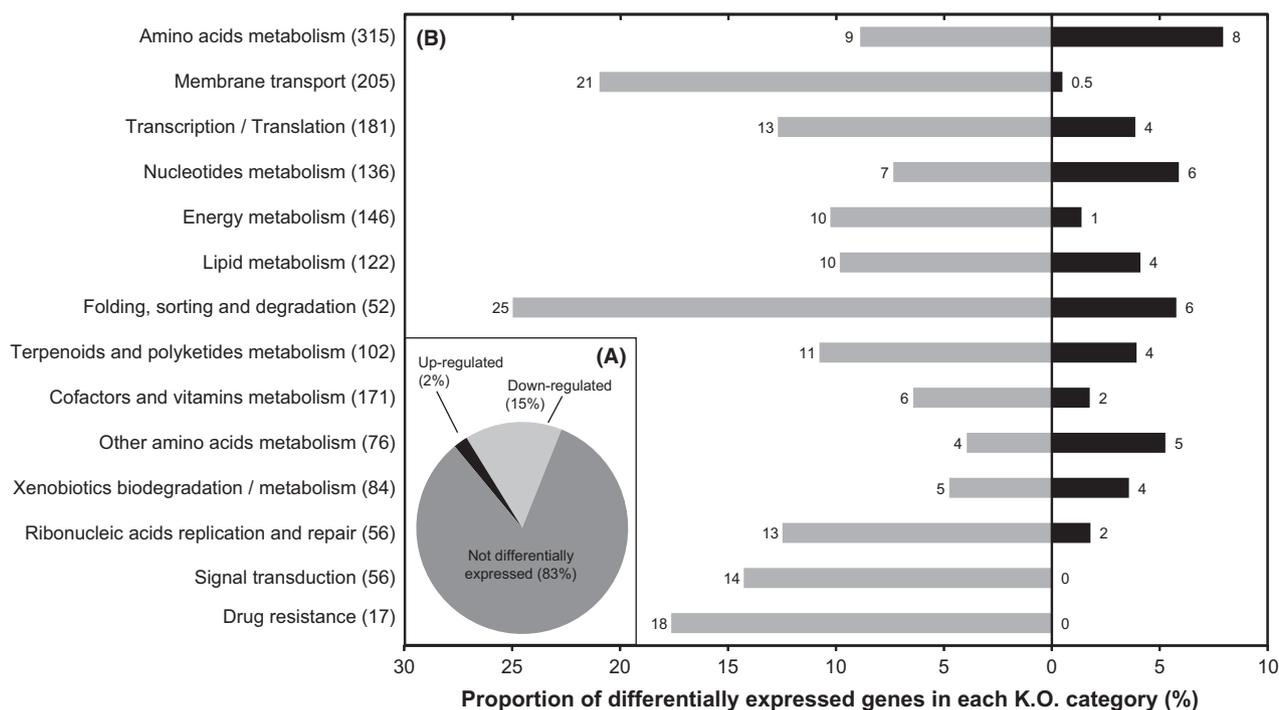
### Statistical analysis

Due to the small number of independent observations (three replicates) and the non-normal distribution of the data, comparisons of spore viability, cell-specific H<sub>2</sub> oxidation rate, and biomass yield in wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> mutant strains of *S. avermitilis* were done by computing the Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks using the Tukey post hoc statistical test implemented in SigmaPlot 12.3 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Comparative transcriptomic analysis of gene expression profiles was performed using the software R (R Core Development Team, 2008) using the package NOISeqBIO (Tarazona et al. 2011). Briefly, expression levels in the raw gene expression table were standardized as a function of gene length using the algorithm RPKM (Mortazavi et al. 2008) and genes represented by a minimum threshold of 1 read per million were eliminated from the dataset. The resulting standardized gene expression table was used to compute the parameters of NOISeqBIO statistics. Two parameters were computed for each individual gene, namely the log-ratio of the average expression values and the average difference values for the two experimental conditions. Both parameters were accompanied with their standard errors to account for biological variability and then combined to derive differential expression  $Z_1$  scores (Tarazona et al. 2011). Statistical significance of differential gene expression was assessed by computing the probability of each  $Z_1$  score to differ from the random distribution of  $Z_0$  scores. This distribution of  $Z_0$  scores was determined by 1000 permutations each consisting to randomly contrast sample labels before computing gene differential expression parameters. The resulting distribution of  $Z_0$  scores consisting of noise in differential gene expression values were distributed into 15 interval classes and a Gaussian kernel density estimation of the distribution allowed to calculate the probability that two genes are differentially expressed. Differential gene expression values were considered significant when the probability to recover the same score value in the noise distribution was ≤5%.

## Results and Discussion

Soil microorganisms are exposed to trace amounts of H<sub>2</sub> diffusing from the atmosphere (0.53 ppmv) and from the soil by N<sub>2</sub>-fixing nodule generating steep H<sub>2</sub> concentration gradients ranging from 20,000 ppmv to trace levels within a 4.5 cm radius (La Favre and Focht 1983; Witty 1991). HAH in H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria, including the spores of *Streptomyces*, thus can be saturated with substrate in nature, potentially resulting in more energy supply in the cells (Conrad 1999). In *S. avermitilis*,  $V_{\max}^{(app)}$  of high-affinity H<sub>2</sub> oxidation activity is reached at 500 ppmv H<sub>2</sub> (Constant et al. 2010). We seek to simulate hydrogenase-saturating and nonsaturating conditions to explore the ecophysiological role of HAH in *S. avermitilis* (wild-type strain) using a comparative transcriptomic analysis. Confluent cultures with aerial mycelium of *S. avermitilis* were exposed to a dynamic headspace constituted of synthetic air mixture with either 0.53 or 500 ppmv H<sub>2</sub> (Fig. S1), corresponding to ambient H<sub>2</sub> exposure treatment (aH<sub>2</sub>) and elevated H<sub>2</sub> exposure treatment (eH<sub>2</sub>). Under these conditions, aerial mycelia differentiation into mature spores was completed within 24 h. Saturation of the HAH of *S. avermitilis* with 500 ppmv H<sub>2</sub> did not exert significant impact on mycelium differentiation program and biomass yield, as observed by indistinguishable spore maturation phenotypes characterized with a brownish pigmentation (data not shown) and RNA extraction yields from individual confluent MS-agar plates that were  $416 \pm 191$  and  $413 \pm 102$  ng  $\mu\text{L}^{-1}$  for aH<sub>2</sub> and eH<sub>2</sub> exposure treatments, respectively.

Six independent libraries (3 replicates  $\times$  2 H<sub>2</sub> treatments) were used for the transcriptomic analysis. In total,  $92 \pm 6\%$  of the reads were successfully aligned against the genome of *S. avermitilis*, with  $46 \pm 2\%$  aligned on sense protein coding genes,  $2 \pm 0.4\%$  on antisense protein coding genes,  $33 \pm 3\%$  on miscellaneous RNA, and  $18 \pm 1\%$  on unannotated regions. The sequencing effort was proven to be sufficient, as depicted by rarefaction analysis showing transcript detection from more than 97% of the 7669 annotated genes in the *S. avermitilis* genome for each library (Fig. S2). In total, 1293 genes were differentially expressed, corresponding to 17% of the annotated genes. Among these genes, 1127 (87%) were downregulated and 166 (13%) were upregulated in eH<sub>2</sub> condition (Fig. 1A). According to visual inspection of *S. avermitilis* spore morphology, H<sub>2</sub> exposure did not influence the transcription profile of genes involved in cell differentiation. These genes classified into four categories encompassing spore germination, substrate mycelium transition, early sporulation, and spore maturation were not differentially expressed (Table S3). This observation confirmed that harvested biomass was at the same developmental stage and that analyzed transcriptomic profiles were representative of mature spores.



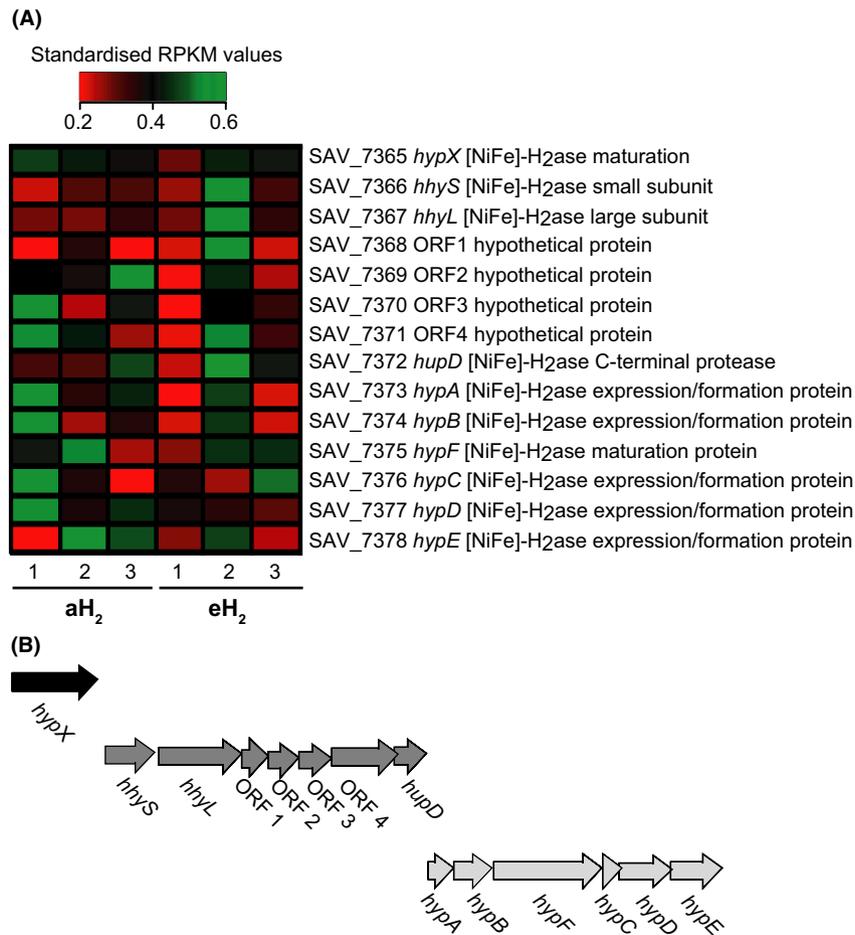
**Figure 1.** Impact of  $H_2$  exposure on the transcriptome of *Streptomyces avermitilis* spores. (A) Proportion of genes showing either lower, higher, or no different expression levels upon  $eH_2$  exposure. (B) Proportion of differentially expressed genes upon  $eH_2$  exposure for individual KEGG categories with grey and black bars representing the number of genes showing lower and higher expression, respectively. The total number of genes in each KO category represented along the y-axis is shown between brackets. Differential expression was computed with NOISeqBIO.

Genes showing significant differential expression in response to  $H_2$  exposure were classified into KEGG Orthology (KO) categories (Fig. 1B). Among the main metabolic functions proposed by KEGG, 17 comprised genes for which the expression was influenced by  $H_2$  exposure. Among these categories, membrane transporters, protein secretion, carbon metabolism, cellular stress, and biosynthesis of secondary metabolites were the most biologically relevant as they pointed to an unexpected HAH-based spore self-sufficiency in the presence of hydrogenase-saturating  $H_2$  levels.

### $H_2$ exposure exerts no impact on HAH genes expression profile

None of the genes encoding the structural and auxiliary components of the HAH was differentially expressed upon  $eH_2$  exposure (Fig. 2A). This observation is in agreement with the lack of putative RH in the genome of *S. avermitilis*. Such a lack of  $H_2$  sensor to regulate the expression of HAH can be explained by the ubiquity of trace  $H_2$  in the environment. The  $H_2$  threshold concentration below which no oxidation activity can be detected in *S. avermitilis* is lower than 100 ppbv (Constant et al. 2010). This is far below the 530 ppbv in the global atmosphere

and the 20,000 ppmv around  $N_2$ -fixing nodules. In contrast, low-affinity [NiFe]-hydrogenases found in *R. eutropha* and other knallgas bacteria display  $H_2$  threshold levels typically above 800 ppbv, explaining why they cannot scavenge atmospheric  $H_2$  (Conrad et al. 1983). These microorganisms benefit from elevated  $H_2$  point sources such as  $N_2$ -fixing nodules for mixotrophic or chemolithotrophic growth and use RH to control the expression of the auxiliary and structural components of their hydrogenases as a function of substrate availability (Lenz and Friedrich 1998; Lenz et al. 2002). However, beside this positive control by  $H_2$ , the expression of low-affinity hydrogenase in knallgas bacteria is activated when preferential organic carbon energy sources are absent (Friedrich 1982). In *S. avermitilis*, it is likely that intertwined regulatory systems triggered by cell differentiation program and availability of nutrients activate the expression of HAH genes restricted in mature spores (Constant et al. 2008, 2010). Although the expression level of HAH genes did not respond to  $H_2$  exposure, increased expression of a siderophore (*sidABCD*) and its transporter (*sideF*) (Fig. 3) might have contributed to facilitate the maturation of the apoenzyme requiring iron in the active site of the large subunit and iron–sulfur clusters channeling electrons through the small subunit. According to their expression profile, genes



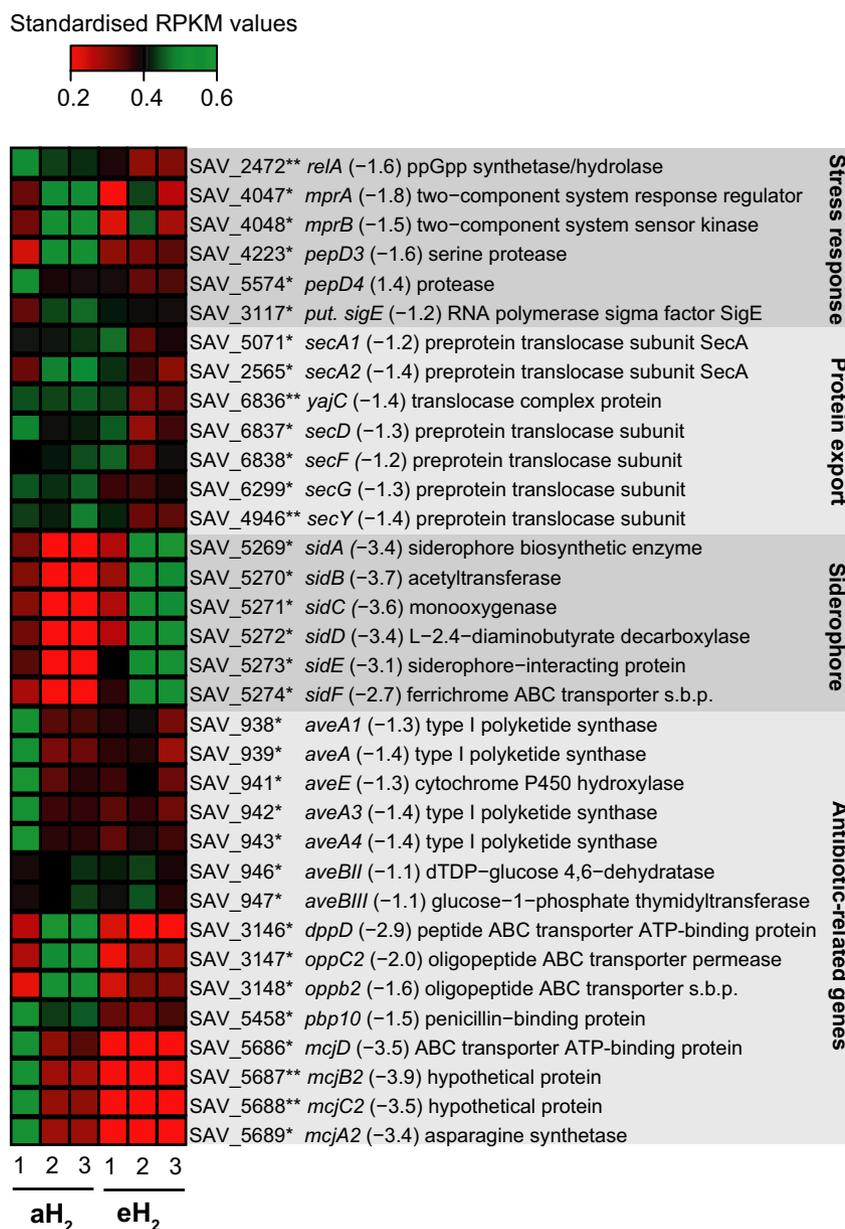
**Figure 2.** Expression of high-affinity NiFe-hydrogenase (HAH) operons in the spores of *Streptomyces avermitilis*. (A) The heat map represents the standardized RPKM expression level of the genes encoding the structural and auxiliary components of HAH. None of them showed significant differential expression in response to H<sub>2</sub> treatments. (B) The genes encoding the structural and auxiliary components of HAH constitute three operons, as deduced by Rockhopper.

encoding the structural and auxiliary components of the HAH in *S. avermitilis* are organized into one monocistronic and two polycistronic operons (Fig. 2B). The gene *hypX* was expressed as a monocistronic operon. The exact function of *hypX* is unknown (Horch et al. 2010), but its organization as a monocistronic operon can explain why this accessory gene is not always present in the genome of high-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria (Constant et al. 2011).

### Elevated H<sub>2</sub> exposure decreases the expression of external nutrient uptake

The two KO categories “folding, sorting and degradation,” and “membrane transport” were those showing the highest response upon H<sub>2</sub> exposure (Fig. 1B). In total, 25% genes encompassing the category folding, sorting and degradation showed a decreased expression level in eH<sub>2</sub>. This

response is mainly attributed to a decreased expression of the genes encoding for the general Sec protein secretion pathway. For instance, extracellular enzymes involved in the hydrolysis of recalcitrant macromolecules available in the environment (e.g., cellulose) into more labile, small molecules that can be imported into the cell possess a peptide signal recognized by the Sec secretion system. In *S. avermitilis*, 10 genes (including 2 *secA* homologs) are involved in the Sec secretion pathway. Among these, the two *secA* homologs (ATPase providing the necessary energy for protein translocation), *secGY* (two of the three genes encoding for transmembrane protein conducting channel), and *secDF* (encoding for proteins attached to the translocase complex potentially involved in the late stages of protein translocation) were differentially expressed upon eH<sub>2</sub> exposure (Fig. 3). Similar response was observed in *M. smegmatis* where inactivation of HAH resulted to higher expression level of the Sec secretion system (Greening



**Figure 3.** Altered expression of stress response, protein export, siderophore, and antibiotic-related genes in the spores of *Streptomyces avermitilis*. The heat map represents the standardized RPKM expression level of the differentially expressed genes encoding for stress response, protein export, siderophore, and antibiotic-related genes. Red and green represent lower and higher expression levels in spores upon eH<sub>2</sub> exposure, respectively. The name of the gene is followed by the expression ratio (eH<sub>2</sub>/aH<sub>2</sub>) and the annotation. The asterisk represent the *P* values computed with NOISeqBIO where “\*” stands for *P* ≥ 0.95 and “\*\*” stands for *P* ≥ 0.99. The abbreviation “s.b.p.” holds for substrate-binding protein. The whole list of differentially expressed genes is provided in Data S1.

et al. 2014b). In contrast to the Sec secretion pathway, expression of the genes of the Twin Arginine Transporters (TAT) system did not respond to H<sub>2</sub> exposure.

According to the lower expression of the components of the Sec secretion pathway, the expression of genes encoding for the importation of nutrients in the cell was also reduced upon eH<sub>2</sub> exposure. *Streptomyces* have an

important variety of permeases (e.g., 53 genes in *S. coelicolor*, 91 genes in *S. avermitilis*), mostly ATP-binding cassette (ABC) constituting the largest KO category in *S. avermitilis* (Ikeda et al. 2003). In total, 21% (43 of the 202 genes) of these transporters were differentially expressed. With the exception of the overexpressed operon *sidABCDE* encoding for putative iron transporter and

siderophore (Ueki et al. 2009), these transporters were characterized by a lower expression level under eH<sub>2</sub>. Repressed transporters corresponded to permeases involved in sugars, branched-chain amino acid, sugar alcohol, and oligopeptides transport (Data S1). Taken together, these observations point to a lower expression of the genes encoding for components participating to prospection, hydrolysis, and importation of processed nutrients in the spores when sufficient H<sub>2</sub> is available to support the energy requirements.

### Influence of H<sub>2</sub> exposure on primary carbon and energy metabolism

The *S. avermitilis* genome encodes four primary energy metabolism pathways: the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway, pyruvate metabolism, the pentose phosphate pathway, and the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Wu et al. 2005). High H<sub>2</sub> exposure resulted to significant influence on EMP and TCA cycle gene expression (Fig. 4). The EMP pathway utilized to convert glucose into pyruvate and energy shares seven enzymes with the gluconeogenesis pathway. The activity of some key enzymes can indicate which direction between EMP pathway (catabolism) and gluconeogenesis (anabolism) is favored in the cell. For instance, the phosphofructokinase (Pfk) catalyses the conversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate. Using ATP for substrate-level phosphorylation, this reaction is unidirectional and represents a limiting step in EMP pathway. The reverse reaction converting fructose 1,6-bisphosphate to fructose 6-phosphate in the gluconeogenesis pathway is catalyzed by the fructose-1,6-bisphosphatase (GlpX). In the presence of eH<sub>2</sub>, *pfkA2* showed a reduced expression level, while the gene *glpX* followed the opposite trend (Fig. 4). Even though the enzyme Pfk is subjected to allosteric regulation in the cell (Fenton et al. 2003), these observations suggest preferential activation of gluconeogenesis instead of EMP pathway in the spores exposed to eH<sub>2</sub>.

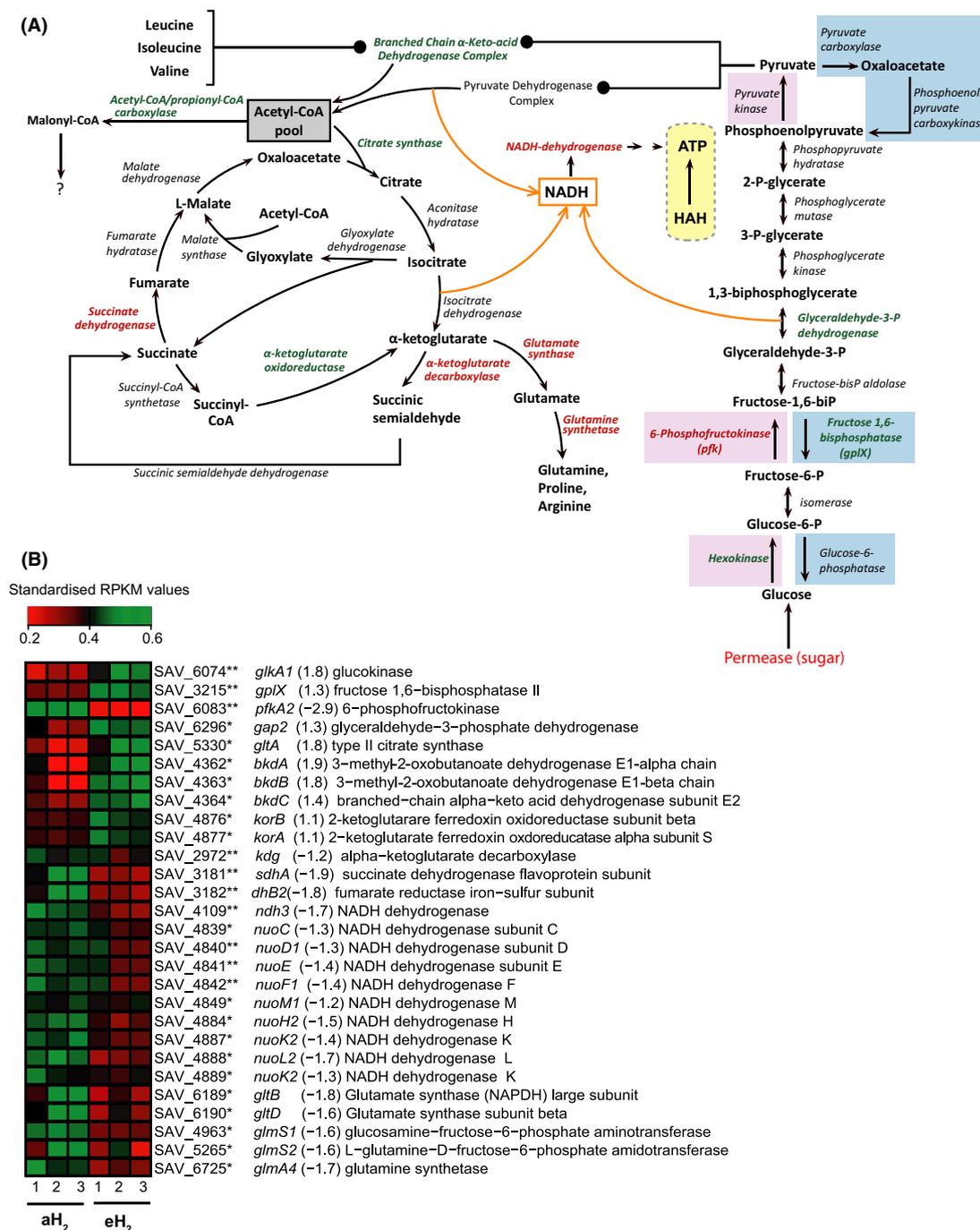
In addition to the oxidative conversion of pyruvate into acetyl-CoA in the EMP pathway, acetyl-CoA can be synthesized through the catabolism of branched-chain amino acids. Elevated H<sub>2</sub> exposure increased the expression of the branched-chain  $\alpha$ -keto-acid dehydrogenase complex involved in this reaction, suggesting that catabolism of leucine, isoleucine, and valine for the production of acetyl-coA was favored to supply both TCA cycle for energy generation as well as fatty acids and polyketide biosynthesis pathways (Fig. 4A). *Streptomyces avermitilis* is characterized by an alternative TCA pathway where the oxidative and reductive pathways differ by two enzymes: the canonical  $\alpha$ -ketoglutarate

dehydrogenase (Kdh) is absent and replaced by two enzymes: the  $\alpha$ -ketoglutarate decarboxylase (Kgd) and the succinic semialdehyde dehydrogenase. These enzymes bridging oxidative and reductive TCA half-cycles were first identified and biochemically characterized in *M. tuberculosis* (Tian et al. 2005). The expression of gene *kgd* decreased under eH<sub>2</sub>, while the expression of the  $\alpha$ -ketoglutarate oxidoreductase (Kgor) showed the inverse trend (Fig. 4). Combined with the decreased expression of succinate dehydrogenase and glutamate synthase/synthetase, these observations suggest that glyoxylate shunt of the TCA pathway was favored when the spores were exposed to eH<sub>2</sub>. This pathway is responsible for anaplerotic reactions replenishing the intermediate of TCA cycle, allowing growth on acetate and fatty acids. Transcriptomic profile did not show evidence for increased catabolism of storage lipid in spores exposed to eH<sub>2</sub>. With the exception of a well-documented depletion of glycogen deposits coordinated with accumulation of trehalose during sporogenesis (Brana et al. 1986; Rueda et al. 2001), very little is known about the primary metabolism of streptomycetes spores. Our data suggest that a combination of stored energy sources and exogenous organic carbon supply the energy requirements in the spores, but further investigations will be necessary to assess carbon flux distribution and metabolism.

In addition to generate ATP, the EMP pathway and TCA cycle generate reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) used as an electron carrier supplying the respiratory chain through the NADH dehydrogenase. Under eH<sub>2</sub> exposure, the expression of 10 of the 28 NADH dehydrogenase subunits genes decreased (Fig. 4). The physiological electron acceptor of HAH in *S. avermitilis* is unknown but decreased expression of NADH dehydrogenase suggests that HAH participates to the generation of proton motive force for ATP generation in the spores. Even though NADH dehydrogenase genes did not show increased expression in the HAH deletion mutant of *M. smegmatis*, the activity was mainly observed in the membrane fraction (Greening et al. 2014a,b), which is an argument in favor of a link of HAH with the respiratory chain for ATP generation.

### Elevated H<sub>2</sub> exposure resulted to a lower cellular stress

During translation of mRNA into protein, a nutrient deficiency results in blockage of the ribosome when deacylated tRNA binds in the ribosomal A-site. This causes a stringent stress response induced by the RelA protein that generates alarmone ppGpp (guanosine tetraphosphate). The alarmone ppGpp changes the

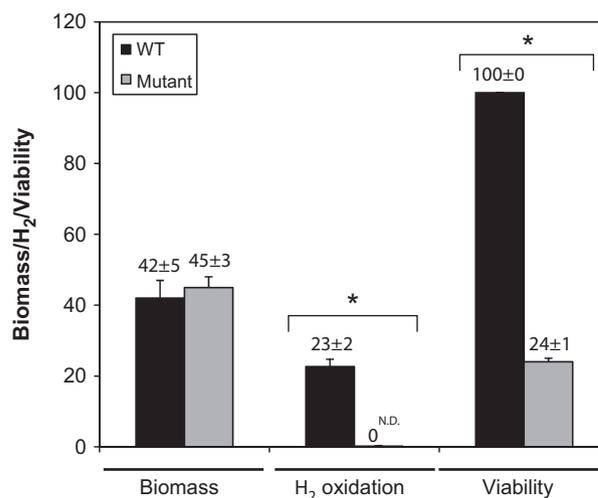


**Figure 4.** Altered expression of carbon and energy metabolic pathways in the spores of *Streptomyces avermitilis* in response to eH<sub>2</sub> exposure. (A) Differential expression for the genes involved in the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway, the TCA cycle, and the NADH dehydrogenase. The genes represented in red were downregulated while those represented in green were upregulated in the presence of eH<sub>2</sub> level. The orange arrows represent different sources of NADH. The genes highlighted in the blue boxes are specific to the gluconeogenesis pathway, those highlighted in the red boxes are specific to the EMP pathway. The HAH is highlighted in a yellow box to show its potential role for ATP generation in the spores of *S. avermitilis*. (B) The heat map shows the expression level of the genes presented in (A), where red and green represent lower and higher expression level in spores upon eH<sub>2</sub> exposure, respectively. The name of the gene is followed by the expression ratio (eH<sub>2</sub>/aH<sub>2</sub>) and the annotation. The asterisk represent the *P* values of the differential expression computed with NOISeqBIO where “\*” stands for *P* ≥ 0.95 and “\*\*\*” stands for *P* ≥ 0.99. The whole list of differentially expressed genes is provided in Data S1.

affinity of the RNA polymerase for some promoters (including the ribosomal) in favor of those that encode stress response genes. In the case of *Streptomyces*, the alarmone informs a state of famine, which induces cell differentiation accompanied by the production of secondary metabolites (Kang et al. 1998; Hoyt and Jones 1999). Spores exposed to eH<sub>2</sub> showed decreased expression of *relA*, responsible for the production of the alarmone ppGpp (Fig. 3). This observation supports the hypothesis of self-sufficiency presented in the previous sections describing the impact of H<sub>2</sub> on Sec protein secretion pathway, sugar transport and carbon metabolism. Lower expression of *relA* might explain the decreased expression of avermectin biosynthesis genes (7), beta-lactamases linked genes (3) and genes involved in the biosynthesis of the antimicrobial peptide microcin under eH<sub>2</sub> exposure (Fig. 3). Furthermore, the penicillin-binding protein *pbp10* gene and transporter genes conferring beta-lactam resistance (*dppD*, *oppC2*, *oppB2*) showed lower expression level under eH<sub>2</sub> (Fig. 3). This is consistent with the decreased expression of the putative sigma factor  $\sigma^E$  and the putative components of the stress detection system including *mprAB* involved in signal transduction and the protease *pepD* that are expressed when the cell envelope loses its integrity in response to external cues such as membrane-targeting antibiotics, including beta-lactams. The energy supplied by HAH leading to a decreased dependence on exogenous organic substrate thus appeared to reduce stress related to nutrient starvation through the stringent response, resulting to a decrease of secondary metabolite biosynthesis.

### Extending gene expression profile response through genetic inactivation of the HAH

Our previous observations suggest that a lack of HAH would influence fitness in the spores of *S. avermitilis*. This hypothesis was tested by the deletion of *hhySL* genes in the model bacterium. The deletion of *hhySL* through double recombination was confirmed by antibiotic resistance phenotypes and PCR (Fig. S3A). There was no significant difference in the biomass production yield between wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> strains after vegetative growth in TSB broth (Fig. 5), further highlighting the fact that HAH is mainly expressed and active in spores and does not support mixotrophic growth. This observation is in sharp contrast with *M. smegmatis* for which inactivation of HAH resulted in a decreased biomass yield characteristic to classical mixotrophic growth reported in knallgas bacteria (Berney and Cook 2010). Growth of the mutant strain on MS-agar led to mature dark brown-colored spores, visually indistinguishable



**Figure 5.** Impact of HAH inactivation on the phenotype of *Streptomyces avermitilis*. Cell-specific H<sub>2</sub> oxidation rate in spores (expressed in  $\text{amol c.f.u.}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), viability of spores (expressed in %), and biomass yield of vegetative cultures in TSB broth (expressed in  $\text{mg mL}^{-1}$ ) of wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> strains are presented. The symbol "\*" denotes significant difference in H<sub>2</sub> oxidation activity and viability between wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> mutant strains (ANOVA,  $P > 0.95$ ). The term "N.D." denotes the absence of detectable H<sub>2</sub> oxidation activity in the spores of *hhySL*<sup>-</sup> mutant strain. All experiments were done with three independent replicates, with the exception of spores viability in wild-type strain (two independent replicates).

from the wild-type spores (Fig. S3B). As expected, spores of wild-type strain displayed high-affinity H<sub>2</sub> oxidation activity, while no significant H<sub>2</sub> uptake rate was detected in the mutant strain (Fig. 5). According to the hypothesis of HAH-based self-sufficiency model derived from theoretical energy yield of H<sub>2</sub> oxidation (Constant et al. 2011) and the transcriptomic analysis presented in this study, spores of the mutant strain showed a drastic loss of viability, with 4.2 folds less regeneration than the wild-type strain (Fig. 5).

### Survival–mixotrophy as a new paradigm for the ecology of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria

H<sub>2</sub> concentration is currently perceived as a driving force behind the definition of the ecological niche of aerobic H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria in soil (La Favre and Focht 1983). Indeed, soil microbial communities are exposed to two different diffuse sources of H<sub>2</sub>, namely the atmosphere and legume nodules generating H<sub>2</sub> as obligate by-product of N<sub>2</sub>-fixation (Hoffman et al. 2009). This results in microniches encompassing 20,000 ppmv to subatmospheric levels (<0.530 ppmv) of H<sub>2</sub> (Hunt et al. 1988; Rasche and Arp 1989; Witty 1991; Constant et al. 2009). Two complementary experimental evidences suggest that

juxtaposition of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria in soil is defined by H<sub>2</sub> concentration gradients. On one hand, H<sub>2</sub> oxidation activity in soil is characterized by a biphasic kinetics explained by the occurrence of two subpopulations of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria demonstrating either low or high-affinity for H<sub>2</sub> (Håring and Conrad 1994). On the other hand, low-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria were shown to be enriched and/or activated following elevated H<sub>2</sub> soil exposure (La Favre and Focht 1983; Popelier et al. 1985; Dong and Layzell 2001). Both substrate affinity and threshold concentration below which hydrogenase cannot scavenge H<sub>2</sub> thus limit the beneficial effect of this energy source on the distribution of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria in soil. However, the notion of two extreme subpopulations defined by their differential affinity toward H<sub>2</sub> was questioned after the observation of intermediate  $_{(app)}K_m$  values in soil (Schuler and Conrad 1991) and *Streptomyces* isolates (Constant et al. 2010), suggesting the occurrence of a continuum of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria subpopulations in nature.

Taken together, our results suggest that the mechanism explaining the impact of H<sub>2</sub> concentration gradients on the structure of microbial communities is beyond the limitation of substrate affinity and threshold concentration. Indeed, we demonstrate for the first time that HAH homologs in different taxonomic groups of bacteria are characterized by distinct ecophysiological roles. For instance, the HAH is unevenly distributed in a number of *Actinobacteria* species encompassing *Mycobacterium* and *Streptomyces* (Constant et al. 2010). In *M. smegmatis*, H<sub>2</sub> was used both as an energy source for mixotrophic growth and to supply the respiratory chain during long-term persistence (Berney and Cook 2010; Greening et al. 2014b). In contrast, H<sub>2</sub> uptake activity was restricted to mature spores in *S. avermitilis*, where H<sub>2</sub> appeared to reduce the dependence on carbon energy sources for persistence and dissemination under a mixotrophic-based survival mode. These observations suggest that diffuse sources of H<sub>2</sub> will induce different response in soil *Mycobacterium* and *Streptomyces* subpopulations. It is expected that the biomass of H<sub>2</sub>-oxidizing *Mycobacterium* would increase directly upon elevated H<sub>2</sub> exposure owing to their mixotrophic growth. On the other hand, H<sub>2</sub> exposure would favor the persistence rather than the growth of the spores of H<sub>2</sub>-oxidizing *Streptomyces*, resulting to a delayed response of their biomass to H<sub>2</sub> exposure. Under this assumption, substrate affinity is not the principal factor influencing the distribution of H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria. Considering the reduced or increased expression of secondary metabolites and extracellular proteins secretion in *S. avermitilis* in response to differential H<sub>2</sub> exposure as well as the complex nature of microbe–microbe interactions in soil, there is an imperative need to better understand the impact of

H<sub>2</sub> on soil microbial community structure and function (Stein et al. 2005; Zhang et al. 2009; Osborne et al. 2010). Metabolomic investigation of carbon flux in spores thriving under mixotrophic survival mode would be crucial to validate and better understand the proposed HAH-based self-sufficiency model in the spores of high-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing streptomycetes.

## Acknowledgments

This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)–Discovery grant to P. C. The authors are grateful to the personnel staff members of Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill for the preparation of libraries and sequencing services.

## Conflict of Interest

None declared.

## References

- Berney, M., and G. M. Cook. 2010. Unique flexibility in energy metabolism allows mycobacteria to combat starvation and hypoxia. *PLoS ONE* 5:e8614.
- Brana, A. F., C. Mendez, L. A. Diaz, M. B. Manzanal, and C. Hardisson. 1986. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology* 132:1319–1326.
- Chakravorty, S., D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 69:330–339.
- Conrad, R. 1999. Soil microorganisms oxidizing atmospheric trace gases (CH<sub>4</sub>, CO, H<sub>2</sub>, NO) *Indian. J. Microbiol.* 39:193–203.
- Conrad, R., M. Aragno, and W. Seiler. 1983. The inability of hydrogen bacteria to utilize atmospheric hydrogen is due to threshold and affinity for hydrogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 18:207–210.
- Constant, P., L. Poissant, and R. Villemur. 2008. Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the first microorganism demonstrating high-affinity uptake of tropospheric H<sub>2</sub>. *ISME J.* 2:1066–1076.
- Constant, P., L. Poissant, and R. Villemur. 2009. Tropospheric H<sub>2</sub> budget and the response of its soil uptake under the changing environment. *Sci. Total Environ.* 407:1809–1823.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, J. Pratscher, and R. Conrad. 2010. Streptomycetes contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ. Microbiol.* 12:821–829.

- Constant, P., S. P. Chowdhury, L. Hesse, J. Pratscher, and R. Conrad. 2011. Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6027–6035.
- 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. USA* 97:6640–6645.
- Dong, Z., and D. B. Layzell. 2001. H<sub>2</sub> oxidation, O<sub>2</sub> uptake and CO<sub>2</sub> fixation in hydrogen treated soils. *Plant Soil* 229:1–12.
- Ehhalt, D. H., and F. Rohrer. 2009. The tropospheric cycle of H<sub>2</sub>: a critical review. *Tellus B* 61:500–535.
- Fenton, A. W., N. M. Paricharttanakul, and G. D. Reinhart. 2003. Identification of substrate contact residues important for the allosteric regulation of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow, Russ. Fed.)* 42: 6453–6459.
- Frank, J. A., C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson, and G. J. Olsen. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2461–2470.
- Friedrich, C. G. 1982. Depression of hydrogenase during limitation of electron donors and depression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 149:203–210.
- Greening, C., and G. M. Cook. 2014. Integration of hydrogenase expression and hydrogen sensing in bacterial cell physiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 18:30–38.
- Greening, C., M. Berney, K. Hards, G. M. Cook, and R. Conrad. 2014a. A soil actinobacterium scavenges atmospheric H<sub>2</sub> using two membrane-associated, oxygen-dependent [NiFe] hydrogenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:4257–4261.
- Greening, C., S. G. Villas-Bôas, J. R. Robson, M. Berney, and G. M. Cook. 2014b. The growth and survival of *Mycobacterium smegmatis* is enhanced by co-metabolism of atmospheric H<sub>2</sub>. *PLoS ONE* 9:e103034.
- Greening, C., P. Constant, K. Hards, S. E. Morales, J. G. Oakeshott, R. J. Russell, et al. 2015. Atmospheric hydrogen scavenging: from enzymes to ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:1190–1199.
- Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, and K. F. Chater. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1541–1546.
- Häring, V., and R. Conrad. 1994. Demonstration of two different H<sub>2</sub>-oxidizing activities in soil using an H<sub>2</sub> consumption and a tritium exchange assay. *Biol. Fertil. Soils* 17:125–128.
- Hoffman, B. M., D. R. Dean, and L. C. Seefeldt. 2009. Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Acc. Chem. Res.* 42:609–619.
- Horch, M., L. Lauterbach, M. Saggiu, P. Hildebrandt, F. Lenzian, R. Bittl, et al. 2010. Probing the active site of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by *in situ* EPR and FTIR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49:8026–8029.
- Hoyt, S., and G. H. Jones. 1999. RelA is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 181:3824–3829.
- Hunt, S., S. Gaito, and D. Layzell. 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. *Planta* 173:128–141.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, et al. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotech.* 21:526–531.
- Kang, S. G., W. Jin, M. Bibb, and K. J. Lee. 1998. Actinorhodin and undecylprodigiosin production in wild-type and *relA* mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 168:221–226.
- Khdhiri, M., L. Hesse, M. E. Popa, L. Quiza, I. Lalonde, L. K. Meredith, et al. 2015. Soil carbon content and relative abundance of high affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria predict atmospheric H<sub>2</sub> soil uptake activity better than soil microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 85:1–9.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. W. Hopkins. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, England.
- Kim, S. B., and M. Goodfellow. 2002. *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a taxonomic home for the avermectin-producing streptomycetes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:2011–2014.
- La Favre, J. S., and D. D. Focht. 1983. Conservation in soil of H<sub>2</sub> liberated from N<sub>2</sub> fixation by Hup<sup>-</sup> nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:304–311.
- Lenz, O., and B. Friedrich. 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12474–12479.
- Lenz, O., M. Bernhard, T. Buhrke, E. Schwartz, and B. Friedrich. 2002. The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4:255–262.
- Meredith, L. K., D. Rao, T. Bosak, V. Klepac-Ceraj, K. R. Tada, C. M. Hansel, et al. 2013. Consumption of atmospheric hydrogen during the life cycle of soil-dwelling actinobacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* 6:226–238.

- Mettel, C., Y. Kim, P. M. Shrestha, and W. Liesack. 2010. Extraction of mRNA from Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5995–6000.
- Mortazavi, A., B. A. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, and B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5:621–628.
- Novelli, P. C., P. M. Lang, K. A. Masarie, D. F. Hurst, R. Myers, and J. W. Elkins. 1999. Molecular hydrogen in the troposphere: global distribution and budget. *J. Geophys. Res.* 104:30427–30444.
- Ōmura, S., H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, et al. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12215–12220.
- Osborne, C. A., M. B. Peoples, P. H. Janssen. 2010. Detection of a reproducible, single-member shift in soil bacterial communities exposed to low levels of hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1471–1479.
- Popelier, F., J. Liessens, and W. Verstraete. 1985. Soil H<sub>2</sub>-uptake in relation to soil properties and rhizobial H<sub>2</sub>-production. *Plant Soil* 85:85–96.
- R Core Development Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. In: *Computing, R Foundation for Statistical Computing* (ed), Vienna, Austria.
- Rasche, M. E., and D. J. Arp. 1989. Hydrogen inhibition of nitrogen reduction by nitrogenase in isolated soybean nodule bacteroids. *Plant Physiol.* 91:663–668.
- Rueda, B., E. M. Miguélez, C. Hardisson, and M. B. Manzanal. 2001. Changes in glycogen and trehalose content of *Streptomyces brasiliensis* hyphae during growth in liquid cultures under sporulating and non-sporulating conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 194:181–185.
- Schäfer, C., B. Friedrich, and O. Lenz. 2013. Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:5137–5145.
- Schuler, S., and R. Conrad. 1991. Hydrogen oxidation in soil following rhizobial H<sub>2</sub> production due to N<sub>2</sub> fixation by a *Vicia faba* - *Rhizobium leguminosarum* symbiosis. *Biol. Fertility Soils* 11:190–195.
- Schwartz, E., A. Henne, R. Cramm, T. Eitinger, B. Friedrich, and G. Gottschalk. 2003. Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H<sub>2</sub>-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* 332:369–383.
- Stein, S., D. Selesi, R. Schilling, I. Pattis, M. Schmid, and A. Hartmann. 2005. Microbial activity and bacterial composition of H<sub>2</sub>-treated soils with net CO<sub>2</sub> fixation. *Soil Biol. Biochem.* 37:1938–1945.
- Tarazona, S., F. García-Alcalde, J. Dopazo, A. Ferrer, and A. Conesa. 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 21:2213–2223.
- Tian, J., R. Bryk, M. Itoh, M. Suematsu, and C. Nathan. 2005. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of  $\alpha$ -ketoglutarate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10670–10675.
- Tjaden, B. 2015. De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data. *Genome Biol.* 16:1.
- Ueki, M., R. Suzuki, S. Takamatsu, H. Takagi, M. Uramoto, H. Ikeda, et al. 2009. Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*. *Actinomycetologica* 23:34–39.
- Vignais, P. M., and B. Billoud. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* 107:4206–4272.
- Witty, J. F. 1991. Microelectrode measurements of hydrogen concentrations and gradients in legume nodules. *J. Exp. Bot.* 42:765–771.
- Wu, G., D. E. Culley, and W. Zhang. 2005. Predicted highly expressed genes in the genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and the implications for their metabolism. *Microbiology* 151:2175–2187.
- Zhang, Y., X. He, and Z. Dong. 2009. Effect of hydrogen on soil bacterial community structure in two soils as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Plant Soil* 320:295–305.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

**Data S1.** Excel spreadsheet showing all differentially expressed genes along with their p-value and eH<sub>2</sub>/aH<sub>2</sub> expression ratio.

**Figure S1.** Illustration of the dynamic microcosm chambers used for the transcriptomic analysis.

**Figure S2.** Assessment of the sequencing effort invested in the transcriptomic analysis.

**Figure S3.** (A) Confirmation of double recombination in *Streptomyces avermitilis hhySL*<sup>-</sup> by PCR. (B) Photograph of confluent cultures on MS-agar to show the indistinguishable phenotype between wild-type and *hhySL*<sup>-</sup> mutant strains.

**Table S1.** Strains and vectors utilized in this study.

**Table S2.** List of oligonucleotides utilized and their associated PCR conditions.

**Table S3.** Absence of differential expression for genes involved in four development stages of streptomycetes.