HAL
open science

# Caractérisation de mutants de Saccharomyces cerevisiae résistants au lanthane et à l'ytterbium obtenus par ingénierie évolutive

Jordan Ory

## To cite this version:

Jordan Ory. Caractérisation de mutants de Saccharomyces cerevisiae résistants au lanthane et à l'ytterbium obtenus par ingénierie évolutive. Biotechnologies. 2018. hal-03024919

**HAL Id: hal-03024919**

**https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03024919**

Submitted on 26 Nov 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MASTER BioMANE
Biotechnologies Microbiologie Aliment
Nutrition Environnement

BioMANE

# FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

## Master BioMANE 2ème année

***Microbiologie Environnementale et Sanitaire (MES)***

Année Universitaire 2017/2018

# Caractérisation de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* résistants au lanthane et à l'ytterbium obtenus par ingénierie évolutive

Mémoire présenté par

ORY Jordan

Stage effectué du 15 janvier au 13 juillet 2018

Au laboratoire du LIEC, UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine

Encadré par BLAUDEZ Damien, enseignant-chercheur
et GROSJEAN Nicolas, doctorant

LIEC
LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE DES ENVIRONNEMENTS CONTINENTAUX

Table des matières

I. Liste des tableaux ..... 3
II. Liste des figures ..... 3
III. Abréviations ..... 5
IV. Introduction ..... 6
IV.1. Description de la structure d'accueil ..... 6
IV.2. Les Terres rares : généralités ..... 6
IV.3. Utilisation des terres rares ..... 9
IV.4. Les pollutions aux terres rares ..... 10
IV.5. Effets des terres rares à différentes échelles du vivant ..... 11
IV.6. *Saccharomyces cerevisiae* : généralités et interactions avec les métaux ..... 13
IV.7. L'ingénierie évolutive ..... 14
V. Objectifs du stage ..... 15
VI. Matériels et méthodes ..... 15
Saccharomyces cerevisiae et conditions de culture ..... 16
Traitement mutagène de S. cerevisiae par le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ..... 16
Détermination des EC50 (concentration efficace médiane) des différentes souches ou populations ..... 17
Protocole d'ingénierie évolutive et obtention de clones résistants au lanthane ou à l'ytterbium ..... 17
Isolement et distinction de clones résistants issus de l'expérience d'ingénierie évolutive ..... 18
Tests de résistance des clones à d'autres stress ..... 19
Dosage du lanthane et de l'ytterbium par ICP-MS ..... 20
Extraction et dosage des ADNg ..... 20
Séquençage et analyses des ADNg des clones résistants ..... 21
Analyses statistiques des résultats ..... 21
VII. Résultats et discussion ..... 22
VII.1. Mutagénèse par traitement à l'EMS ..... 22
VII.2. Ingénieries évolutives ..... 23
..... 25
VII.3. Distinction et isolement des mutants résistants ..... 26
VII.4. EC50 des mutants résistants ..... 30
VII.5. Dosage du lanthane et de l'ytterbium dans les cellules ..... 32
VII.6. Résistances croisées ..... 33
VII.7. Analyses génomiques des mutants ..... 35
VIII. Conclusions ..... 41
IX. Bibliographie ..... 42
I. Annexes ..... 46
Résumé ..... 54
Abstract ..... 54

# I. Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques cas répertoriés d'effets des terres rares sur l'être humain..... 13
Tableau 2 : Gamme des concentrations des TR et des autres métaux utilisées dans les tests de résistance métallique..... 20
Tableau 4 : Mutants les plus résistants au lanthane ou à l'ytterbium ..... 28
Tableau 5 : Mutants sélectionnés suite à la catégorisation des 30 mutants résistants. ..... 30
Tableau 6: Quantité d'ADN obtenues suite aux extractions ..... 35
Tableau 7 : Nombre de mutations détectées par chromosome en fonction des mutants par rapport à la souche WT S. cerevisiae BY4741 à nouveau séquencée. Une même couleur représente 2 clones identiques ou peu divergents. ..... 36
Tableau 8 : Gènes mutés présentant des mutations non-sens (codon stop) ou INDEL ( xx- ou -xx) chez les différents mutants des ingénieries évolutives au lanthane et à l'ytterbium……...38

# II. Liste des figures

Figure 1 : Les terres rares dans le tableau périodique (modifié). ..... 7
Figure 2 : Production et demande mondiale en REE depuis 1900. (Zhou et al., 2017). REO : Rare Earth Oxides ..... 7
Figure 3 : Abondance moyenne des éléments dans les sols. ..... 8
Figure 4 : Diverses utilisations des terres rares dans les différents domaines technologiques. ..... 9
Figure 5 : Niveau de recyclabilité des éléments (Ciacci et al., 2015) ..... 11
Figure 6 : Fonctions et gènes impliqués chez S. cerevisiae en réponse au Zn et le Cd (Lehembre et al., 2013) ..... 13
Figure 7 : Evolution des concentrations en lanthane (bleu) et en ytterbium (gris) utilisées lors des ingénieries évolutives. ..... 18
Figure 8 : Schéma simplifié des étapes d'isolement des colonies sur géloses à la distinction des 15 meilleurs résistants pour les 2 expériences d'ingénierie évolutive..... 19
Figure 9a et b : Croissance de S. cerevisiae sur les 2 traitements (EMS et témoin) (a) et viabilité des cellules après différents temps de traitement à l'EMS (b). En bleu la souche traitée à l'EMS, en orange la souche non traitée (n = 4)..... 22
Figure 10a et b : Détermination des concentrations en ytterbium (a) et lanthane (b) réduisant de 50% le taux de croissance de la population traitée à l'EMS (Pop EMS) et de S. cerevisiae BY4741 (non traitée)..... 23
Figure 11 : Evolution de la croissance de la population traitée à l'EMS (pop EMS) aux différents cycles d'exposition au lanthane. En bleu, les DO mesurées à 24h et en orange les DO mesurées à 48h. ..... 24
Figure 12 : Evolution de la croissance de la population traitée à l'EMS (Pop EMS) aux différents cycles d'exposition à l'ytterbium. En bleu les DO mesurées à 24h et en orange les DO mesurées à 48h. ..... 25
Figure 13a et b : Croissance sur milieu YNB des souches sauvage (Wt) et des populations résistantes au lanthane (Pop La) ou à l'ytterbium (Pop Yb)..... 26

Figure 14a et b: Croissance des clones isolés sur boites et testés en présence de 7,5 mM de lanthane pendant 24h pour les clones Pop La (a) et 500 µM d'ytterbium pendant 48h pour les mutants EMS Yb (b). ..... 27
Figure 15a et b: Heatmaps des mutants résistants au lanthane (a) et à l'ytterbium (b) à 2 jours de croissance ..... 30
Figure 16 : Détermination de l'EC50 des mutants résistants au lanthane. Les cercles représentent les taux de croissance µ et les triangles les EC50. ..... 30
Figure 17 : Détermination de l'EC50 des mutants résistants à l'ytterbium. Les cercles représentent les taux de croissance µ, les triangles les EC50 ..... 31
Figure 18a et b : Contenu en lanthane (a) et en ytterbium (b), déterminé par ICP-MS, des mutants résistants et wt exposés pendant une heure à 50 µM de lanthane ou 6 µM d'ytterbium.. ..... 32
Figure 19 : Niveau de résistance des mutants à différentes TR après 7 jours de croissance……..323

Figure 18a et b : Niveaux de résistance des mutants à d'autres métaux et à un stress oxydant ($H_2O_2$) après 7 jours de croissance……...324

# III. Abréviations

EMS : méthanesulfonate d'éthyle

TR / REE: Terre rare / Rare earth element

Pop EMS 30 : population de *S. cerevisiae* utilisée après 30 min de traitement à l'EMS

Pop La : population finale obtenue suite à l'ingénierie évolutive au lanthane

Pop Yb : population finale obtenue suite à l'ingénierie évolutive à l'ytterbium

EMS La : clones issus de l'ingénierie évolutive au lanthane

EMS Yb : clones issus de l'ingénierie évolutive à l'ytterbium

# IV. Introduction

## IV.1. Description de la structure d'accueil

Le Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) est une Unité Mixte de Recherche (n°7360), dépendante du CNRS et de l'Université de Lorraine. Les activités de recherche ont pour objectifs généraux de comprendre le fonctionnement des écosystèmes terrestres fortement anthropisés et de proposer des solutions de réhabilitations des sites pollués. Pour répondre à ces objectifs, la pluridisciplinité est essentielle au LIEC, comptant les enseignants-chercheurs, les chercheurs, le personnel technique ou encore les doctorants et les post-doctorants pour un total d'environ 130 personnes, réparties sur 3 sites en Lorraine. Les sites Aiguillettes et Charmois sont situés à Vandœuvre-Lès-Nancy alors que le site Bridoux est localisé à Metz. Au vu des nombreuses compétences réparties sur l'ensemble du personnel et des infrastructures, 4 pôles ont été créés permettant de couvrir un large champ scientifique et de regrouper les capacités d'analyses. On y compte le pôle chimie, le pôle instrumentation-terrain, le pôle physico-chimie et le pôle du vivant. Les cinq équipes en place au sein du LIEC sont les suivantes : les cycles biogéochimiques dans les systèmes perturbées (CyBLE), la physico-chimie et réactivité des surfaces et interfaces (PhySI), la toxicologie de l'Environnement (TEv), l'écologie du stress (ECoSe) et l'écologie microbienne des milieux anthropisés (EMMA). Cette dernière équipe étudie les compartiments microbiens dans les problématiques de contaminations organiques et inorganiques, comme les terres rares, et essaye de déterminer les impacts de ces pollutions sur les diversités spécifique et fonctionnelle des microorganismes mais aussi les réponses de ces derniers lors de ces interactions. L'étude des impacts des terres rares sur le compartiment microbien fait partie intégrante des recherches menées au sein de cette équipe.

## IV.2. Les Terres rares : généralités

Les terres rares (TR ou Rare Earth Elements (REE) en anglais ; Figure 1) est un groupe de 17 éléments métalliques, regroupant les 15 lanthanides, lanthane (La), cérium (Ce), praséodyme (Pr), néodyme (Nd), prométhium (Pm), samarium (Sm), europium (Eu), gadolinium (Gd), terbium (Tb), dysprosium (Dy), holmium (Ho), erbium (Er), thulium (Tm), ytterbium (Yb) et lutécium (Lu), avec le scandium (Sc) et l'yttrium (Y). Ils partagent des caractéristiques physico-chimiques similaires grâce à une configuration électronique uniforme au sein de ce groupe. Ces TR sont considérées comme des métaux émergents en lien direct avec l'évolution des technologies. Leur exploitation et utilisation croissante depuis les années 1960 sont en effet dues à leurs propriétés physiques nouvelles ou qui surpassent les métaux précédemment utilisés (Zhou et al., 2017; Figure 2). Ils appartiennent ainsi aux métaux dits « stratégiques », du fait de leur rôle majeur dans la société,

à la fois au niveau économique et géopolitique, principalement par leur répartition géographique et les pays exploitants et exportateurs.

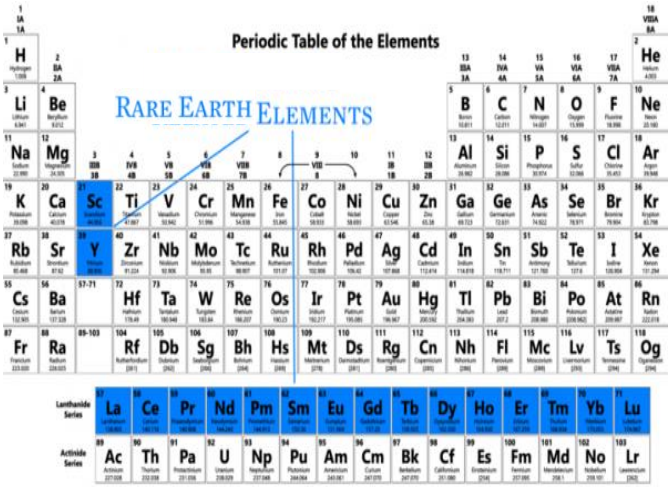



*Figure 1 : Les terres rares dans le tableau périodique (modifié). Source : https://uknow.uky.edu*

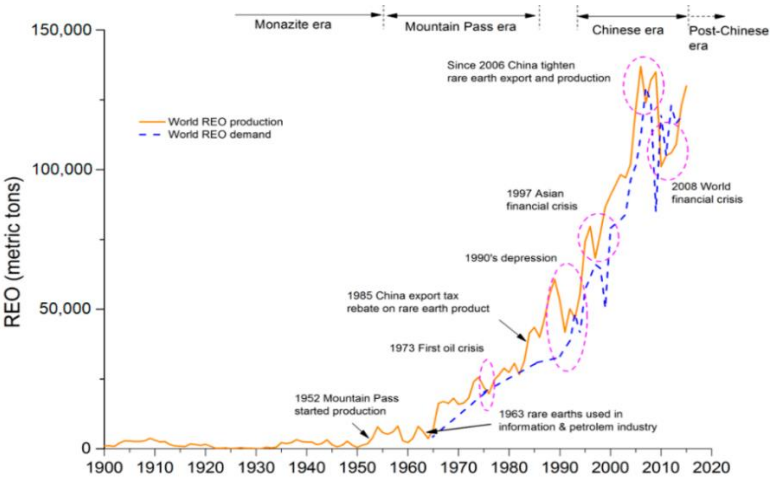



*Figure 2 : Production et demande mondiale en REE depuis 1900. (Zhou et al., 2017). REO : Rare Earth Oxides*

Deux groupes artificiels sont généralement utilisés afin de distinguer les différentes TR ; les TR légères d'une part (LREE : Z=57 à 64 ; La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd) et TR lourdes d'autre part (HREE : Z=65 à 71 ; Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu + Y). L'yttrium est souvent associé aux HREE de par ses propriétés chimiques similaires (Ramos et al. 2016). Cette classification varie en fonction de la communauté scientifique, qui se base sur la configuration électronique individuelle de chaque TR et sur leurs propriétés, mais aussi selon les industries minières se basant uniquement sur les numéros atomiques (LREE : 57 à 62 ; HREE : 63 à 71 + Y) (Simandl 2014). Malgré leur nom évocateur, les terres rares ne sont pas caractérisées par leur rareté dans la croûte terrestre (Figure 3) ; on peut par exemple noter que le cérium ou le lanthane sont plus abondants que le cuivre et le plomb et que la moins abondante des terres rares, le thulium, est retrouvée en plus grande quantité que l'or ou l'argent (Zhou et al., 2017). Cependant leur valeur est impactée par les méthodes d'extraction utilisées, les quotas d'exportation et leur indispensabilité dans les technologies existantes et émergentes (Massari et Ruberti, 2012; Khan et al., 2017).

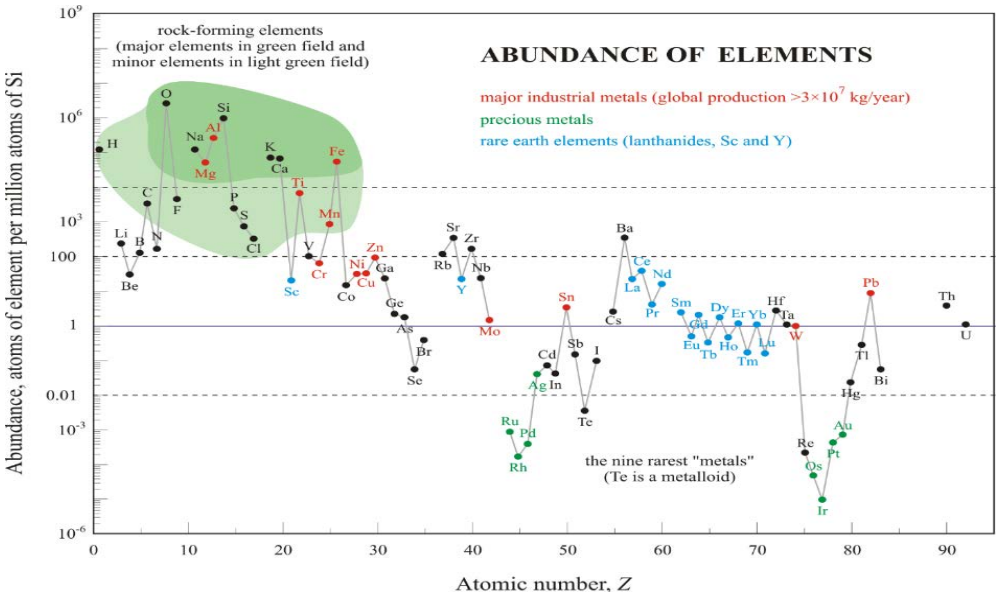



*Figure 3 : Abondance moyenne des éléments dans les sols.*
*Source : pubs.usgs.gov*

Dans les exploitations minières, les TR sont en majorité sous forme d'oxydes minéraux (REO : rare earth oxides) associés aux roches mais en petites quantités (REO < 3% dans les roches), faisant d'eux des sous-produits issus de différents processus de raffinement et non des matières premières, expliquant actuellement en partie cette dénomination de « rare » et associé à leur distribution hétérogène à travers le globe (Gonzalez et al. 2014; Liang, Li, et Wang 2014). Les roches contenant ces métaux sont nombreuses et dépendent du type de métal en question avec pour les LREE une prédominance dans les monazites, bastnaésites, ancylites, lanthanites, stillwellites, allanites, cerianites, britholites et loparites. Les HREE sont quant à elles majoritairement contenues dans les xénotines, euxenites, yttrotantalites, samarskites et gadolinites. Parmi ces roches, seulement la monazite, la xénotine et la bastnaésite sont considérées comme les plus rentables à exploiter (Chakhmouradian et Wall 2012; Khan et al. 2017). En détail, la monazite est un minéral phosphaté composé en majorité de Ce, La, Pr et Nd avec 4 à 12% d'éléments radioactifs comme le thorium et l'uranium. La xénotine est un minéral phosphaté composé à majorité d'yttrium et la bastnaésite est un minéral fluorocarbonaté composé de La, Ce et Y et (Simandl 2014). Ils sont ensuite extraits avec des méthodes classiques ou spécifiques et raffinés des éléments indésirables pour les rendre plus pures, justifiant une partie des coûts élevés de production et d'exportation. Concernant ces 2 facteurs, le monopole international est détenu par la Chine avec plus de 80% de la production mondiale (Figure 2), principalement dû à la grande quantité de TR disponibles sur son territoire qui est estimée à 164 mégatonnes, la plus importante dans le monde, et aux nombreux gisements exploités (Simandl 2014; Zhou et al., 2017).

## IV.3. Utilisation des terres rares

L'augmentation de l'exploitation des TR de ces 50 dernières années s'explique par les nombreuses applications et l'indispensabilité de ces métaux dans une grande variété de technologies contemporaines. On les trouve par exemple dans les batteries et aimants, essentiels pour l'industrie automobile et audiovisuelle, mais également dans les écrans, le verre, les céramiques et d'autres matériaux servant dans les industries nucléaires et militaires (Figure 4). Cette dépendance actuelle aux terres rares est issue de leur configuration électronique conférant des propriétés uniques dans le domaine du magnétisme avec des aimants puissants et légers ; le domaine de l'optique avec des fluorescences et émissions de lumières caractéristiques des lasers actuels ; et d'autres propriétés physico-chimiques exploitées dans la métallurgie, les technologies vertes ou encore l'électronique (Massari et Ruberti, 2012; Zhou et al., 2017). Cet ensemble d'applications justifie leur caractère de métaux stratégiques en plus des manques d'alternatives viables et économiques pour pallier leur utilisation (Massari et Ruberti, 2012).

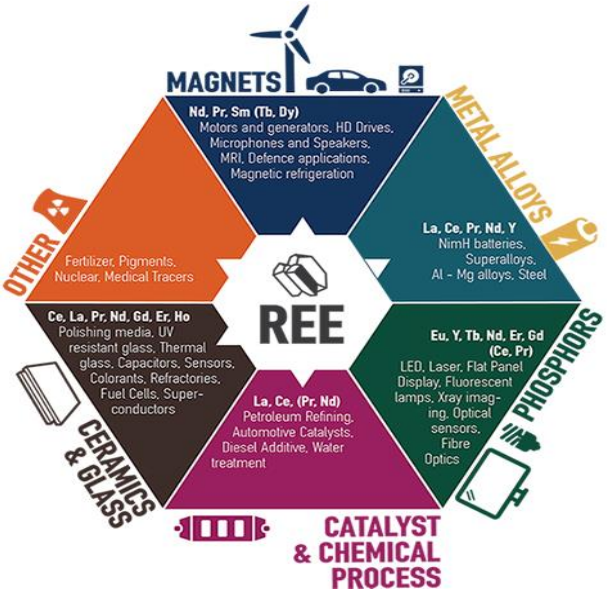



*Figure 4 : Diverses utilisations des terres rares dans les différents domaines technologiques. Source : Eurare.eu*

De plus, si les industries utilisent aussi bien les terres rares légères que lourdes, on observe une prédominance des LREE comparées aux HREE, représentant 62.5% et 37.5% du marché respectivement, avec le lanthane et le cérium, les 2 principales terres rares exploitées dans le monde (Zhou, Li, et Chen 2017). Cette prédominance s'explique évidemment par leurs propriétés mais également par l'extraction plus aisée des terres rares légères comparée aux lourdes (Massari et Ruberti 2012; Zhou et al., 2017). Des métaux comme le lanthane et l'ytterbium, à la base des expériences de ce stage, sont de plus en plus exploités avec le temps. En effet, le lanthane, une terre rare légère, est utilisé pour de nombreuses applications. Il est principalement utilisé dans une majorité de batteries plus performantes que les modèles classiques au nickel et cadmium, dans les caméras ou encore dans les films radiographiques. L'ytterbium, une terre rare lourde, est

essentiellement présent dans les technologies de fibres optiques, les panneaux solaires, les lasers et aussi comme source de radiation pour les unités portables de rayons X (Weber et Reisman, 2012).

## IV.4. Les pollutions aux terres rares

En contrepartie de l'utilisation exponentielle de ces métaux à travers le globe, des pollutions aux terres rares apparaissent dans l'environnement et sont issues de 3 principaux facteurs : les exploitations minières avec les méthodes d'extractions et de raffinements, l'utilisation directe de TR comme amendements et l'inefficacité de leur recyclage actuellement.

Pour commencer, plusieurs recherches sur les sites miniers tendent à montrer une forte dispersion des TR dans l'environnement. Proche de la mine de Baotou en Chine, les pollutions sont telles que des concentrations en terres rares jusqu'à 27 000 µg/g sont détectées dans les sols, soit 160 fois plus que la moyenne chinoise de 176 µg/g, avec un constat similaire dans les rivières à proximité (30 000 µg/L contre 170 µg/L de moyenne) (Liang, Li, et Wang 2014). L'atmosphère proche n'est pas épargnée comme à Jiangxi, site minier où 360 ng/m$^3$ de TR sont détectées proche de l'exploitation, opposé aux 86 ng/m$^3$ d'une zone plus éloignée du site (Liang, Li, et Wang 2014). Les végétaux proches de sites exploités présentent des taux anormalement élevés en TR, parfois très largement supérieurs aux limites imposées par les organismes de santé publique chinois sur des espèces comestibles retrouvées à proximité comme la patate douce qui peut présenter des taux avoisinants les 13 µg/g, soit 26 fois plus que la limite autorisée de 0,5 µg/g (Liang, Li, et Wang 2014).

Ensuite, l'utilisation d'amendements riches en TR dans l'agriculture et les élevages favorise leur dispersion dans l'environnement. Depuis les années 1980, la Chine utilise annuellement 50 à 100 millions de tonnes de lanthane et cérium dans de nombreux fertilisants, améliorant la germination, les résistances des plantes et la productivité (Ramos et al. 2016; Khan et al. 2017). En parallèle, l'utilisation de TR comme compléments alimentaires dans les élevages porcins, pour augmenter plus rapidement la croissance et le poids des animaux, contribuent à leur dispersion via les rejets engendrés, que ce soit en Chine ou en Suisse qui a également mis en place cette pratique (Gonzalez et al. 2014; Panichev 2015).

Enfin, l'inefficacité du recyclage des TR, inférieur à 1% en 2011 et donc négligeable comparé aux métaux plus usuels (fer, nickel…), est une des composantes majeures de ces pollutions avec l'apparition de décharges incluant de nombreux matériaux riches en TR (Ciacci et al., 2015 ; Figure 5). Cependant, la meilleure compréhension physico-chimique de ces métaux et le potentiel économique majeur qu'ils représentent tendent à favoriser les recyclages des TR (Binnemans et al., 2013; Ciacci et al., 2015).

*Figure 5 : Niveau de recyclabilité des éléments (Ciacci et al., 2015)*
*Rouge : Quantité dispersée pendant l'utilisation ; Bleu : potentiellement recyclable ; Jaune : Partie non-recyclée ; Gris : Non spécifié*

## IV.5. Effets des terres rares à différentes échelles du vivant

Malheureusement, ces pollutions ne sont pas sans conséquences sur les êtres vivants qui y sont confrontés et de nombreuses interactions, bénéfiques comme délétères, sont observées. A l'échelle des microorganismes, chez des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Myxococcus xanthus*, le lanthane peut s'accumuler jusqu'à 120 mg/g de masse sèche et 428 mg/g de masse sèche respectivement (Pagano 2016). En dehors de l'accumulation au sein des cellules, les TR sont capables de s'adsorber sur les surfaces bactériennes. Par exemple, *P. aeruginosa* est capable d'adsorber jusqu'à 171 mg de La, 124 mg d'Eu et 146 mg d'Y/g de biomasse (Pagano 2016). Les lanthanides peuvent également être importants comme facteurs de croissance, démontré avec des bactéries méthylotrophes comme *Burkholderia ambifaria* et *Cupriavidus necator* ou de nouvelles espèces comme *Novimethylophilus kurashikiensis*, grâce à XoxF-MDH, une méthanol déshydrogénase lanthanide dépendante essentielle pour le développement de certaines souches ne possédant que cette isoenzyme (Lv, Sahin, et Tani 2018). *A contrario*, des effets inhibiteurs sont constatés sur la bactérie marine *Vibrio fischeri*, dont l'étude de sa bioluminescence en présence de TR permet d'obtenir des EC50 pour 3 à 20 mg TR/L (TR : Gd, Nd, Ce, Pr, La). Ces TR agiraient sur l'intégrité de la membrane plasmique de cette bactérie, expliquant cet effet toxique (Kurvet et al. 2017). Toutefois, ces concentrations sont très inférieures à ce que l'on peut trouver dans l'océan, de l'ordre de $10^{-7}$ à $10^{-8}$ mg/L pour toutes les TR (Piper et Bau, 2013). D'autres organismes ne sont pas épargnés par une potentielle exposition à ces métaux comme le champignon *Trichoderma atroviride* dont la croissance est altérée en présence de 1 mM de lanthane en culture liquide ou

encore le protozoaire *Tetrahymena thermophila,* avec des EC50 correspondants à des concentrations de 28 à 42 mg TR/L (TR : Gd, Nd, Ce, Pr, La) (Pagano 2016; Kurvet et al. 2017).

Chez les plantes, les TR ont des avantages dans la croissance par une production plus forte de proline ou encore un meilleur processus de photosynthèse mais également des effets délétères sur la germination des graines, la structure des chromosomes et la paroi cellulaire via une substitution du calcium par le lanthane dans cette dernière. Cependant, ces effets sont variables selon les terres rares utilisées et les espèces végétales (Gonzalez et al. 2014; Liang, Li, et Wang 2014; Ramos et al. 2016).

Chez les invertébrés, le lanthane est essentiellement toxique dû à son rayon ionique similaire à celui du calcium, entrainant une compétition au sein de ces organismes. Une étude traitant de sa toxicité sur 5 invertébrés a démontré un effet toxique plus important sur la reproduction que sur la survie de l'individu lui-même à des concentrations allant de 300 mg à 1500 mg La/kg de sol sec selon les invertébrés. Ces concentrations sont peu élevées comparées aux niveaux moyens des sols non pollués de 6 à 50 mg La/kg de sol sec, suggérant qu'un apport mineur suffirait à être toxique pour ces espèces et limiter leur descendance (Li, Verweij, et van Gestel 2018).

Sur des mammifères comme les rats et souris, les particules de cérium auraient comme propriétés de s'accumuler et de provoquer des inflammations dans les tissus pulmonaires quand ce dernier est inhalé (Pagano et al. 2015). L'ingestion de métaux comme le lanthane, le cérium ou le néodyme à partir de 10 à 20 mg/kg selon la TR, se traduit par une accumulation dans les noyaux hépatocytaires de façon dose-dépendante et dans les mitochondries dans une moindre mesure, pouvant entrainer la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de radicaux provoquant des dommages hépatocytaires. (Huang et al. 2011).

Chez l'Homme, l'exposition aux terres rares, qu'elle soit environnementale ou dans le cadre professionnel, n'est pas sans risque sur l'organisme et des effets négatifs sont à noter malgré le manque d'informations dans la littérature (Tableau 1). Dans des zones où les individus sont exposés aux terres rares, des pneumoconioses sont observées avec dans un cas la confirmation de la présence de particules de cérium et de lanthane dans les tissus pulmonaires. Plus récemment, une accumulation de terres rares dans les cuirs chevelus a été détectée pour des populations proches de sites miniers, fortement corrélée avec la distance de la mine (Pagano et al. 2015).

Malgré ces observations, les interactions intracellulaires et les fonctions impliquées dans la résistance ou la sensibilité à ces métaux sont très peu connues actuellement. Néanmoins, des organismes exposés survivent généralement à ces contacts prolongés et il est donc intéressant de pouvoir mettre en évidence les mécanismes derrière les fonctions impliquées. Simples mutations ?

Ou mécanismes plus conséquents comme des insertions/délétions, duplications… ? Et cela surtout chez les eucaryotes où les données manquent encore.

*Tableau 1 : Quelques cas répertoriés d'effets des terres rares sur l'être humain (Pagano et al., 2015)*

| Job | No. cases | Disease/other findings |
|---|---|---|
| Photoengraver | 1 | Interstitial pneumoconiosis |
| | 1 | Pulmonary fibrosis/excess REE levels in lung biopsies |
| | 1 | Pneumoconiosis/excess REE levels in lungs and in nails |
| | 5 | Pneumoconiosis/excess REE levels in lungs |
| Movie projectionist | 1 | Pneumoconiosis |
| Movie projectionist | 1 | Pneumoconiosis |
| Optical lens polisher | 1 | Pneumoconiosis/Ce particulate deposits in the lungs |
| Crystal smelter and Movie projectionist | 1 | Pleural plaque and interstitial lung disease |
| Crystal polisher | 1 | Dendriform pulmonary ossification |

## IV.6. *Saccharomyces cerevisiae* : généralités et interactions avec les métaux

Ainsi, l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle eucaryote est approprié dans cette conjecture. En détail, il s'agit d'un organisme eucaryote unicellulaire de 6 à 8 µm de diamètre se présentant sous forme haploïde ou diploïde, très utilisé comme modèle d'étude des cellules eucaryotes par sa simplicité d'utilisation, son faible coût de culture et principalement grâce à son génome entièrement séquencé disposant des données fonctionnelles sur 85% des 5800 gènes connus (Goffeau et al. 1996). De plus, des études sur des mécanismes de résistance de *S. cerevisiae* sont mis en évidence pour différents métaux et font intervenir une grande diversité de fonctions, à toutes les échelles cellulaires. Pour le zinc et le cadmium, la chélation des métaux par des protéines riches en cystéines, la dégradation protéique, l'homéostasie du fer, l'inactivation de certaines protéines régulatrices ou encore certaines fonctions inconnues impliquant des déshydrogénases interviendraient dans ces résistances (Lehembre et al., 2013, Figure 6). D'autres études montrent également l'implication de liaisons à l'ADN des métaux, de nombreuses protéines métal-dépendantes (métallothionéines), du rôle essentiel de la vacuole dans la séquestration et la détoxication, du rôle du glutathion et également d'interactions avec le cytosquelette (Mehra et Winge, 1991; Gharieb et Gadd, 1998; Prévéral et al., 2006; Thorsen et al., 2009).

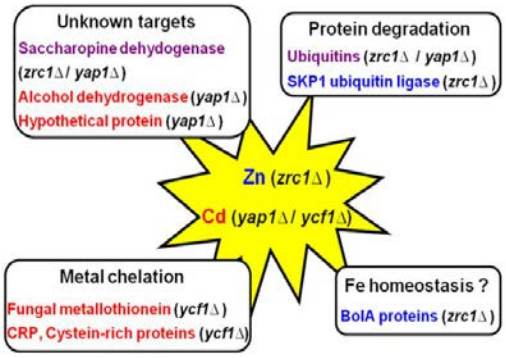



*Figure 6 : Fonctions et gènes impliqués chez S. cerevisiae en réponse au Zn et le Cd (Lehembre et al., 2013)*
*Rouge / bleu / violet : phénotypes tolérants suite à la restauration du phénotype sauvage des souches mutantes zrc1 (bleu), yap1 (rouge) ou les 2 (violet)*

En parallèle, des interactions entre *S. cerevisiae* avec des terres rares existent déjà dans la littérature, faisant de lui un candidat idéal pour effectuer d'autres tests sur ces métaux. Parmi les résultats publiés, on observe plusieurs effets des lanthanides envers le calcium : à des concentrations proches de 1 mM une forte accumulation de TR s'effectue à la surface cellulaire, bloquant l'entrée du calcium et l'apparition de la toxicité. A plus faibles concentrations, ces lanthanides sont absorbés par la cellule et entreraient en compétition avec le calcium via l'entrée préférentielle du lanthane par des canaux calcium spécifiques (Cch1/Mid1) (Ene et al. 2015). Plus positivement, le lanthane testé à 0,3 g/L agirait sur la croissance et le contenu lipidique de *S. cerevisiae,* par un effet supposé de substitution au calcium ou de blocage de certaines enzymes calcium-dépendantes (Kolouchova et al. 2016). L'ytterbium serait également capable de s'adsorber et s'accumuler sur les surfaces cellulaires de *S. cerevisiae* (Jiang et al. 2012). Mais aucun mécanisme de résistance n'a encore été mis en évidence pour les terres rares.

## IV.7. L'ingénierie évolutive

Généralement, l'étude des mécanismes de résistance se met en place par des techniques de criblage de banque de mutants, de mutagénèse aléatoire ou dirigée ou encore de surexpression / délétion de gènes. Mais une méthode émergente se basant sur le principe de la sélection naturelle pouvant analyser ces mécanismes de résistance, appelée l'ingénierie évolutive, est de plus en plus utilisée du fait de nombreux avantages. En détail, elle permet d'exploiter les capacités d'adaptation des microorganismes pour obtenir ou améliorer directement un phénotype souhaité, contrairement aux méthodes indirectes plus aléatoires comme la sélection par des mutagènes. Les avantages sont l'obtention de mutants résistants sans connaissances préalables sur les gènes ou fonctions impliquées et une meilleure compréhension de la dynamique et flexibilité cellulaire par la détermination des mécanismes moléculaires issus de cette stratégie (Çakar et al. 2009; Adamo et al. 2012). Là où les méthodes classiques comme l'utilisation de banque de mutants ou de mutations dirigées ne permettent pas de comprendre l'incidence d'une pollution métallique à long terme, celle-ci à l'avantage de « mimer » une interaction sur de longues périodes et de mieux comprendre l'émergence de mécanismes adaptatifs pour lutter face à ces stress métalliques.

L'ingénierie évolutive est une technique appliquée avec succès dans la littérature sur *S. cerevisiae* pour obtenir de nombreux résistants à de multiples métaux comme le nickel, le cuivre ou encore le cobalt simplement par une augmentation progressive et contrôlée des concentrations métalliques avec le temps. Elle a permis d'identifier des mécanismes de résistances allant de la régulation génique avec des gènes surexprimés correspondant à une multitude de stress et de l'homéostasie du fer, à l'accumulation (ou l'inverse) de métaux, de mécanismes de résistances communs ou spécifiques en comparaison des résistants sur d'autres métaux et même de la diploïdisation d'une

souche haploïde (Cakar et al. 2005; Çakar et al. 2009; Adamo et al. 2012; Küçükgöze et al. 2013; Turanlı-Yıldız et al. 2017). Cette stratégie peut donc être transposée dans le cadre de cette étude pour mettre en évidence les mécanismes de résistance à des terres rares légères et lourdes.

## V. Objectifs du stage

Dans le cadre dans ce stage, l'axe principal des recherches menées sera l'étude des mécanismes de résistance au lanthane et à l'ytterbium, deux terres rares représentatives des LREE et HREE respectivement, chez le modèle eucaryote *S. cerevisiae*. Actuellement, ces mécanismes sont inconnus en ce qui concerne ces métaux malgré la richesse d'études sur les stress métalliques et ces résultats seront novateurs au sein de ce sujet d'actualité. Ce projet de recherche s'inscrit dans la problématique plus globale de la thèse de GROSJEAN Nicolas, doctorant au LIEC, étudiant l'impact des TR chez différents organismes modèles et l'étude des mécanismes de résistance par criblage de banques de mutants, de mutants de transporteurs et de techniques omiques. Ici, l'ingénierie évolutive sera la stratégie utilisée pour initier les premières recherches sur le sujet de par son approche plus directe, son efficacité et sa facilité d'utilisation dans un laboratoire. Préalablement, un traitement par un mutagène comme le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) sera appliqué afin d'augmenter la diversité génétique de la souche sauvage et d'améliorer les chances d'obtention de mutants résistants à ces métaux. Ces souches mutantes obtenues par traitement EMS seront à la base de l'ingénierie évolutive à la fois pour le lanthane et en parallèle avec l'ytterbium. Les super-résistants apparus après de nombreux cycles d'exposition à ces TR seront analysés par des études génomiques, et des tests phénotypiques avec d'autres métaux seront réalisés pour observer ou non des mécanismes de résistance communs ou spécifiques. Les résultats obtenus à la suite de ces expériences introduiront dans le futur d'autres recherches pour mieux cerner l'impact des exploitations, de l'utilisation et des pollutions induites par les terres rares sur le vivant.

## VI. Matériels et méthodes

## ***Saccharomyces cerevisiae et conditions de culture***

La souche haploïde BY4741 *(MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0)* de *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme souche de référence (souche assimilée à une souche sauvage que nous appellerons désormais Wt : wild type dans les expériences ci-après). Les milieux de culture utilisés, liquides ou solides via l'ajout d'agar (15 g/l), sont le milieu Yeast extract Peptone Dextrose « YPD » (pour 1L : extrait de levures 10 g, peptone 20 g, glucose 20 g) ; le milieu Yeast Nitrogen Base « YNB » (pour 1L : YNB sans acides aminés 6,7 g, glucose 20 g, milieu synthétique sans uracile pour levures 1,92 g, uracile 72 mg, pH 5,8) et le milieu Yeast Nitrogen Base avec β-Glycerophosphate « YNB Gp » (pour 1L : YNB avec sulfate d'ammonium sans phosphate et sans NaCl 5,7 g, KCl 548 mg, NaCl 100 mg, milieu synthétique sans uracile pour levures 1,92 g, uracile 76 mg, glucose 20 g, β-glycérophosphate 1 mM, pH 5,8). Les cultures sont incubées à 28°C et à 180 rpm pour les cultures liquides.

Les différents sels de métaux utilisés sont sous forme chlorure ($(X)Cl_2$ ou $(X)Cl_3$) et les solutions stock sont préparées à 1, 10, 100, 500 mM ou 1 M selon la concentration finale à ajouter dans un milieu donné. Le milieu YNB Gp est le milieu de culture utilisé dans la majorité des expériences, sauf pour les tests de résistance aux autres stress. Pour les tests phénotypiques sur géloses, des photos sont prises à 2, 3 et/ou 7 jours d'incubation. Ces temps, permettant de visualiser une croissance correcte, sont en effet variables selon les conditions et concentrations testées en lanthane et en ytterbium.

## ***Traitement mutagène de* S. cerevisiae *par le méthanesulfonate d'éthyle (EMS)***

Le traitement à l'EMS s'effectue sur la souche BY4741 de *S. cerevisiae.* Une culture ($2.10^8$ cellules/mL) de cette souche a été réalisée dans du milieu YNB et a été récoltée par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 min. Le culot a ensuite été lavé 3 fois avec du tampon phosphate 50 mM (pH 7.0) puis resuspendu avec du milieu YNB et séparé en deux afin d'inoculer deux flacons de culture de 10 mL contenant le même milieu. Du méthanesulfonate d'éthyle (EMS) (300µL), ou de l'eau distillée dans le cas du traitement témoin, sont ajoutés avant de réaliser une incubation d'une heure à 150 rpm. Puis, 3 mL de thiosulfate de sodium à 10% (v/v) sont ajoutés à des prélèvements de 3 mL de la culture après 20, 30 et 60 min d'exposition. Les échantillons sont alors centrifugés à 4000 rpm pendant 5 min, suivi d'un lavage avec du milieu YNB. Cette étape a été répétée trois fois au total. Finalement les culots sont resuspendus dans 6 mL de ce même milieu et stockés à 4°C. Des étalements de 4 réplicas sur milieu gélosé YPD des dilutions $10^0$ (DO initiale = 1) à $10^{-5}$ des populations traitées et témoins aux 3 temps d'exposition ont permis le calcul des taux de survie des après 3 jours d'incubation et dénombrement des UFC.

## ***Détermination des EC50 (concentration efficace médiane) des différentes souches ou populations***

Des cultures en phase exponentielle de croissance de *S. cerevisiae* traitée et non traitée à l'EMS ($DO_{600nm}$ initiale = 0,15) ont été réparties en triplicas dans une microplaque 96 puits et mises à incuber en présence de 10 concentrations de lanthane (37,5 µM à 262,5µM) ou de 10 concentrations d'ytterbium (2,5 µM à 17,5 µM). La plaque a alors été incubée en lecture continue à DO 630 nm à 28°C pendant 16 à 24 h.

La même approche a été menée afin de déterminer ce paramètre EC50 pour les mutants obtenus après l'expérience d'ingénierie évolutive. Ces différents échantillons ont été testés avec des concentrations de 1 à 7 mM de lanthane ou avec 100 à 500 µM d'ytterbium.

Les EC50 ($\mu_{maxtémoin}/2$) sont calculés à partir des taux de croissance µ issus de ces tests.

## ***Protocole d'ingénierie évolutive et obtention de clones résistants au lanthane ou à l'ytterbium***

Le protocole d'ingénierie évolutive a été adapté des études menées par Cakar et al. (2005) et Küçükgöze et al. (2013). Au premier cycle de l'ingénierie, la souche traitée à l'EMS en phase stationnaire a été utilisée pour ensemencer des cultures ($DO_{600nm}$ initiale = 0,2) dans du milieu YNB Gp contenant soit 25 µM de lanthane soit 1,5 µM d'ytterbium puis incubées 24 h. Les concentrations utilisées correspondent respectivement aux EC10 de *S. cerevisiae* BY4741 pour le lanthane et l'ytterbium. Ensuite, les cultures ont été centrifugées à 4000 rpm pendant 5 min et lavées deux fois avec du milieu YNB Gp. Une partie des cultures est stockée à -80°C dans du glycérol 30% pour conservation. La deuxième partie a été utilisée afin d'ensemencer comme précédemment de nouvelles cultures contenant des concentrations croissantes en lanthane ou ytterbium. Dans le cas où la DO est inférieure à 6 après 24 h, la culture est alors remise en incubation 24 h supplémentaires. De nouveaux cycles de culture ont alors été réalisés de la même façon. La concentration en lanthane ou en ytterbium est augmentée à chaque cycle jusqu'à une inhibition complète de croissance constatée à 24 h et 48 h. Le détail des différents paliers des concentrations de lanthane et d'ytterbium est précisé dans la figure 7. Après avoir atteint une inhibition complète de croissance des cultures après 48 h, c'est la culture à la concentration précédente qui constituera alors ce que nous nommerons dans ce mémoire la population finale issue de l'ingénierie au stress lanthane (Pop La) et celle issue de l'ingénierie au stress ytterbium (Pop Yb). La stabilité des résistances de ces

populations finales sera testée par trois passages successifs dans du milieu YNB Gp puis un passage dans la dernière concentration en lanthane ou en ytterbium où une croissance était observée.

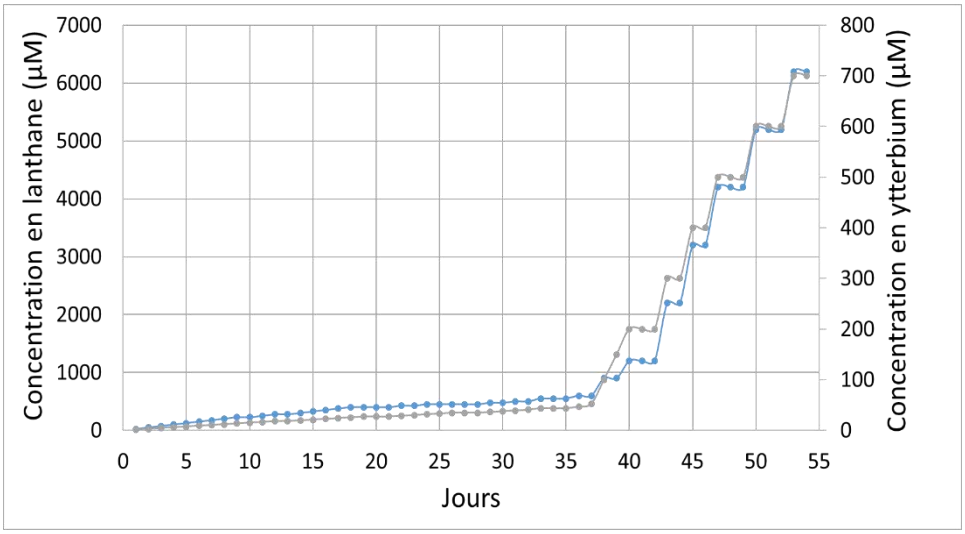



*Figure 7 : Evolution des concentrations en lanthane (bleu) et en ytterbium (gris) utilisées lors des ingénieries évolutives.*

## ***Isolement et distinction de clones résistants issus de l'expérience d'ingénierie évolutive***

Afin d'individualiser différents clones issus de chaque population finale résistante, des dilutions de $10^0$ (DO = 1) à $10^{-5}$ des deux populations obtenues précédemment, ainsi que de celles de la souche sauvage, ont été déposées et étalées sur géloses YNB Gp sans métal ou contenant de l'ytterbium (500 µM ou 700 µM) ou du lanthane (800 µM ou 1 mM). Après 48 h de croissance, des colonies individuelles ont alors été prélevées et repiquées sur milieu YNB Gp ; pour chaque population finale (Pop La et Pop Yb), 42 colonies ont été isolées sur milieu sans métal et 42 colonies sur milieu amendé en métal. Ces 84 colonies ont été réparties dans une microplaque 96 puits, dans laquelle ont été ajoutés 6 réplicas de la souche sauvage (Wt), 3 de la population initiale et traitée à l'EMS (EMS 30) et 3 populations finales issues de l'expérience d'ingénierie (EMS La et EMS Yb). Ainsi, au total, deux microplaques de 96 clones ont été réalisées et incubées pendant 24 h.

Ces cultures mères (DO saturante) ont alors permis d'ensemencer de nouvelles cultures visant à déterminer le niveau de résistance individuel de chaque clone au lanthane et à l'ytterbium. Un suivi continu de la DO à 600 nm pendant 48h a ainsi été réalisé sur des réplicas (5 réplicas de chaque microplaque) de ces milieux ensemencés à DO = 0,2. Les clones issus de l'ingénierie à l'ytterbium (EMS Yb) ont été testés de 500 à 800 µM d'Yb et les clones issus de l'ingénierie au lanthane (EMS La) ont été testés de 6,2 à 9,5 mM de lanthane. A l'issu de ces tests les 15 clones les plus résistants de chaque population issue des deux expériences d'ingénierie ont été sélectionnés. Cette sélection a été réalisée en calculant le ratio DO finale/DO initiale, à 500 µM d'Yb et à 7,5 mM de La.

Les 15 clones les plus résistants au lanthane et les 15 clones les plus résistants à l'ytterbium ont ensuite été cultivés en milieu YNB Gp liquide, puis testés sur gélose afin d'affiner leur niveau de tolérance. Les mêmes témoins (Wt, EMS La, EMS Yb et EMS 30) ont également été incubés dans les mêmes conditions (milieu YNB Gp sous agitation). Après une croissance en phase saturante, cinq microlitres des dilutions $10^0$ à $10^{-5}$ ont ensuite été déposées sur géloses YNB Gp sans métal, en présence d'ytterbium (200 à 2000 µM) ou de lanthane (1 à 6 mM). Après 48 h de croissance, un niveau de résistance de +2 à +6 est attribué aux clones, en fonction du nombre de dilutions supplémentaires ayant poussé comparé à la souche Wt. Les résultats de cette expérience ont été analysés et présentés sous forme de heatmaps créées à partir du package pheatmap du logiciel Rstudio. A la vue des résultats obtenus, cinq clones différents phénotypiquement (niveaux de résistance variés) issus de chaque expérience d'ingénierie (EMS La et EMS Yb) ont ensuite été sélectionnés pour les expériences complémentaires.

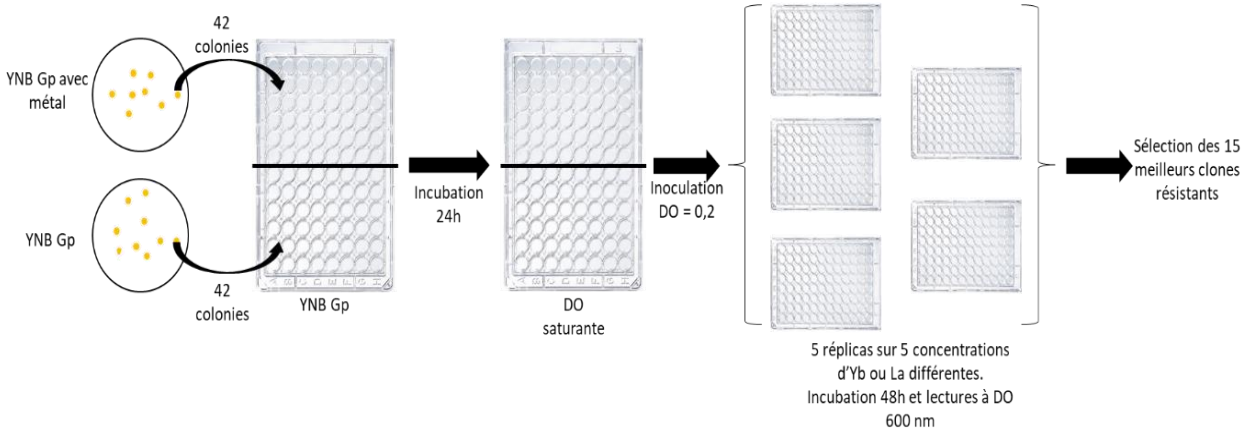



*Figure 8 : Schéma simplifié des étapes d'isolement des colonies sur géloses à la distinction des 15 meilleurs résistants pour les 2 expériences d'ingénierie évolutive.*

## ***Tests de résistance des clones à d'autres stress***

Afin de tester la résistance croisée à d'autres stress métalliques, les 5 clones EMS La et EMS Yb ont été exposés à des concentrations toxiques de différents métaux. Des cultures mères de ces derniers ont été réalisées dans des microplaques 96 puits contenant du milieu YPD jusqu'à saturation. Cinq microlitres des dilutions $10^0$ à $10^{-5}$ de ces microplaques sont ensuite déposées sur géloses YPD contenant les autres TR (excepté le prométhium), du nickel, cobalt, fer, zinc, cadmium, gallium, indium ou aluminium. Les concentrations utilisées de ces différents métaux sont indiquées dans le tableau 1. Un niveau de résistance (+2 à +6) ou de sensibilité (-2 à -6) a été attribué à chaque clone en fonction de la croissance des différentes dilutions, en comparaison avec ceux de la souche sauvage.

*Tableau 2 : Gamme des concentrations des TR et des autres métaux utilisées dans les tests de résistance métallique.*

| Métal | Concentrations (mM) | Métal | Concentrations (mM) |
|---|---|---|---|
| **Sc** | 3,1 – 3,6 | **Er** | 3,6 – 4,65 |
| **Y** | 3,4 – 3,9 | **Tm** | 3,25 – 4,3 |
| **Lu** | 3,15 – 4 | **La** | 4,3 – 6,6 |
| **Ce** | 3,6 – 5,8 | **Yb** | 3,2 – 5 |
| **Pr** | 5 – 7,5 | **Ni** | 0,5 – 5 |
| **Nd** | 3,9 – 4,65 | **Co** | 2,5 – 7 |
| **Sm** | 3,9 – 4,8 | **Fe** | 4 – 15 |
| **Eu** | 3,8 – 4 | **Zn** | 3,5 – 14 |
| **Gd** | 3,8 – 4,1 | **Cd** | 0,1 – 0,2 – 0,3 |
| **Tb** | 3,75 – 4 | **In** | 7,5 – 8,5 |
| **Dy** | 3,6 – 4 | **Al** | 8 – 10 |
| **Ho** | 3,75 – 4,8 | **Ga** | 15,75 – 18 |

Un stress oxydant réalisé avec du peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) a également été réalisé en exposant les clones à des concentrations croissantes de 0,5 à 10 mM dans du milieu YPD solide.

Les résultats de cette expérience sont regroupés sous forme de deux heatmaps créées à partir du package pheatmap du logiciel Rstudio.

## ***Dosage du lanthane et de l'ytterbium par ICP-MS***

Les 10 clones EMS La et EMS Yb ont tout d'abord été cultivés dans 300 mL de YNB Gp. Lorsque les cultures ont atteint la phase exponentielle de croissance (DO = 0,8), les souches ont été exposées pendant une heure à 50 µM de lanthane pour les mutants EMS La et à 6 µM d'ytterbium pour les mutants EMS Yb. Les cultures ont ensuite été récoltées à 4°C (centrifugation d'une min à 4500 rpm). Les culots obtenus ont été lavés trois fois dans 1 mL d'une solution d'EDTA (20 mM MES, 10 mM EDTA, pH 6) et trois fois dans 1 mL d'eau ultra-pure. Après centrifugation à 8000 g pendant 30 s, les culots cellulaires ont été séchés à 60°C pendant 24 h. L'analyse de la teneur en lanthane et en ytterbium par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, X Series II Model, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) a été sous-traitée au laboratoire Chrono-Environnement de l'Université de Franche-Comté (Besançon). La validité de la méthode d'analyse a été vérifiée au moyen d'un matériau de référence standard (feuilles de tabac oriental (basma), INCT-OBTL-5, LGC Promochem, Molsheim, France).

## ***Extraction et dosage des ADNg***

Les ADN génomiques des 10 clones sélectionnés, ainsi que de la souche sauvage, ont été extraits et purifiés à l'aide du kit DNeasy® Plant Mini (Qiagen®) selon les recommandations du

fournisseur. Dix millilitres des cultures saturantes ont été récoltés par centrifugation (5 min à 4500 rpm). La pureté des ADNg a été observée sur gel d'agarose à 1% (v/v) et par spectrophotométrie (ratio A260nm/A280nm). Les ADNg ont également été dosés à l'aide du kit Quant-iT™ PicoGreen® selon les recommandations du fournisseur. La concentration d'ADNg extraits des différents clones a été calculé à l'aide d'une gamme étalon qui a été effectuée en utilisant des standards d'ADN dilués (de 1 µg/mL à 1 ng/mL). Après ajout de PicoGreen®, la fluorescence des échantillons a été mesurée à 520 nm après excitation à 480 nm. Les concentrations ont été calculées comme indiqué ci-dessous :

$$[ADN]_{ng/mL} = ((((A_{520nm}-0,47) /0,44)) * 200) / 1000$$

## ***Séquençage et analyses des ADNg des clones résistants***

Les ADNg extraits ont été séquencés par méthode Illumina par la société Microsynth AG (Balgach, Suisse). Une librairie Illumina TruSeq a été préparée, puis le séquençage de fragments de 75 bp (paired-end) a été effectué par Illumina NextSeq 500 v2. Les données de séquençage ont été organisées et comparées à la souche de référence *S. cerevisiae* BY4741 par VALOT Benoît, ingénieur bio-informaticien à l'UMR 6249 Chrono-Environnement de Besançon. Afin de déterminer la présence ou l'absence de gènes, il a été réalisé un sous-échantillonnage aléatoire des reads issus du séquençage afin d'obtenir une couverture moyenne de 80x, puis un alignement des reads à la souche de référence BY4741 par le logiciel Burros Wheeler Aligner (bwa, algorithme mem). Le comptage des reads couvrant les phases codantes des différents gènes (minium de 20 bp de recouvrement, qualité d'alignement de 20 minimum) a été réalisé avec le script FeatureCounts. La détection de SNP (single nucleotide polymorphism) et d'INDEL (insertion/délétion) a été faite par alignement des reads bruts sur le génome de la souche de référence BY4741 comme précédemment. Les variants (SNP, INDEL) ont pu être obtenus par le logiciel Freebayes (qualités des bases et alignement supérieur à 20, minimum de 10 reads supportant l'allèle variant). Enfin, la phylogénie a été réalisée par la concaténation des variants pour chaque échantillon (alignement multiple de 670 bp) et une analyse phylogénétique bayésienne avec le logiciel MrBayes utilisant un modèle GTR+G. L'analyse a été réalisée avec 2 chaines sur 1000000 de générations avec obtention d'un arbre moyen.

## ***Analyses statistiques des résultats***

Les tests post hoc ANOVA unidirectionnels et Tuckey HSD ont été utilisés lorsque la normalité des données et les conditions d'homoscédasticité ont été respectées. Dans les autres cas, des écarts-types standards par rapport à la moyenne des réplicas ont été réalisés.

# VII. Résultats et discussion

## VII.1. Mutagénèse par traitement à l'EMS

### 1a. Effet de l'EMS sur la viabilité cellulaire

Préalablement à l'expérience d'ingénierie évolutive, la souche sauvage *S. cerevisiae BY4741* a été traitée au méthanesulfonate d'éthyle (EMS) dans le but d'augmenter la variabilité génétique de cette souche. Brièvement, l'EMS est un agent mutagène provoquant des mutations aléatoires et permettant la substitution de paires G:C en paires A:T (Lawrence 1991). Cette étape permettra d'optimiser l'effet de l'ingénierie évolutive par l'obtention d'une population de mutants avec une variabilité génétique, potentiellement capable d'évoluer plus facilement face à un stress métallique engendré par les TR.

Afin d'appliquer un traitement optimal à l'EMS, la souche WT a été exposée à cet agent mutagène pendant trois temps différents (20, 30 et 60 min). Cette étape avait pour but d'obtenir un pourcentage de survie adéquat compris entre 10 et 40%, attestant d'un effet optimal de cet agent comme précédemment décrit dans la littérature (Lawrence 1991; Çakar et al. 2009). Après dénombrement des UFC à la suite des différents traitement testés (Figure 9a), les taux de survie ont été calculés (Figure 9b).

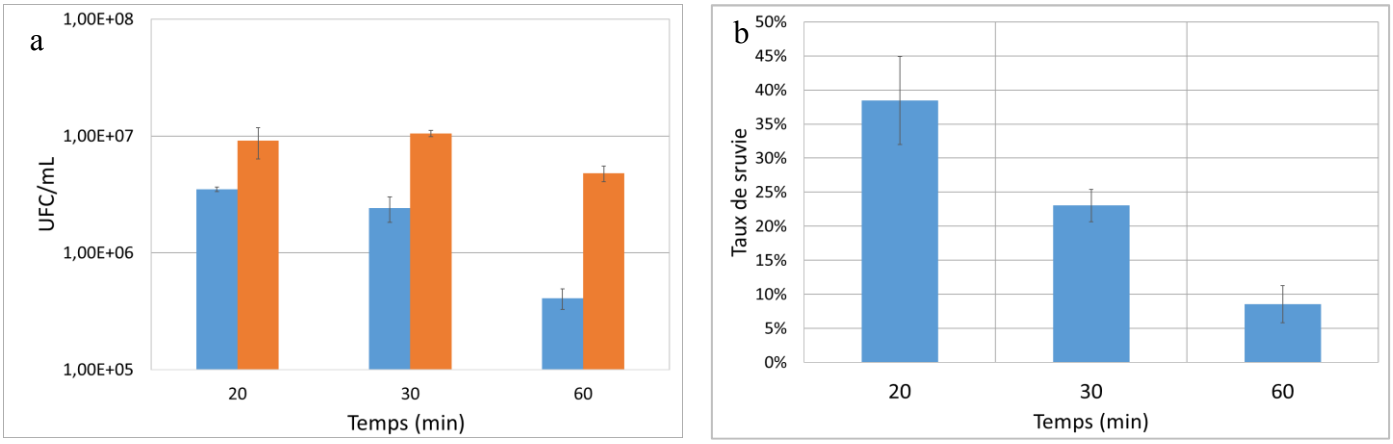



*Figure 9a et b : Croissance de S. cerevisiae sur les 2 traitements (EMS et témoin) (a) et viabilité des cellules après différents temps de traitement à l'EMS (b). En bleu la souche traitée à l'EMS, en orange la souche non traitée (n = 4).*

On observe sur la figure 7a que l'augmentation du temps d'exposition à l'EMS diminue le nombre de cellules viables. En effet, le taux de survie atteint 38% après 20 min de traitement, pour diminuer jusqu'à 9% après 1h. Ces résultats correspondent aux effets attendus de l'exposition à l'EMS, provoquant une diminution de la viabilité cellulaire par des mutations trop nombreuses et/ou touchant des fonctions essentielles au développement cellulaire (Lawrence 1991). La population obtenue après 30 min d'exposition, avec 23% de survie, satisfait les critères de survie précédemment

énoncés. Cette population présente une diversité génétique suffisante et sera ainsi utilisée pour la suite des expériences. Nous la nommerons *S. cerevisiae* Pop EMS 30 dans la suite de la discussion.

### 1b. Comparaison du niveau de résistance des souches (détermination des EC50)

Premièrement, nous souhaitions estimer si la population Pop EMS 30 n'était pas plus résistante, ou sensible, que la souche de départ (non traitée), auquel cas nous ne pourrions pas juger de l'effet réel de l'expérience d'ingénierie évolutive. Ainsi, l'EC50 (concentration efficace médiane), qui correspond à la concentration d'un agent pour laquelle le taux de croissance µ est réduit de 50%, a été calculé pour le lanthane et l'ytterbium (Figures 10a et 10b). Ces tests de tolérance au lanthane et à l'ytterbium ont également permis de déterminer les EC10 (concentration inhibant 90 % de la croissance cellulaire) qui ont été utilisées comme concentrations de départ de l'expérience d'ingénierie évolutive (Çakar et al. 2009; Küçükgöze et al. 2013).

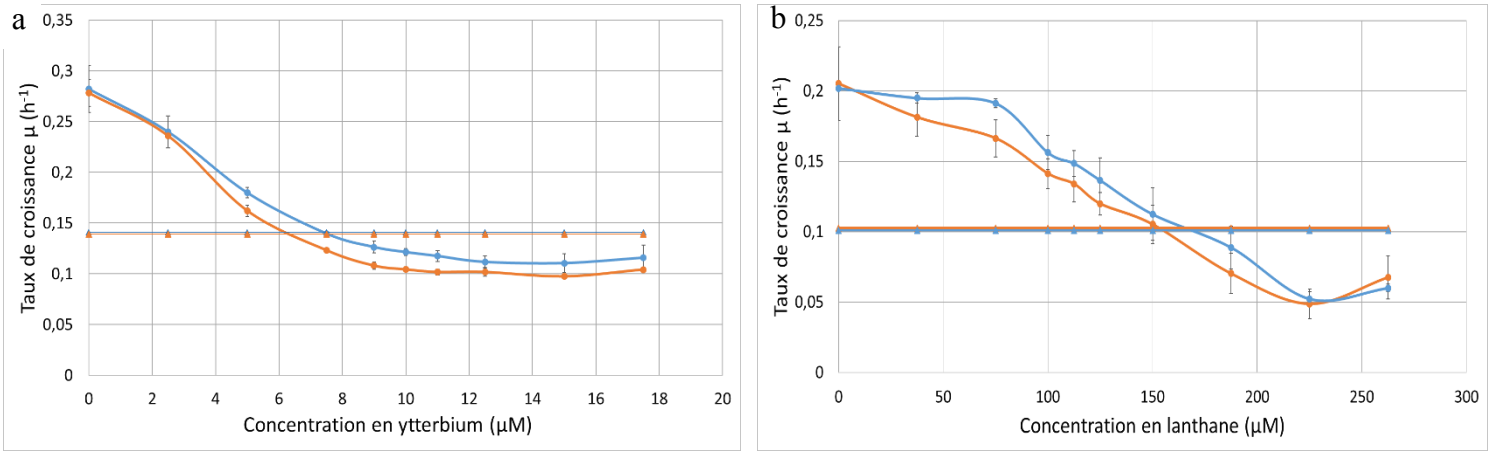



*Figure 10a et b : Détermination des concentrations en ytterbium (a) et lanthane (b) réduisant de 50% le taux de croissance de la population traitée à l'EMS (Pop EMS) et de S. cerevisiae BY4741 (non traitée).*
*En orange, S. cerevisiae BY4741 et en bleu S. cerevisiae Pop EMS. Les marqueurs ronds sont associés aux courbes des taux de croissance µ et les triangles aux droites de détermination des EC50 (n = 3).*

Les courbes des taux de croissance spécifique (µ) des souches testées en fonction de concentrations croissantes de terres rares ont ainsi permis de déterminer les EC50 (50% $\mu_{max}$ témoin) comme correspondant à 6 µM d'ytterbium et 153 µM de lanthane pour la souche sauvage et 7,5 µM d'ytterbium et 168 µM de lanthane pour *S. cerevisiae* Pop EMS (Figure 9 a et b). La faible différence entre les EC50 des deux populations testées, potentiellement due au traitement EMS, est considérée comme négligeable. Ainsi, *S. cerevisiae* Pop EMS 30 a été utilisée comme population initiale dans l'expérience d'ingénierie évolutive.

## VII.2. Ingénieries évolutives

La population Pop EMS a été exposée pendant plusieurs semaines à des concentrations croissantes de lanthane et d'ytterbium afin d'obtenir des mutants résistants aux terres rares utilisées.

Ces expositions à long terme, croissantes et sur des populations en phase stationnaire permettent aux cellules de s'adapter progressivement à la présence de ces métaux par le développement de mécanismes de résistances qui seront étudiés par la suite. Les concentrations initiales utilisées étaient de 25 µM et 1,5 µM de lanthane et d'ytterbium respectivement. Par la suite, les concentrations ont été progressivement augmentées jusqu'à atteindre une inhibition de croissance des cultures ($DO_{600nm}$ < 0,6 après 48 h).

## 2a. Adaptation de la population Pop EMS au lanthane

Après un total de 29 passages successifs dans du milieu supplémenté en lanthane, la population a acquis une résistance accrue et a été capable de croître jusqu'à une concentration de 6,2 mM de lanthane. A partir du 21ème cycle (500 µM), le pas de concentration d'exposition a été augmenté jusqu'à atteindre la concentration finale de 6,2 mM. La figure 10 ci-dessous montre l'évolution de la croissance de cette population aux différentes concentrations par mesure de la $DO_{600nm}$ à chaque cycle.

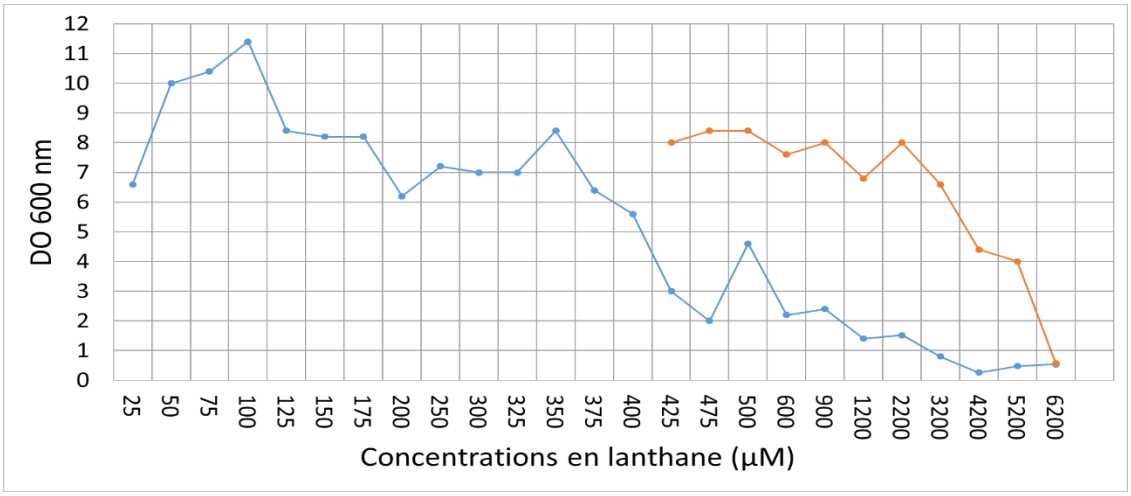



*Figure 11 : Evolution de la croissance de la population traitée à l'EMS (pop EMS) aux différents cycles d'exposition au lanthane.* En bleu, les DO mesurées à 24h et en orange les DO mesurées à 48h.

D'après la figure 11, on remarque que la croissance à 24h diminue progressivement avec les cycles d'exposition jusqu'à atteindre une DO finale de 0,54 à 6,2 mM de lanthane. On observe une tendance similaire pour les DO à 48h, qui diminuent progressivement jusqu'à atteindre une valeur finale de 0,58 à 6,2 mM. De plus, on constate une croissance élevée à 24h jusqu'au 14ème cycle de l'ingénierie (350 µM) puis une diminution de plus en plus importante jusqu'à la fin, suggérant une toxicité plus importante à chaque cycle. La même chose est constatée à 48h jusqu'au 25ème cycle (2,2 mM), avec une forte diminution de 2,2 mM à 6,2 mM. La population obtenue à l'avant dernier cycle, qui continue à se développer à 5,2 mM de lanthane, est la population finale, résistante au La, que nous nommerons dans la suite de cette étude comme la population « Pop La ». Les

concentrations aux 14ème cycle et 25ème cycle semblent être des valeurs limites pour une croissance optimale sur 24h et 48h respectivement.

## 2b. Adaptation de la population Pop EMS à l'ytterbium

L'ingénierie évolutive effectuée avec de l'ytterbium a nécessité un total de 38 passages successifs dans du milieu supplémenté en cette terre rare. De façon similaire au lanthane, le pas de concentration en ytterbium est augmenté lors des 10 derniers cycles de l'ingénierie. Les différentes mesures de DO à 24h et 48h sont présentées dans la figure 12.

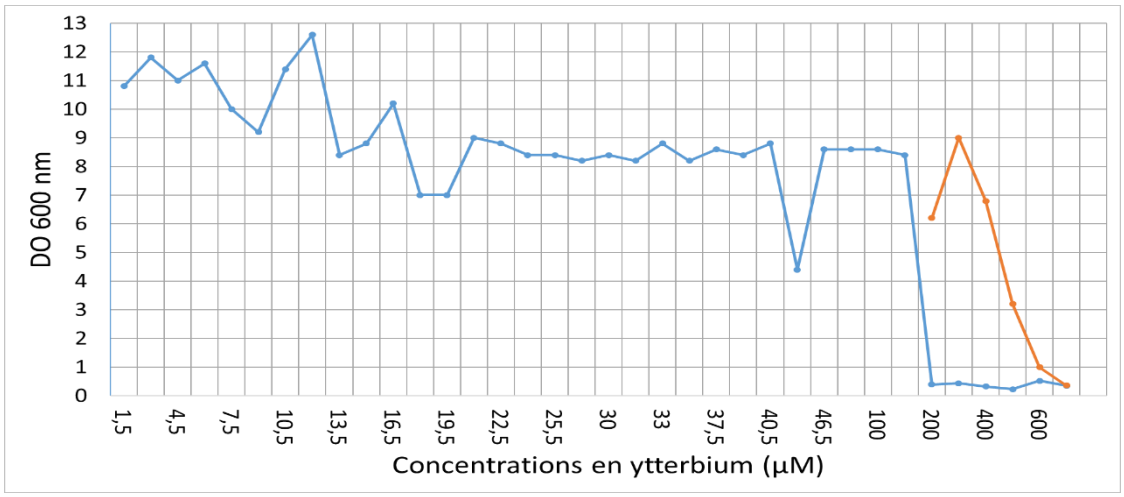



*Figure 12: Evolution de la croissance de la population traitée à l'EMS (Pop EMS) aux différents cycles d'exposition à l'ytterbium. En bleu les DO mesurées à 24h et en orange les DO mesurées à 48h.*

D'après la figure 12, et comme précédemment pour le lanthane, la DO mesurée diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration en ytterbium dans le milieu, jusqu'à atteindre une concentration finale de 700 µM. On observe également une croissance fortement diminuée dans les cycles d'exposition plus tardifs. Ainsi une très forte diminution de la croissance à 24h est observable entre le 32ème et 33ème cycle (150 – 200 µM), et de façon similaire à 48h dès le 34ème cycle (300 µM). La population obtenue à l'avant dernier cycle, qui continue à se développer à 600 µM de d'ytterbium, est la population finale résistante à l'ytterbium, que nous nommerons « Pop Yb » dans la suite de cette étude. Les concentrations de 150 µM et 300 µM semblent être des valeurs limites pour atteindre une croissance optimale après 24h et 48h d'incubation.

## 2c. Stabilité du phénotype de résistance dans les populations Pop La et Pop Yb

Afin de confirmer la stabilité des résistances de ces populations (Pop La et Pop Yb), leurs croissances ont été confirmées sur l'avant dernière concentration utilisée lors de leur expérience d'ingénierie évolutive respective (600 µM d'Yb et 5,2 mM de La), et ceci après 3 passages successifs au préalable dans du milieu de culture YNB Gp sans terre rare. Ces 3 passages avaient

pour but d'observer si les phénotypes de résistance obtenus étaient maintenus après des croissances sans pression de sélection.

Pour les deux expériences d'ingénierie évolutive, on remarque que les populations finales (5,2 mM pour le lanthane et 600 µM pour l'ytterbium) sont capables de croître sur des concentrations plus élevées que la souche sauvage (Annexe 2). Cette observation suggère l'apparition de mécanismes de résistance à ces métaux et le succès de cette stratégie. Ces différences de croissance avec les populations initiales traitées à l'EMS sont similaires à celles reportées pour d'autres expériences d'ingénierie évolutive, tel que pour le nickel et le cobalt, avec une population finale pouvant croître sur des concentrations beaucoup plus élevées avec des taux de survie de 50 (nickel) à 9800 (cobalt) fois plus importants que la souche de référence (Çakar et al. 2009; Adamo et al. 2012; Küçükgöze et al. 2013).

## VII.3. Distinction et isolement des mutants résistants

### 3a. Séparation des mutants

Des dilutions des populations Pop La, Pop Yb et *S. cerevisiae* BY4741 WT ont été étalées sur milieu YNB sans terre rare, avec ytterbium ou avec lanthane dans le but d'obtenir des colonies individuelles afin d'effectuer un premier tri sur l'ensemble des clones résistants. Cette étape permet de sélectionner des mutants potentiellement différents qui composent ces populations et indirectement des mécanismes de résistance sous-jacents différents (Figure 13).

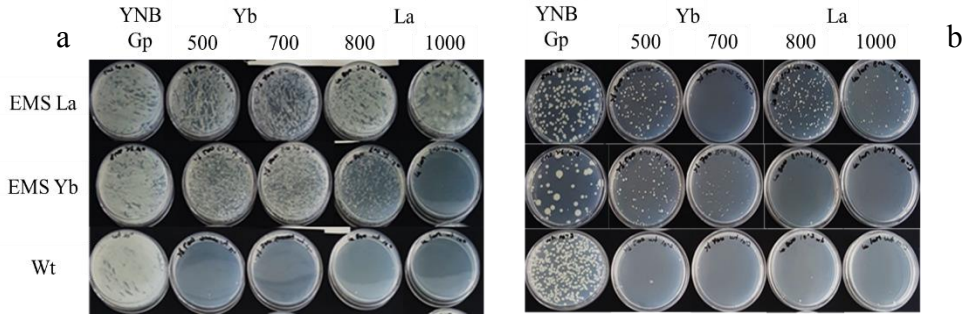



*Figure 13a et b : Croissance sur milieu YNB des souches sauvage (WT) et des populations résistantes au lanthane (Pop La) ou à l'ytterbium (Pop Yb). Des dilutions de $10^0$ (a) et $10^{-3}$ (b) ont été étalées en présence de 500 et 700 µM d'ytterbium, 800 et 1000 µM de lanthane, ou sur milieu sans terre rare. Les photographies ont été prises après 3 jours d'incubation à 28°C.*

D'après la figure 13, on remarque que Pop La est capable de croitre sur 800 et 1000 µM de lanthane, ainsi que sur 500 µM d'ytterbium à une dilution de $10^{-3}$. Malgré tout, la population Pop La pousse sur les concentrations des deux terres rares lorsqu'il n'y a pas de dilution ($10^0$). A la dilution $10^{-3}$, la Pop Yb est capable de pousser à des concentrations de 500 µM et 700 µM d'ytterbium, mais pas sur lanthane, excepté lorsqu'il n'y a pas de dilution de la population (à 800 µM). Quant à la souche sauvage, celle-ci ne pousse pas aux concentrations de lanthane et d'ytterbium testées quelle que soit la dilution. Ces tests phénotypiques sur boites confirment donc dans un premier temps le caractère résistant des populations issues de l'expérience d'ingénierie

évolutive. De plus, il est intéressant de constater un phénomène de résistances croisées pour Pop La et Pop Yb sur les 2 TR, suggérant l'existence de mécanismes de résistances potentiellement communs, mais également spécifiques puisque les résistances ne sont pas équivalentes.

A partir de ces tests, des colonies (84 pour Pop La et Pop Yb) ont été prélevées aléatoirement sur milieu avec et sans lanthane pour Pop La (42 de chaque), et avec et sans ytterbium pour Pop Yb (42 de chaque). Ces mutants ont ensuite été répartis sur 2 microplaques distinctes.

### 3b. Distinction des mutants isolés

Le deuxième tri a été effectué en testant la résistance de ces mutants (isolés sur 7,5 mM de lanthane pour les mutants issus de Pop La et sur 500 µM d'ytterbium pour les mutants issus de Pop Yb) afin de sélectionner les mutants les plus résistants à chacune des deux terres rares. Un ratio de croissance entre la DO finale après 24 h de croissance et la DO initiale à t0 a ainsi été calculé à partir des résultats de croissance de chaque souche (Figure 14).

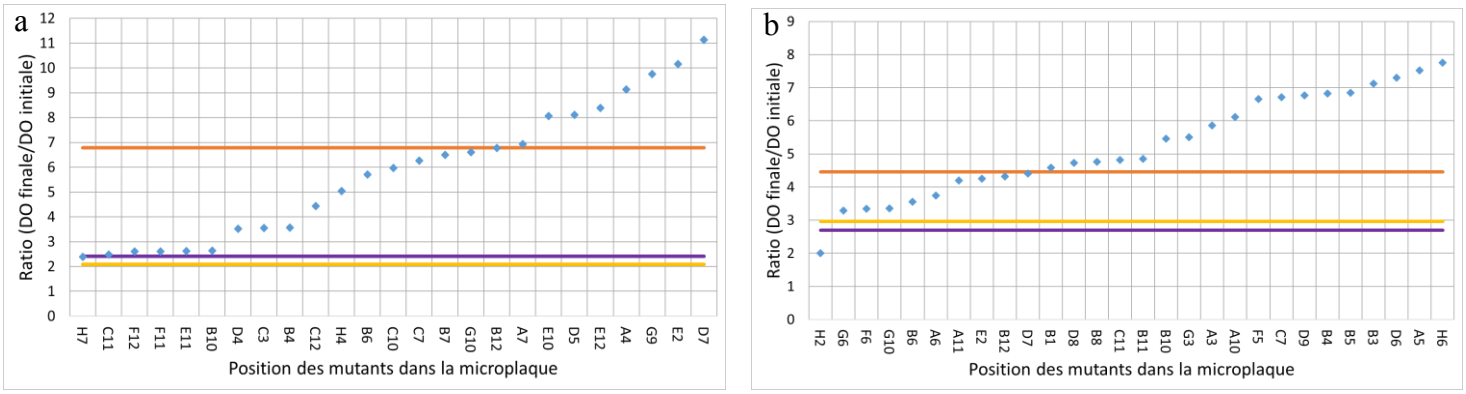



*Figure 154a et b: Croissance des clones isolés sur boites et testés en présence de 7,5 mM de lanthane pendant 24h pour les clones Pop La (a) et 500 µM d'ytterbium pendant 48h pour les mutants EMS Yb (b). Le suivi de croissance s'effectue à DO 600 nm. Certains mutants compris entre H7 et C11 (a) et H2 et G6 (b) ont été enlevés pour gagner de l'espace au vu de leurs ratios identiques (2 pour a. et 3 pour b).*
Orange : ratio Pop La (a) et Pop Yb (b) ; Jaune : ratio population Pop EMS 30 ; Violet : ratio souche sauvage BY4741 et Bleu : ratios mutants isolés

D'après ces 2 graphiques, on remarque dans les 2 cas que les populations finales ont un ratio de croissance supérieur (Pop La : ratio = 7 ; Pop Yb : ratio = 4,5) à la population de départ (EMS 30) et à la souche sauvage (a. : ratio = 2 ; b. : ratio = 3), confirmant à nouveau la résistance de ces populations finales. Lorsque l'on s'intéresse aux mutants isolés, 3 catégories sont observables. Premièrement, nombre d'entre eux sont aussi résistants que la souche sauvage (a. : ratios = 2 ; b. : ratios = 3). Deuxièmement, certains mutants ont une résistance faible, supérieure à la souche sauvage, mais inférieure à la population finale (a. : ratios entre 2 et 7 ; b. : ratios entre 3 et 4,5). Enfin, une faible proportion de ces mutants a un ratio de croissance supérieur à la population finale (ratios supérieurs à 7 (a) et 4,5 (b)), ceux-ci correspondent ainsi aux mutants les plus résistants parmi les colonies isolées.

Pour conclure, les populations finales issues des expériences d'ingénierie (Pop La et Pop Yb) constitueraient un ensemble de mutants avec des résistances très variables, dont certains d'entre eux

ne semblent, *a priori*, pas avoir développé de mécanisme de résistance. On peut également supposer que ces mécanismes de résistance sont non visibles à ces concentrations puisque leur croissance est fortement inhibée, à hauteur des témoins. La présence de ces derniers dans les populations finales peut s'expliquer par le développement des meilleurs mutants résistants qui les « protègeraient » d'une exposition directe au métal. Des cellules formeraient une barrière de par leur sédimentation et/ou par les relargages de composés cellulaires, tel que des acides aminés pendant leur lyse. Ces parois, membranes et autres composés cellulaires pourraient chélater une partie des métaux et fournir des nutriments nécessaires au développement des plus sensibles (Machado et al. 2008; Hosiner et al. 2014). Autres hypothèses, les meilleurs résistants pourraient diminuer la concentration en terre rare du milieu de culture par une forte bioaccumulation, mécanisme retrouvé pour le nickel chez un résistant après ingénierie évolutive au même métal, ou une forte adsorption et/ou absorption des TR aux surfaces et compartiments cellulaires issues d'une croissance plus rapide, permettant le développement des plus sensibles lorsque la concentration n'est plus critique (Küçükgöze et al. 2013; Ene et al. 2015; Pagano 2016). Ces mêmes résultats ont également pu être observés avec les expériences d'ingénierie évolutive au cobalt, nickel et bore où l'hétérogénéité des populations finales était démontrée par la présence de clones peu résistants à très résistants (Çakar et al. 2009; Şen et al. 2011; Küçükgöze et al. 2013).

A l'issu de cette expérience, les 15 mutants les plus résistants de chaque expérience ont été sélectionnés pour des tests phénotypiques permettant de mieux les distinguer. L'observation de leur résistance de façon semi-quantitative avait pour objectif de sélectionner un pool restreint de mutants qui seront étudiés plus finement par la suite.

## 3c. Distinction phénotypique des clones résistants

Les 30 clones sélectionnés via l'étape précédente ont été nommés en fonction de leur position dans la microplaque (mutants La pour ingénierie au lanthane et Yb pour ingénierie à l'ytterbium) :

*Tableau 3 : Mutants les plus résistants au lanthane ou à l'ytterbium*

| Mutants résistants au lanthane | | Mutants résistants à l'ytterbium | |
|---|---|---|---|
| La D5 | La A7 | Yb H6 | Yb F5 |
| La E2 | La B12 | Yb B3 | Yb A10 |
| La D7 | La B6 | Yb D6 | Yb A3 |
| La G9 | La E12 | Yb A5 | Yb G3 |
| La B7 | La H4 | Yb B5 | Yb B10 |
| La E10 | La G10 | Yb B4 | Yb B11 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| La C7 | La C12 | Yb D9 | Yb C11 |
| La C10 | | Yb C7 | |

Afin de mieux les différencier, 5 µL des dilutions allant de $10^0$ à $10^{-5}$ sont déposés à la fois sur milieu YNB Gp lanthane et sur YNB Gp ytterbium. Ces tests croisés permettent de distinguer les mutants en fonction de leur niveau de résistance aux 2 métaux, déterminé par comparaison avec la croissance de la souche wt. Les niveaux de résistances peuvent ainsi aller de +2 à +6 suivant le nombre de dilutions ayant poussé en présence de TR (les spots +1 ne sont pas pris en compte) (Figure 15, annexe 3).

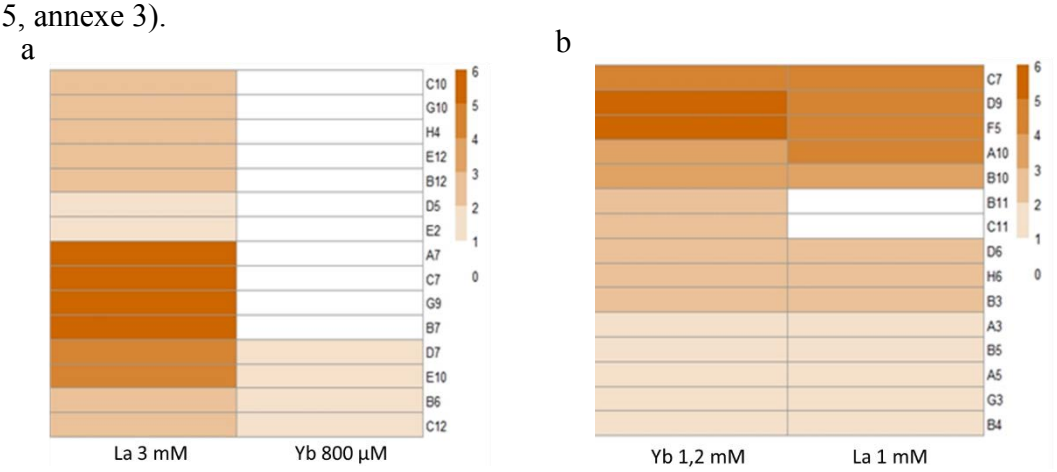



*Figure 15a et b: Heatmaps des mutants résistants au lanthane (a) et à l'ytterbium (b) à 2 jours de croissance. Les concentrations indiquées sont les plus pertinentes pour distinguer les résistants d'une expérience d'ingénierie entre eux. 2 à 6 = niveau de résistance. Plus le mutant est proche de 6, plus le mutant est résistant.*

D'après la heatmap des mutants résistants au lanthane (a), on remarque que les mutants n'ont pas le même niveau de résistance au lanthane, et de la même manière à l'ytterbium. On peut alors les catégoriser comme suivant pour les mutants très résistants au lanthane (+6) et non résistants à l'ytterbium : G9, B7, C7, A7 ; les mutants très résistants au lanthane (+5) et faiblement à l'ytterbium (+2) : D7, E10 ; résistants au lanthane (+3) et à l'ytterbium (+2) avec B6 et C12 ; moyennement résistants au lanthane (+3) avec E12, B12, H4, G10, C10 et peu résistants au lanthane (+2) avec D5 et E2. Les clones appartenant à ces deux dernières catégories ne sont pas résistants à l'ytterbium.

De la même manière, la même classification peut être faite avec les mutants issus de la population Pop Yb (b) ; les mutants très résistants à l'ytterbium (+4/5/6) et au lanthane (+4/5/6) avec D9, F5, C7, A10, B1, moyennement résistant à l'ytterbium (+2/3) et au lanthane (+2/3) avec H6, B3, D6, G3, B4, A5, B5, A3 et moyennement résistant à l'ytterbium (+3) et non résistant au lanthane avec B11 et C11

Ces tests phénotypiques ont permis de montrer que les différents mutants isolés n'ont pas des résistances identiques sur les 2 métaux ni entre les 2 expériences d'ingénierie. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de résistance pourraient être différents entre ces catégories. Ils peuvent tout de même être identiques mais avec une intensité variable (par exemple s'il s'agit d'une

ou plusieurs duplications). De plus, ils sont probablement différents pour les mutants issus des expériences d'ingénieries au lanthane et à l'ytterbium. Ces tests confirment plus précisément la résistance croisée déjà observée auparavant pour des mutants des populations EMS exposée aux deux TR (Figure 12). Chaque catégorie phénotypique est ainsi considérée comme différente et les clones d'une même catégorie comme possédant probablement des mécanismes d'adaptation aux terres rares identiques.

Dans l'optique d'avoir une vue plus fine sur les différents mécanismes de résistance qui sont apparus à l'issue des expériences d'ingénierie, un mutant de chaque catégorie identifiée a été sélectionné pour les expériences complémentaires (Tableau 6).

*Tableau 4 : Mutants sélectionnés suite à la catégorisation des 30 mutants résistants.*

| Ingénierie au lanthane | Ingénierie à l'ytterbium |
|---|---|
| La G9 | Yb B10 |
| La D7 | Yb C7 |
| La E12 | Yb C11 |
| La E2 | Yb D9 |
| La B6 | Yb G3 |

## VII.4. EC50 des mutants résistants

### 4a. Mutants résistants issus de l'ingénierie au lanthane

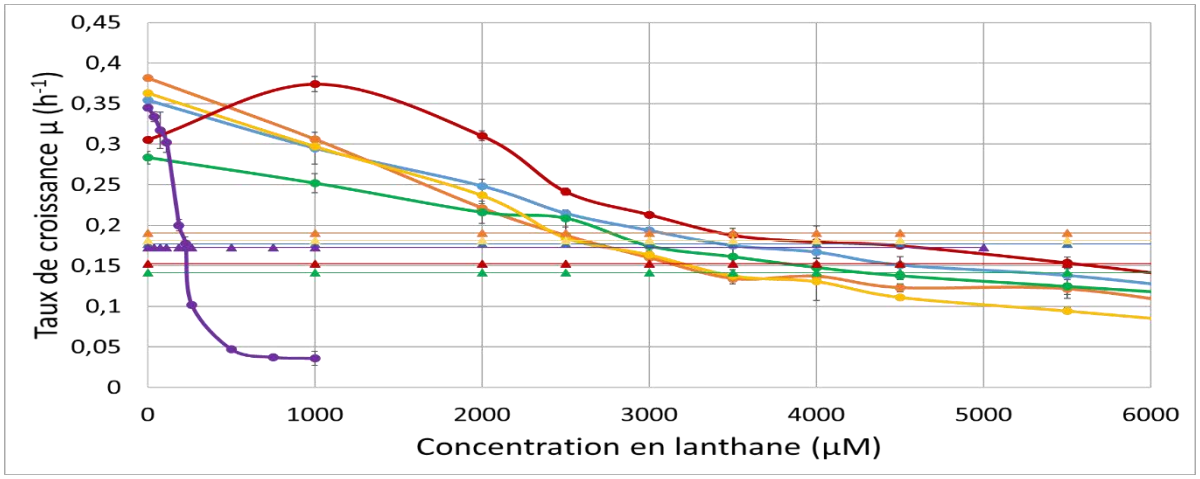



*Figure 176 : Détermination de l'EC50 des mutants résistants au lanthane. Les cercles représentent les taux de croissance µ et les triangles les EC50.*
*Jaune : La E2 ; Vert : La D7 ; Bleu : La G9 ; Rouge : La E12 ; Orange : La B6 ; Violet : Wt*

Les EC50 présents sur la figure 16 sont les suivants avec 5,50 mM pour E12, 4,30 mM pour D7, 3,50 mM pour G9, 2,5 mM pour E2 et 2,45 mM pour B6.

Pour rappel, l'EC50 de la souche sauvage est de 153 µM de lanthane. On peut alors établir des « ratio » de résistance entre cette souche et les mutants résistants.

Ainsi, la souche E12 est 36 fois plus résistante que la souche sauvage, D7 28 fois, G9 23 fois et E2 et B6 16 fois plus résistantes. Comparé aux tests sur boites réalisés précédemment, on aurait pu s'attendre à un ordre similaire des résistants mais ce n'est pas le cas. Par exemple, E12 qui est ici le plus résistant des 5 mutants n'était noté que +3, B6 également. G9 était le clone le plus résistant (+6), et n'est retrouvé ici qu'en 3ème position. Evidemment, les conditions des 2 expériences sont différentes, avec d'un côté l'étude sur milieu solide et de l'autre en milieu liquide. La phase de croissance des cellules n'est pas non plus la même, entre les tests sur boites réalisés sur des cultures en phase stationnaire et les EC50 sur des cultures liquides en phase exponentielle. Il est donc intéressant de constater l'importance des conditions de départ sur le phénotype de résistance. Quoiqu'il en soit, dans les deux cas, les EC50 confirment que les clones sélectionnés sont très résistants au lanthane, en comparaison à la souche sauvage.

## 4b. Mutants résistants issus de l'ingénierie à l'ytterbium

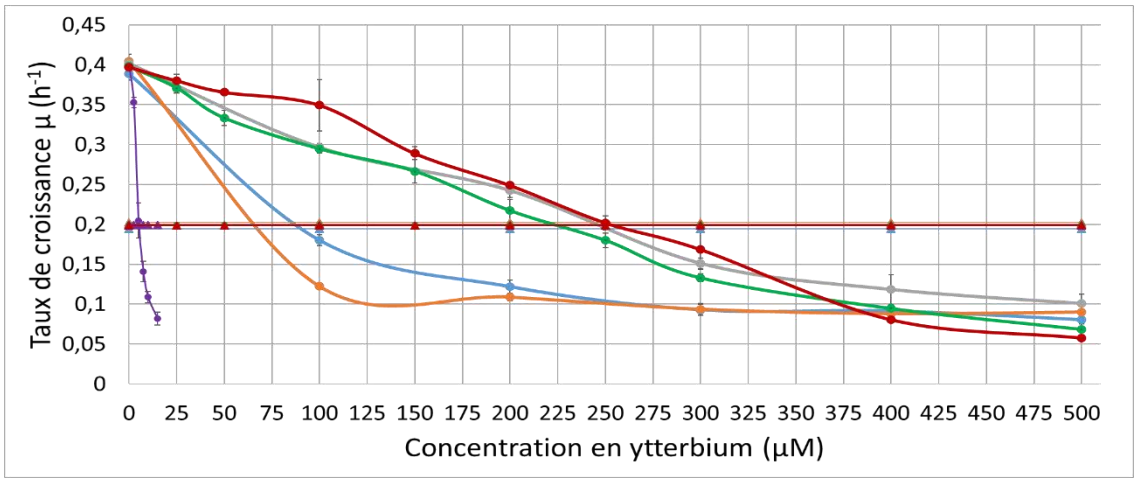



*Figure 17 : Détermination de l'EC50 des mutants résistants à l'ytterbium. Les cercles représentent les taux de croissance µ, les triangles les EC50*
*Bleu : Yb C11 ; Gris : Yb B10 ; Vert : Yb C7 ; Orange : Yb G3 ; Rouge : Yb D9 ; Violet : Wt*

De manière similaire aux données issues des analyses des mutants résistants au lanthane, on remarque différents niveaux de résistance après détermination des EC50 avec 250 µM pour D9, 245 µM pour B10, 223 µM pour C7, 90 µM pour C11 et 64 µM pour G3.

En comparaison avec la souche sauvage (EC50 = 6 µM), les mutants D9 et B10 sont 40 fois plus résistants à l'ytterbium par rapport à la souche sauvage et C7 est proche avec un ratio de résistance de 37. Quant à C11 et G3, ils ont des ratios beaucoup plus faibles avec des valeurs de 15 et 10 respectivement. En comparaison avec les tests phénotypiques sur boites, l'ordre des niveaux de résistance est cette fois bien respecté, avec Yb D9, B10 et C7 dans la 1ère catégorie et Yb C11 et G3 dans les dernières.

Donc les mutants isolés ont bien des niveaux de résistance différents, confirmés par la disparité des EC50 observés. En conclusion, les mutants résistants au lanthane sont de 16 à 36 fois plus

résistants que la souche sauvage, et les mutants résistants à l'ytterbium le sont de 10 à 40 fois, impliquant donc dans les deux cas un ensemble de mécanismes de résistance tout autant variés qu'il reste à identifier.

## VII.5. Dosage du lanthane et de l'ytterbium dans les cellules

Afin d'apporter les premières données permettant de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de résistance aux deux métaux, le contenu des cellules en lanthane et en ytterbium ont été dosés chez les cinq mutants sélectionnés des deux expériences d'ingénierie évolutive (Figure 18). En effet, un mécanisme de bioaccumulation ou de diminution de la quantité en métal intracellulaire pourrait faire partie des mécanismes de résistance à ces terres rares.

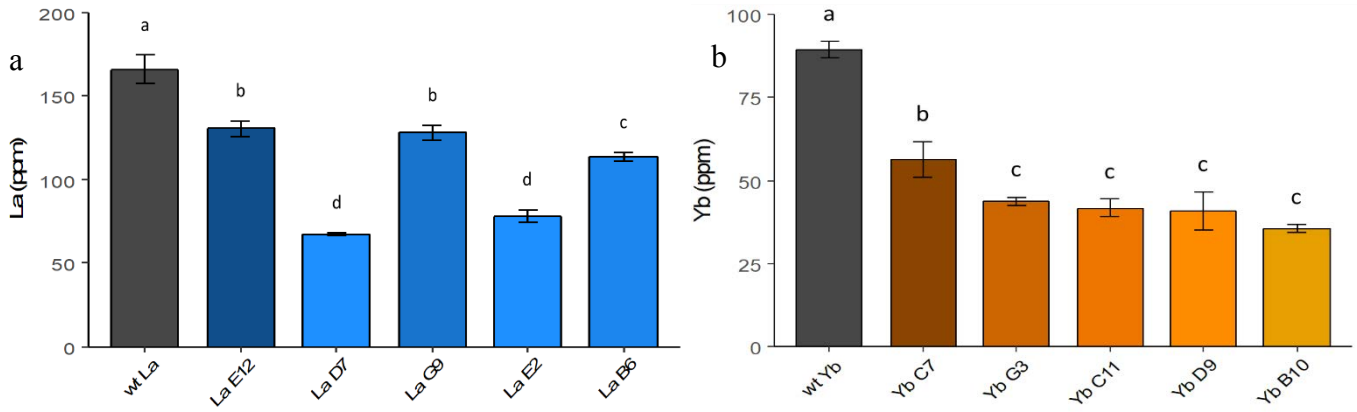



*Figure 18a et b : Contenu en lanthane (a) et en ytterbium (b), déterminé par ICP-MS, des mutants résistants et wt exposés pendant une heure à 50 µM de lanthane ou 6 µM d'ytterbium. Après exposition au métal, les cellules ont été rincées 3 fois dans une solution d'EDTA , puis 3 fois dans de l'eau.. Les tests statistiques sont des tests ANOVA (p-value < 0,05). Une lettre différente (a à d) indique une différence significative.*

Pour le dosage du lanthane, on remarque que la quantité de lanthane intracellulaire est significativement plus faible pour tous les résistants comparés à la souche sauvage (< 160 ppm). Trois groupes apparaissent ici avec E12 et G9 (130 ppm), E2 et D7 (70 ppm) et B6 avec 120 ppm. Plus précisément, E12 et G9 accumuleraient 19% de lanthane en moins, B6 25% et E2 et D7 56% par rapport au sauvage.

Pour le dosage du contenu en ytterbium, les mutants contiennent également significativement moins de cet élément par rapport à la souche sauvage (< 90 ppm). Nous pouvons observer 2 groupes significativement différents avec d'un côté le clone C7 (55 ppm Yb) et les quatre autres clones G3, C11, D9 et B10 accumulant environ 40 ppm. En détail, C7 accumulerait 40% d'ytterbium en moins que le sauvage, alors que les autres présentent une baisse d'accumulation de l'ordre de 55%.

La moindre accumulation de ces deux éléments par les cellules pourrait être un des mécanismes de résistance à ces métaux, retrouvé dans la littérature pour de nombreux stress métalliques (Fe, Mn, Zn, As...) (Wysocki et Tamás 2010). Moins de lanthane ou d'ytterbium dans les cellules impliquerait moins de stress métallique généré et donc un fitness amélioré de ces mutants résistants par rapport à la souche sauvage. Dans le cas du lanthane, une moindre accumulation de ce métal suggère moins de compétition avec le calcium intracellulaire pour différents acteurs cellulaires qui

sont calcium-dépendants. Ce résultat peut-être lié à des problèmes d'influx du calcium dans la cellule par des transporteurs calciques non fonctionnels empruntés également par le lanthane comme Cch1 (Ene et al. 2015).

## VII.6. Résistances croisées

Les différents mutants ont également été testés pour leur niveau de résistance à d'autres terres rares et à d'autres métaux, afin de déterminer si les mécanismes de résistance au lanthane et à l'ytterbium permettent également une résistance, ou une sensibilité, à d'autres stress métalliques.

### 6a. Résistance à d'autres terres rares

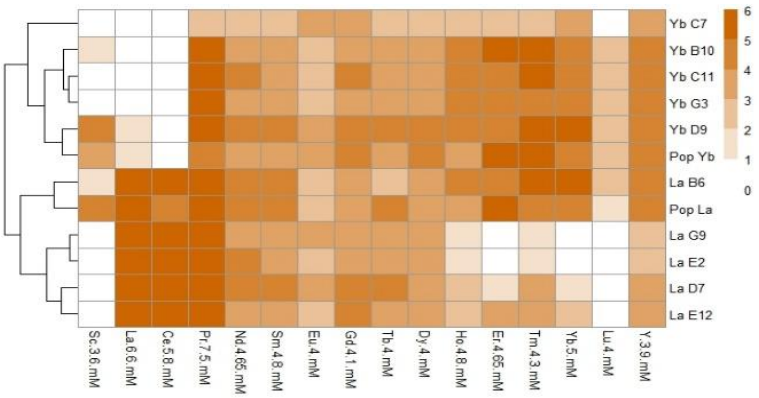



*Figure 19 : Niveau de résistance des mutants à différentes TR après 7 jours de croissance. De gauche à droite, Sc puis TR légères (La à Gd) à lourdes (Tb à Y). Plus la couleur est foncée, plus le mutant est résistant. L'arbre sur la gauche représente des groupes formés à partir des niveaux de résistance.*

D'après les résultats de la figure 19, nous pouvons remarquer 2 groupes principaux de résistance avec une séparation entre les mutants La et Yb. Les mutants Yb sont en effet généralement plus résistants aux terres rares lourdes (Er, Tm, Yb, Lu, Y) et présentent des niveaux de résistance plus faibles aux autres terres rares excepté les plus légères (La et Ce). Les mutants La sont quant à eux les plus résistants aux terres rares légères (La, Ce, Pr) et ont aussi un niveau plus faible de résistance aux autres TR et principalement avec les TR les plus lourdes (Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Y), excepté B6 qui est résistant aux 2 catégories de TR.

Ainsi les mécanismes de résistances acquis via ingénierie évolutive pour lutter contre un stress au lanthane et à l'ytterbium permettraient également une croissance en présence d'autres TR. Il est intéressant de souligner un certain optimum de résistance pour les TR de la même catégorie, proches chimiquement. L'exception ici est le praésodyme (Pr), où les concentrations testées dans notre étude n'étaient peut-être pas assez importantes pour différencier au mieux le niveau de résistance des mutants.

Dans la littérature, l'apparition de résistances croisées suite à un premier stress exercé chez *S. cerevisiae*, et sur d'autres organismes, est connu et dépendraient du type de stress exercé

initialement (Święciło, 2016). Ces recherches expliqueraient d'une part les résistances similaires des mutants issus d'une même expérience d'ingénierie et également la réponse phénotypique des résistants au lanthane pour les terres rares légères et les résistants à l'ytterbium pour les terres rares lourdes.

## 6b. Impact d'autres stress sur les mécanismes de résistances

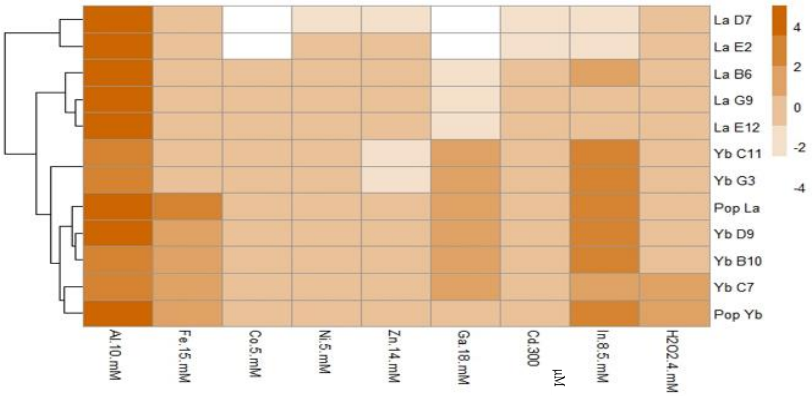



*Figure 20 : Niveaux de résistance des mutants à d'autres métaux et à un stress oxydant ($H_2O_2$) après 7 jours de croissance. Plus la couleur est foncée, plus le mutant est résistant. L'arbre sur la gauche représente des groupes formés à partir des niveaux de résistance. Les métaux sont classés par ordre du numéro atomique.*

D'après la figure 20, on remarque qu'il y a peu de mutants La et Yb résistants aux autres métaux, excepté pour l'aluminium, le fer, le gallium et l'indium. Des mutants sensibles sont également mis en évidence vis-à-vis de métaux tels que le cobalt, le nickel, le zinc, le gallium, le cadmium et l'indium. Parmi eux, les mutants La D7 et E2 sont sensibles à beaucoup de ces métaux. En ce qui concerne le stress oxydant, seulement une faible résistance de Yb C7 est notable parmi tous les mutants étudiés. Les mutants Yb sont ceux présentant le plus de résistances croisées avec d'autres métaux. Les mécanismes de résistance aux terres rares lourdes sembleraient jouer un rôle important pour la résistance à ces autres métaux.

Le criblage d'une banque de mutants de *S. cerevisiae*, mutés pour un seul gène, est une approche qui a permis la compréhension de mécanismes impliqués dans la tolérance et la toxicité de nombreux métaux. Le criblage d'une banque de mutants sous stress aluminium, a permis à Tun et al. (2014) de démontrer l'implication de gènes codant des fonctions liées au transport de l'aluminium et à l'endocytose de protéines/membranes en réponse à la toxicité de cet élément. Sous stress ferrique, avec une stratégie similaire, Jo et al. (2008) ont montré que la délétion de gènes codant des protéines impliquées dans l'import intracellulaire de ce métal (ex : *aft1*) entrainaient un phénotype de résistance. En dehors des stratégies de criblage de banques de mutants, la surexpression de gènes, tel que *alr1* et *alr2*, codant des transporteurs membranaires de magnésium, conférait un phénotype résistant en présence d'Al et de Ga (MacDiarmid et Gardner 1998). Ainsi, la perte ou la sous-expression de gènes fonctionnels liés aux fonctions décrites ci-dessus (par mutations non-sens, délétions…), ou leur surexpression pourrait expliquer en partie la résistance exacerbée en présence de concentrations toxiques d'Al, de Fe ou de Ga.

A l'inverse, certains gènes sont essentiels pour permettre aux cellules de résister à certains métaux. Ainsi, la délétion de gènes codant des fonctions liées au trafic intracellulaire (via les vésicules essentiellement), à la réponse aux stress et à l'expression génique (transcription, synthèse des ARN…) aboutissent à la sensibilité de la souche mutée suite à une exposition au Cd (Serero et al. 2008 ; Thorsen et al. 2009). De la même manière pour le Co, la délétion de gènes codant pour des fonctions de biosynthèse d'histidine, d'ubiquitination, de fonctions mitochondriales ou de trafic membranaire conduisent à la sensibilité de ces mutants (Ryuko et al. 2012). Ces données montrent également que l'implication d'un seul gène, délété ou surexprimé, peut suffire à induire un phénotype sensible ou résistant.

## VII.7. Analyses génomiques des mutants

### 7a. Extraction et dosage des ADNg

Les ADNg des différents mutants sélectionnés auparavant ont été extraits grâce à un kit d'extraction Qiagen®. Les ratios de pureté des ADNg obtenus par spectrophotométrie sont tous compris dans une gamme allant de 1,75 à 1,95. Une migration sur un gel d'électrophorèse a écarté la présence de contaminants (ARN) dans les échantillons (Annexe 4). Le dosage par Picrogreen® a permis d'obtenir les quantités suivantes d'ADNg pour 100 µL final, à l'aide de la droite étalon (Annexe 6) :

*Tableau 5: Quantité d'ADN obtenues suite aux extractions*

| Mutants | Quantité ADN (ng/µL) |
|---|---|
| La E2 | 13 |
| La D7 | 18 |
| La E12 | 19 |
| La G9 | 16 |
| La B6 | 21 |
| Yb C11 | 12 |
| Yb B10 | 10 |
| Yb D9 | 25 |
| Yb C7 | 12 |
| Yb G3 | 14 |
| Wt | 12 |

L'utilisation de ce kit doit normalement amener à l'obtention de 3 µg à 30 µg d'ADNg par échantillon. Nous avons obtenu des concentrations de l'ordre de 1 µg à 2,5 µg d'ADNg par échantillon, représentant la limite inférieure d'extraction par ce kit (Qiagen.com). Ces faibles quantités d'ADNg extraits peuvent s'expliquer par une quantité de cellules insuffisantes ou également une étape mal réalisée telle que le traitement à la RNAse qui génère une perte d'ADN lors de cette phase de purification sur colonne. Toutefois, ces quantités étaient suffisantes pour le séquençage de ces souches, avec une recommandation de 10 ng/µL pour un total de 0,5 µg d'ADNg.

## 7b. Séquençage du génome des clones résistants

L'analyse du séquençage génomique, réalisé par la société Microsynth, a été effectuée par Benoît VALOT, ingénieur bio-informaticien. Premièrement, les reads obtenus ont été alignés sur le génome de la souche de référence *S. cerevisiae* BY4741. Par la suite, nous avons utilisé la souche WT BY4741 que nous avons également reséquencé afin de l'utiliser comme référence pour l'analyse des mutants étudiés. Cette analyse a permis de mettre en évidence s'il y avait absence de certains gènes, la détection de SNP (single nucleotide polymorphism) et de déterminer la phylogénie des différents mutants. Ainsi, le pourcentage de recouvrement des phases codantes (ORF) atteint une moyenne de 60% des reads totaux pour chaque souche. Cela correspond à une moyenne de 8 000 000 de reads recouvrant des ORF sur un total de 13 198 000 reads. En moyenne 3 000 000 de reads (23 %) ont été alignés sur des zones inter-géniques, le restant (17 %) n'ayant pu être aligné sur le génome de référence. Seul un problème de séquençage est intervenu pour le clone La B6. De ce fait, ce mutant n'a pu être comparé aux autres mutants pour ces analyses génomiques.

*Tableau 6 : Nombre de mutations détectées par chromosome en fonction des mutants par rapport à la souche WT S. cerevisiae BY4741 à nouveau séquencée. Une même couleur représente 2 clones identiques ou peu divergents.*

| Chromosome | La E2 | La D7 | La E12 | La G9 | Yb C11 | Yb G3 | Yb B10 | Yb D9 | Yb C7 | Total général par chromosome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 11 |
| II | 5 | 5 | 5 | 5 | 16 | 16 | 3 | 3 | 3 | 61 |
| III | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 |
| IV | 5 | 5 | 25 | 27 | 19 | 19 | 6 | 6 | 6 | 118 |
| V | 3 | 3 | 4 | 5 | 7 | 7 | 5 | 5 | 5 | 44 |
| VI | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 5 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| VII | 3 | 4 | 19 | 19 | 10 | 10 | 3 | 3 | 4 | 75 |
| VIII | 1 | 1 | 5 | 5 | 3 | 3 | 6 | 6 | 6 | 36 |
| IX | 4 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 27 |
| X | 2 | 2 | 4 | 4 | 7 | 7 | 3 | 3 | 3 | 35 |
| XI | 4 | 4 | 8 | 8 | 10 | 10 | 4 | 4 | 4 | 56 |
| XII | 3 | 3 | 6 | 6 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 63 |
| XIII | 8 | 7 | 22 | 22 | 12 | 12 | 3 | 3 | 3 | 92 |
| XIV | 3 | 3 | 4 | 4 | 2 | 2 | 5 | 5 | 5 | 33 |
| XV | 6 | 6 | 5 | 5 | 9 | 9 | 5 | 5 | 5 | 55 |
| XVI | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 12 | 12 | 13 | 57 |
| Total général par souche | 55 | 53 | 116 | 119 | 119 | 119 | 70 | 70 | 72 | 793 |

Le tableau 7 indique le nombre de mutations présentes dans chaque mutant par rapport à la souche sauvage que nous avons reséquencée. On remarque dans un premier temps des clones identiques ou très peu divergents. Cette première observation montre que les étapes de sélections et distinctions des résistants sur les précédents tests n'ont pas permis d'obtenir efficacement que des mutants différents (Figures 13, 14, 16, 17). Cependant des clones très différents ont été isolés pour chacune des deux expériences d'ingénierie évolutive. On distingue alors 4 groupes de mutants : E2/D7 et E12/G9 pour les mutants issus de l'ingénierie au lanthane, C11/G3 et B10/D9/C7 pour l'ingénierie à l'ytterbium, soit 4 mécanismes de résistance potentiellement différents. La proximité phylogénétique de ces mutants est reportée dans l'arbre phylogénétique en annexe 7. Les clones qui sont clustérisés ensemble (2 à 4 mutations de différence, par exemple La E2 possède 55 mutations et La D7 53) sont phylogénétiquement très proches et cette faible divergence des clones peut

s'expliquer par le fait qu'un clone a divergé en deux variants lors des nombreuses générations réalisées lors de l'expérience d'ingénierie évolutive. En effet les autres mutations communes révélées au sein des deux clones sont trop nombreuses (environ 50 à 90 selon les clones) pour supposer qu'ils auraient acquis autant de mutations communes alors que les autres clones analysés ne possèdent quasiment aucune de ces 50 mutations. Certains chromosomes semblent contenir plus de mutations que d'autres. C'est le cas des chromosomes IV, VII et XIII, avec respectivement un total de 118, 75 et 92 mutations. A l'inverse, d'autres chromosomes (III et I) ne contiennent que peu de mutations (9 et 11 mutations respectivement). Afin d'expliquer ces disparités, les taux de mutations de chaque souche pour chaque chromosome ont été calculés. Ces taux de mutation ont été normalisés par rapport (i) au nombre d'ORF par chromosome et (ii) à leur taille moyenne chez *S. cerevisiae* BY4741 (Annexe 8). Ces résultats montrent que les taux de mutation varient de $10^{-5}$ à $10^{-6}$ selon les différents clones pour un même chromosome. Ce facteur 10 confirme bien la disparité du nombre de mutations selon les clones.

Cependant, les mutations observées ont pu être induites par le traitement EMS appliqué au début de l'expérience d'ingénierie évolutive. Il n'est pas possible de prédire précisément le nombre de mutations induites par l'EMS. Malgré cela, Shiwa et al. (2012) ont séquencé des souches de *S. cerevisiae* haploïdes à la suite d'un traitement à l'EMS à des conditions et temps similaires que ceux employés dans notre étude et ont mis en avant l'apparition d'une cinquantaine de mutations par souche. Ces résultats suggèrent qu'un nombre supérieur de mutations serait issu de la phase de sélection liée à l'ingénierie évolutive. De plus, la différence du nombre total de mutations entre les clones analysés laisse supposer l'apparition de ces mutations lors de la phase d'ingénierie évolutive.

Afin d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes ayant conduit à la résistance des souches mutantes obtenues, nous nous sommes concentrés principalement sur les gènes présentant des mutations non-sens (apparition d'un codon STOP), ainsi que sur les gènes présentant des INDEL. Ces deux types de mutations étant les plus susceptibles de générer des protéines non fonctionnelles et donc de jouer un rôle dans l'apparition de résistances. Sur un total de 285 gènes mutés, 6 présentent des mutations non-sens (2,4%) et 6 des INDEL (2,4%), dont certains retrouvés plusieurs fois parmi des groupes de clones différents. Ces gènes et leurs fonctions sont regroupés dans le tableau 8.

*Tableau 7 : Gènes mutés présentant des mutations non-sens (codon stop) ou INDEL ( xx- ou -xx) chez les différents mutants des ingénieries évolutives au lanthane et à l'ytterbium. Une même couleur représente un groupe de clones. Les gènes retrouvés plusieurs fois sont de la même couleur. *= mutation présente uniquement pour La E2.*

| Mutants | Mutations | | Fonctions |
|---|---|---|---|
| | Gènes mutés | Types de mutations | |
| Yb C11/G3 | *apl3* | cag -> tag | Alpha-adaptine ; grande sous-unité du complexe protéique associé à la clathrine, impliqué dans le transport vésiculaire. |
| | *tsl1* | cag -> tag | Grande sous-unité du complexe tréhalose 6-phosphate synthase/phosphatase (Tps1p-Tps2p) qui convertit l'uridine-5'-diphosphoglucose et le glucose 6-phosphate en tréhalose |
| | *tcb3* | tgg -> tag | Protéine reliant le réticulum endoplasmique à la membrane plasmique et qui régule les niveaux de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) en contrôlant l'accès de la phosphatase Sac1p à son substrat |
| Yb B10/D9/C7 | *rrd1* | gat -> gt- | Activateur de l'activité phosphotyrosyl phosphatase de PP2A, impliqué dans la progression de la phase G1, la dynamique des microtubules, la morphogenèse des bourgeons et la réparation de l'ADN |
| La E2/D7 | *tcb3* | tct -> tt- | - |
| | *cch1* | ttg -> tg- | Canal calcique à forte affinité impliqué dans l'influx de calcium |
| | *nup60* | tca -> taa | Nucléoporine qui contribue directement au transport nucléocytoplasmique et au maintien de perméabilité de la membrane nucléaire. Participe à la fixation des gènes à la périphérie nucléaire. |
| | *rrd1** | gtc -> gc- | * |
| | *mca1* | -ct -> cct | Protéase cystéine calcium dépendante pouvant cliver des substrats spécifiques pendant la réponse au stress et régule l'apoptose lors du traitement par $H_2O_2$ |
| La E12/G9 | *tcb3* | tgg -> tga | - |
| | *cch1* | tgg -> tag | - |
| | *rad2* | cag -> tag | Endonucléase d'ADN monocaténaire qui clive et excise l'ADN endommagé |

## 7c. Gènes intervenant spécifiquement dans la résistance au lanthane ou à l'ytterbium

Parmi les gènes mutés, différentes catégories ont pu être faites. Nous avons pu observer que certains gènes étaient mutés chez des mutants résistants au lanthane ou à l'ytterbium spécifiquement. Les gènes Apl3 et Tsl1 ont été mutés uniquement chez des clones issus de l'ingénierie à l'ytterbium, suggérant ainsi une implication de ces protéines dans la résistance à un stress ytterbium spécifiquement.

Pour Yb C11/G3, on observe la présence d'un codon stop dans le gène *apl3*, lié au transport vésiculaire. Ce type de fonction cellulaire est généralement associée à un phénotype de sensibilité quand elle est altérée, comme montré par le criblage d'une banque de mutants sur un stress aluminium (Thorsen et al. 2009). Or ces mutants présentent des phénotypes de résistance aux autres métaux, dont l'aluminium (Figure 20). Ce résultat pourrait s'expliquer par le rôle essentiel du complexe AP-2 dans l'endocytose, dont Apl3 est une sous-unité principale (León et al. 2016). En parallèle, les observations sur l'accumulation d'ytterbium à la surface cellulaire de *S. cerevisiae,* liées à une diminution de l'endocytose par la mutation de apl3 pourraient donc permettre une moindre accumulation de l'ytterbium dans les cellules (Figure 18) et donc une meilleure résistance *in fine* (Jiang et al. 2012). Ces 2 clones sont également mutés pour le gène tsl1, intervenant dans la

production de tréhalose, un sucre connu pour participer à la résistance à plusieurs stress comme à l'alcool, à la chaleur et aux métaux lourds (Liu et al. 2017). Ce gène possède un paralogue, Tps3, exprimé en condition de stress (Winderickx et al. 1996). Le stress induit par un contact à long terme avec l'ytterbium aurait pu amener à une sélection et expression préférentielle de Tps3, permettant ainsi la perte de fonction de Tsl1 sans conséquence pour la cellule et une production continue de tréhalose sous ces conditions.

A l'inverse des mutants précédemment discutés, les mutants Cch1, Mca1, Nup60 et Rad2 ont été mutés uniquement chez des mutants issus de l'expérience d'ingénierie au lanthane.

Pour la résistance au lanthane, on remarque en premier lieu que Cch1, un transporteur calcique emprunté préférentiellement par le lanthane, est muté indépendamment chez les 2 groupes de résistants au lanthane, faisant potentiellement de lui un gène important dans la résistance au lanthane (Ene et al. 2015). En effet, une mutation entrainant une perte de fonction de ce transporteur permettrait une diminution de l'entrée du lanthane dans la cellule (Figure 18), conduisant à moins d'interactions avec le contenu intracellulaire et donc une diminution de la toxicité pour la cellule. De plus, une délétion de ce transporteur résulte dans la littérature à l'obtention d'un phénotype sensible en présence de fer, ce qui n'est pas le cas ici (Figure 20) (Peiter et al. 2005). Un second gène en lien avec le calcium est mca1, muté chez La E2/D7, codant pour une protéase calcium dépendante (Szallies et al., 2002). La perte de capacité à lier le calcium, et donc indirectement le lanthane, pourrait être un des mécanismes de résistance. Cependant afin de prouver le lien entre la mutation de cette protéine et la résistance observée au lanthane, des expériences complémentaires devront être réalisées.

Le gène codant la nucléoporine Nup60, muté chez La E2/D7, est potentiellement impliqué dans la résistance au lanthane. Nup60 a été identifié comme participant activement dans l'ancrage des télomères à la membrane nucléaire, modifiant ainsi la conformation de la chromatine et donc possiblement la transcription de parties du génome (Askree et al. 2004). Enfin, l'implication de rad2 chez La E12/G9 pourrait être lié à sa fonction de réparation de l'ADN (Prakash et Prakash 2000). En effet, une protéine Rad2 non fonctionnelle pourrait entrainer une augmentation du nombre de mutations au sein de la cellule, déjà démontrée pour son homologue rad27, contribuant ainsi à l'apparition de mutations favorables comme au niveau du gène cch1 pour la survie des cellules face à un stress lanthane (Reagan et al. 1995). Cela pourrait expliquer également le nombre de mutations plus élevé chez le clone La E12/G9.

### 7d. Gènes communs à la résistance au lanthane et à l'ytterbium

Enfin, deux autres gènes ont été retrouvés mutés mais à la fois chez les mutants issus de l'ingénierie au lanthane mais également à l'ytterbium. Le gène Tcb3 est retrouvé dans 3 groupes de clones différents avec 3 évènements de mutations indépendants, suggérant son importance dans la résistance aux terres rares de manière générale. Ce gène fait partie d'une famille génique intervenant dans la connexion entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (transferts de protéines…) et possède 3 domaines de liaisons au calcium, pouvant potentiellement chélater les ions lanthane quand il est entièrement fonctionnel (Schulz, Creutz, et Snyder 2004). Il a été montré dans une expérience d'ingénierie évolutive aux monoterpènes qu'une version tronquée, et non délétée, de cette seule protéine suffisait à restaurer un phénotype semblable à la population évoluée (Brennan et al. 2015).

Le second gène identifié comme muté chez les mutants issus de deux ingénieries indépendantes est rrd1. Les 3 clones ytterbium B10/D9/C7, qui ne possèdent pas d'autres gènes mutés par STOP ou INDEL sont mutés pour ce gène. Rrd1 est également retrouvé muté uniquement pour un seul clone résistant au lanthane (E2). De façon intéressante, ce gène n'est pas muté chez la souche La E12 qui est la souche la plus proche phylogénétiquement de La E2 (Annexe 7), pouvant expliquer le facteur 2 observé entre les valeurs de leurs EC50 au lanthane (Figure 16). Quand rrd1 n'est plus fonctionnel, un phénotype de sensibilité au calcium ou encore au vanadium a été observé chez *S. cerevisiae*. *A contrario,* un phénotype résistant a été constaté en présence de caféine ou de rapamycine (Rempola et al. 2000). De plus, Rrd1 est un activateur de PP2A, une phosphatase importante intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la voie TOR (impliquée dans le métabolisme en réponse aux signaux environnementaux) et la voie MAPK (voie phosphate) (Rempola et al. 2000; Wlodarchak et Xing, 2016). La perturbation du cycle cellulaire pourrait entrainer par exemple une diminution de la croissance et ainsi l'apparition d'une résistance, mécanisme de résistance connu pour de multiples stress (Święciło 2016).

Pour la plupart de ces gènes, il n'a pas été montré de lien direct dans la littérature entre leur perte de fonctionnalité et une résistance à des métaux ou à d'autres stress. De plus, l'étude sur la protéine tronquée Tcb1 suggère qu'une protéine même incomplète peut jouer un rôle important dans une résistance et non seulement l'absence d'un gène. Pour déterminer cela, il faudrait approfondir l'étude de ces gènes par l'analyse de mutants avec un gène non fonctionnel (délétion) et des gènes codant des protéines tronquées aux différentes positions mutées identifiées chez les mutants que nous avons obtenus. Des interactions *in vitro* entre ces protéines tronquées (ex : Mca1) et les TR étudiées pourraient également être analysées afin de déterminer si des sites de liaisons métalliques sont encore fonctionnels et joueraient un rôle dans la résistance. Il est difficile de déterminer

précisément le rôle de chaque gène car de nombreuses interactions sont à l'œuvre entre différents mécanismes de résistance qui peuvent se cumuler, avec un possible effet synergique, ou éventuellement s'opposer expliquant peut-être l'EC50 deux fois moins élevé de E2 (Figure 16), qui possède une mutation INDEL sur *rrd1* non retrouvée chez D7. Enfin, il ne faut pas non plus mettre de côté les autres gènes mutés identifiés au sein de ces résistants, car une mutation peut éventuellement altérer des sites essentiels des protéines (Komar, 2007).

## VIII. Conclusions

Pour commencer, les mutants obtenus par ingénierie évolutive sont généralement appelés super-résistants dans la littérature, ce qui ne pourrait être confirmé qu'en comparaison avec d'autres études sur les mêmes stress attestant de l'effet réel de l'ingénierie évolutive par rapport à d'autres résistants obtenus par d'autres méthodes, ou même une autre ingénierie évolutive. Point essentiel, ce mémoire a mis en avant le potentiel de l'ingénierie évolutive dans l'acquisition de mutants très résistants au lanthane et à l'ytterbium par rapport à une souche de départ peu tolérante à ces métaux (résistances de 10 à 40 fois supérieures). Cette approche est intéressante afin d'étudier (i) les mécanismes d'adaptation des cellules de *S. cerevisiae* à un stress TR, mais également d'étudier (ii) les gènes et possibles fonctions impliquées dans la toxicité des TR. Enfin, la comparaison en parallèle du lanthane (TR légère) et de l'ytterbium (TR lourde) a permis de mettre en avant une différence de réponse entre ces TR qui induiraient des stress différents.

Nous avons pu ainsi mettre en évidence toute une série de gènes mutés, par mutations supposées silencieuses (changement d'acide aminé) pour la grande majorité, intervenant très probablement dans les résistances au lanthane et/ou à l'ytterbium. De plus, la résistance croisée à d'autres métaux plus ou moins proches chimiquement, suggèrent un ensemble de mécanismes de résistance spécifiques et généraux. Parmi les gènes mutés identifiés, tcb3, cch1 et rrd1 seraient les plus intéressants à étudier pour de futures recherches d'exposition à un stress au lanthane et/ou à l'ytterbium, et potentiellement pour d'autres métaux, de par leur présence dans les 2 stress. Ainsi, la connexion entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique, l'acquisition du calcium, l'endocytose, les voies cellulaires dont Rrd3 fait partie ou la conformation même de ces protéines semblent être des mécanismes de résistance importants dans une réponse à ces terres rares.

# IX. Bibliographie


Adamo, Giusy, Stefania Brocca, Simone Passolunghi, Benedetto Salvato, et Marina Lotti. 2012. « Laboratory Evolution of Copper Tolerant Yeast Strains ». *Microbial Cell Factories* 11 (1): 1. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-1.

Askree, Syed H., Tal Yehuda, Sarit Smolikov, Raya Gurevich, Joshua Hawk, Carrie Coker, Anat Krauskopf, Martin Kupiec, et Michael J. McEachern. 2004. « A genome-wide screen for Saccharomyces cerevisiae deletion mutants that affect telomere length ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (23): 8658-63. https://doi.org/10.1073/pnas.0401263101.

Binnemans, Koen, Peter Tom Jones, Bart Blanpain, Tom Van Gerven, Yongxiang Yang, Allan Walton, et Matthias Buchert. 2013. « Recycling of Rare Earths: A Critical Review ». *Journal of Cleaner Production* 51 (juillet): 1-22. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.12.037.

Brennan, Timothy C. R., Thomas C. Williams, Benjamin L. Schulz, Robin W. Palfreyman, Jens O. Krömer, et Lars K. Nielsen. 2015. « Evolutionary Engineering Improves Tolerance for Replacement Jet Fuels in Saccharomyces Cerevisiae ». *Applied and Environmental Microbiology* 81 (10): 3316-25. https://doi.org/10.1128/AEM.04144-14.

Çakar, Z. Petek, Ceren Alkım, Burcu Turanlı, Nilgün Tokman, Süleyman Akman, Mehmet Sarıkaya, Candan Tamerler, Laurent Benbadis, et Jean M. François. 2009. « Isolation of Cobalt Hyper-Resistant Mutants of Saccharomyces Cerevisiae by in Vivo Evolutionary Engineering Approach ». *Journal of Biotechnology* 143 (2): 130-38. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.024.

Cakar, Z, U Seker, C Tamerler, M Sonderegger, et U Sauer. 2005. « Evolutionary Engineering of Multiple-Stress Resistant ». *FEMS Yeast Research* 5 (6-7): 569-78. https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.010.

Chakhmouradian, A. R., et F. Wall. 2012. « Rare Earth Elements: Minerals, Mines, Magnets (and More) ». *Elements* 8 (5): 333-40. https://doi.org/10.2113/gselements.8.5.333.

Ciacci, Luca, Barbara K. Reck, N. T. Nassar, et T. E. Graedel. 2015. « Lost by Design ». *Environmental Science & Technology* 49 (16): 9443-51. https://doi.org/10.1021/es505515z.

Ene, Cristian D., Lavinia L. Ruta, Ioana Nicolau, Claudia V. Popa, Virgil Iordache, Aurora D. Neagoe, et Ileana C. Farcasanu. 2015. « Interaction between Lanthanide Ions and Saccharomyces Cerevisiae Cells ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20 (7): 1097-1107. https://doi.org/10.1007/s00775-015-1291-1.

Gharieb, Mohammed M., et Geoffrey M. Gadd. 1998. « Evidence for the Involvement of Vacuolar Activity in Metal(Loid) Tolerance: Vacuolar-Lacking and -Defective Mutants of <Emphasis Type="Italic">Saccharomyces Cerevisiae</Emphasis> Display Higher Sensitivity to Chromate, Tellurite and Selenite ». *Biometals* 11 (2): 101-6. https://doi.org/10.1023/A:1009221810760.

Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, et al. 1996. « Life with 6000 Genes ». *Science* 274 (5287): 546-67. https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546.

Gonzalez, Veronica, Davide A.L. Vignati, Corinne Leyval, et Laure Giamberini. 2014. « Environmental Fate and Ecotoxicity of Lanthanides: Are They a Uniform Group beyond Chemistry? » *Environment International* 71 (octobre): 148-57. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.06.019.

Hosiner, Dagmar, Susanne Gerber, Hella Lichtenberg-Fraté, Walter Glaser, Christoph Schüller, et Edda Klipp. 2014. « Impact of Acute Metal Stress in Saccharomyces cerevisiae ». *PLoS ONE* 9 (1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083330.

Huang, Peili, Jianxin Li, Shuhua Zhang, Chunxia Chen, Ying Han, Na Liu, Yang Xiao, et al. 2011. « Effects of Lanthanum, Cerium, and Neodymium on the Nuclei and Mitochondria of Hepatocytes: Accumulation and Oxidative Damage ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31 (1): 25-32. https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.09.001.

Jiang, MingYu, Toshihiko Ohnuki, Kazuya Tanaka, Naofumi Kozai, Eigo Kamiishi, et Satoshi Utsunomiya. 2012. « Post-adsorption process of Yb phosphate nano-particle formation by Saccharomyces cerevisiae ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 93 (septembre): 30-46. https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.06.016.

Jo, William J., Alex Loguinov, Michelle Chang, Henri Wintz, Corey Nislow, Adam P. Arkin, Guri Giaever, et Chris D. Vulpe. 2008. « Identification of Genes Involved in the Toxic Response of Saccharomyces Cerevisiae against Iron and Copper Overload by Parallel Analysis of Deletion Mutants ». *Toxicological Sciences* 101 (1): 140-51. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm226.

Khan, Aysha Masood, Nor Kartini Abu Bakar, Ahmad Farid Abu Bakar, et Muhammad Aqeel Ashraf. 2017. « Chemical Speciation and Bioavailability of Rare Earth Elements (REEs) in the Ecosystem: A Review ». *Environmental Science and Pollution Research* 24 (29): 22764-89. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7427-1.

Kolouchova, Irena, Karel Sigler, Michal Zimola, Tomas Rezanka, Olga Matatkova, et Jan Masak. 2016. « Influencing Fatty Acid Composition of Yeasts by Lanthanides ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (8). https://doi.org/10.1007/s11274-016-2093-5.

Komar, Anton A. 2007. « Silent SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype ». *Pharmacogenomics* 8 (8): 1075-80. https://doi.org/10.2217/14622416.8.8.1075.

Küçükgöze, Gökhan, Ceren Alkım, Ülkü Yılmaz, H. İbrahim Kısakesen, Sema Gündüz, Süleyman Akman, et Z. Petek Çakar. 2013. « Evolutionary Engineering and Transcriptomic Analysis of Nickel-Resistant *Saccharomyces Cerevisiae* ». *FEMS Yeast Research* 13 (8): 731-46. https://doi.org/10.1111/1567-1364.12073.

Kurvet, Imbi, Katre Juganson, Heiki Vija, Mariliis Sihtmäe, Irina Blinova, Guttorm Syvertsen-Wiig, et Anne Kahru. 2017. « Toxicity of Nine (Doped) Rare Earth Metal Oxides and Respective Individual Metals to Aquatic Microorganisms Vibrio Fischeri and Tetrahymena Thermophila ». *Materials* 10 (7): 754. https://doi.org/10.3390/ma10070754.

Lawrence, CHRISTOPHER W. 1991. « [I8] Classical Mutagenesis Techniques », mai, 9.

Lehembre, Frédéric, Didier Doillon, Elise David, Sandrine Perrotto, Jessica Baude, Julie Foulon, Lamia Harfouche, et al. 2013. « Soil Metatranscriptomics for Mining Eukaryotic Heavy Metal Resistance Genes ». *Environmental Microbiology* 15 (10): 2829-40. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12143.

León, Nagore de, Marta Hoya, M.-Angeles Curto, Sandra Moro, Francisco Yanguas, Cristina Doncel, et M.-Henar Valdivieso. 2016. « The AP-2 Complex Is Required for Proper Temporal and Spatial Dynamics of Endocytic Patches in Fission Yeast ». *Molecular Microbiology* 100 (3): 409-24. https://doi.org/10.1111/mmi.13327.

Li, Jinxia, Rudo A. Verweij, et Cornelis A. M. van Gestel. 2018. « Lanthanum toxicity to five different species of soil invertebrates in relation to availability in soil ». *Chemosphere* 193 (février): 412-20. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.040.

Liang, Tao, Kexin Li, et Lingqing Wang. 2014. « State of Rare Earth Elements in Different Environmental Components in Mining Areas of China ». *Environmental Monitoring and Assessment* 186 (3): 1499-1513. https://doi.org/10.1007/s10661-013-3469-8.

Liu, Tingting, Liying Zhu, Zhiping Zhang, He Huang, Zhidong Zhang, et Ling Jiang. 2017. « Protective Role of Trehalose during Radiation and Heavy Metal Stress in Aureobasidium Subglaciale F134 ». *Scientific Reports* 7 (1): 17586. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15489-0.

Lv, Haoxin, Nurettin Sahin, et Akio Tani. 2018. « Isolation and Genomic Characterization of Novimethylophilus Kurashikiensis Gen. Nov. Sp. Nov., a New Lanthanide-Dependent Methylotrophic Species of Methylophilaceae ». *Environmental Microbiology* 20 (3): 1204-23. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14062.

MacDiarmid, Colin W., et Richard C. Gardner. 1998. « Overexpression of the Saccharomyces CerevisiaeMagnesium Transport System Confers Resistance to Aluminum Ion ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1727-32. https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1727.

Machado, Manuela D., Mónica S. F. Santos, Cláudia Gouveia, Helena M. V. M. Soares, et Eduardo V. Soares. 2008. « Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of Saccharomyces cerevisiae: The flocculation as a separation process ». *Bioresource Technology* 99 (7): 2107-15. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.047.

Massari, Stefania, et Marcello Ruberti. 2012. « Rare Earth Elements as Critical Raw Materials: Focus on International Markets and Future Strategies ». *Resources Policy* 38 (1): 36-43. https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2012.07.001.

Mehra, Rajesh K., et Dennis R. Winge. 1991. « Metal Ion Resistance in Fungi: Molecular Mechanisms and Their Regulated Expression ». *Journal of Cellular Biochemistry* 45 (1): 30-40. https://doi.org/10.1002/jcb.240450109.

Pagano, Giovanni. 2016. *Rare Earth Elements in Human and Environmental Health: At the Crossroads Between Toxicity and Safety*. CRC Press.

Pagano, Giovanni, Francesco Aliberti, Marco Guida, Rahime Oral, Antonietta Siciliano, Marco Trifuoggi, et Franca Tommasi. 2015. « Rare Earth Elements in Human and Animal Health: State of Art and Research Priorities ». *Environmental Research* 142 (octobre): 215-20. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.039.

Panichev, A. M. 2015. « Rare Earth Elements: Review of Medical and Biological Properties and Their Abundance in the Rock Materials and Mineralized Spring Waters in the Context of Animal and Human Geophagia Reasons Evaluation ». *Achievements in the Life Sciences* 9 (2): 95-103. https://doi.org/10.1016/j.als.2015.12.001.

Peiter, Edgar, Marc Fischer, Kate Sidaway, Stephen K. Roberts, et Dale Sanders. 2005. « The Saccharomyces cerevisiae Ca2+ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity ». *FEBS Letters* 579 (25): 5697-5703. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.058.

Piper, David Z., et Michael Bau. 2013. « Normalized Rare Earth Elements in Water, Sediments, and Wine: Identifying Sources and Environmental Redox Conditions ». *American Journal of Analytical Chemistry* 2013 (septembre). https://doi.org/10.4236/ajac.2013.410A1009.

Prakash, Satya, et Louise Prakash. 2000. « Nucleotide Excision Repair in Yeast », 12.

Prévéral, S., E. Ansoborlo, S. Mari, A. Vavasseur, et C. Forestier. 2006. « Metal(loid)s and radionuclides cytotoxicity in Saccharomyces cerevisiae. Role of YCF1, glutathione and effect of buthionine sulfoximine ». *Biochimie*, Facets of Environmental Nuclear Toxicology, 88 (11): 1651-63. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.016.

Ramos, Silvio J., Guilherme S. Dinali, Cynthia Oliveira, Gabriel C. Martins, Cristiano G. Moreira, José O. Siqueira, et Luiz R. G. Guilherme. 2016. « Rare Earth Elements in the Soil Environment ». *Current Pollution Reports* 2 (1): 28-50. https://doi.org/10.1007/s40726-016-0026-4.

Reagan, M. S., C. Pittenger, W. Siede, et E. C. Friedberg. 1995. « Characterization of a Mutant Strain of Saccharomyces Cerevisiae with a Deletion of the RAD27 Gene, a Structural Homolog of the RAD2 Nucleotide Excision Repair Gene. » *Journal of Bacteriology* 177 (2): 364-71. https://doi.org/10.1128/jb.177.2.364-371.1995.

Rempola, B., A. Kaniak, A. Migdalski, J. Rytka, P. P. Slonimski, et J.-P. di Rago. 2000. « Functional Analysis of RRD1 (YIL153w) and RRD2 (YPL152w), Which Encode Two Putative Activators of the Phosphotyrosyl Phosphatase Activity of PP2A in Saccharomyces Cerevisiae ». *MGG - Molecular and General Genetics* 262 (6): 1081-92. https://doi.org/10.1007/PL00008651.

Ryuko, Sayomi, Yan Ma, Ning Ma, Motoyoshi Sakaue, et Takayoshi Kuno. 2012. « Genome-Wide Screen Reveals Novel Mechanisms for Regulating Cobalt Uptake and Detoxification in Fission Yeast ». *Molecular Genetics and Genomics* 287 (8): 651-62. https://doi.org/10.1007/s00438-012-0705-9.

Schulz, T. A., C. E. Creutz, et S. L. Snyder. 2004. « Characterization of the Yeast Tricalbins: Membrane-Bound Multi-C2-Domain Proteins That Form Complexes Involved in Membrane Trafficking ». *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61 (10): 1208-20. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4029-8.

Şen, Mustafa, Ülkü Yılmaz, Aslı Baysal, Süleyman Akman, et Z. Petek Çakar. 2011. « In Vivo Evolutionary Engineering of a Boron-Resistant Bacterium: Bacillus Boroniphilus ». *Antonie van Leeuwenhoek* 99 (4): 825-35. https://doi.org/10.1007/s10482-011-9557-2.

Serero, Alexandre, Judith Lopes, Alain Nicolas, et Serge Boiteux. 2008. « Yeast Genes Involved in Cadmium Tolerance: Identification of DNA Replication as a Target of Cadmium Toxicity ». *DNA Repair* 7 (8): 1262-75. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.04.005.

Shiwa, Yuh, Sanae Fukushima-Tanaka, Ken Kasahara, Takayuki Horiuchi, et Hirofumi Yoshikawa. 2012. « Whole-Genome Profiling of a Novel Mutagenesis Technique Using Proofreading-Deficient DNA Polymerase ». *International Journal of Evolutionary Biology*. https://doi.org/10.1155/2012/860797.

Simandl, G. J. 2014. « Geology and Market-Dependent Significance of Rare Earth Element Resources ». *Mineralium Deposita* 49 (8): 889-904. https://doi.org/10.1007/s00126-014-0546-z.

Święciło, Agata. 2016. « Cross-stress resistance in Saccharomyces cerevisiae yeast—new insight into an old phenomenon ». *Cell Stress & Chaperones* 21 (2): 187-200. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0667-7.

Szallies, Alexander, Bruno K. Kubata, et Michael Duszenko. 2002. « A Metacaspase of Trypanosoma Brucei Causes Loss of Respiration Competence and Clonal Death in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae ». *FEBS Letters* 517 (1-3): 144-50. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02608-X.

Thorsen, Michael, Gabriel G Perrone, Erik Kristiansson, Mathew Traini, Tian Ye, Ian W Dawes, Olle Nerman, et Markus J Tamás. 2009. « Genetic Basis of Arsenite and Cadmium Tolerance in Saccharomyces Cerevisiae ». *BMC Genomics* 10 (1): 105. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-105.

Tun, Nay M., Patrick J. O'Doherty, Zhong-Hua Chen, Xi-Yang Wu, Trevor D. Bailey, Cindy Kersaitis, et Ming J. Wu. 2014. « Identification of Aluminium Transport-Related Genes via Genome-Wide Phenotypic Screening of Saccharomyces Cerevisiae ». *Metallomics* 6 (8): 1558. https://doi.org/10.1039/C4MT00116H.

Turanlı-Yıldız, Burcu, Laurent Benbadis, Ceren Alkım, Tuğba Sezgin, Arman Akşit, Abdülmecit Gökçe, Yavuz Öztürk, Ahmet Tarık Baykal, Zeynep Petek Çakar, et Jean M. François. 2017. « In Vivo Evolutionary Engineering for Ethanol-Tolerance of Saccharomyces Cerevisiae Haploid Cells Triggers Diploidization ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124 (3): 309-18. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.04.012.

Weber, Robert J., et David J. Reisman. 2012. « Rare earth elements: A review of production, processing, recycling, and associated environmental issues ». *US EPA Region*.

Winderickx, J., J. H. de Winde, M. Crauwels, A. Hino, S. Hohmann, P. Van Dijck, et J. M. Thevelein. 1996. « Regulation of Genes Encoding Subunits of the Trehalose Synthase Complex InSaccharomyces Cerevisiae: Novel Variations of STRE-Mediated Transcription Control? » *Molecular and General Genetics MGG* 252 (4): 470-82. https://doi.org/10.1007/BF02173013.

Wlodarchak, Nathan, et Yongna Xing. 2016. « PP2A as a master regulator of the cell cycle ». *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 51 (3): 162-84. https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1143913.

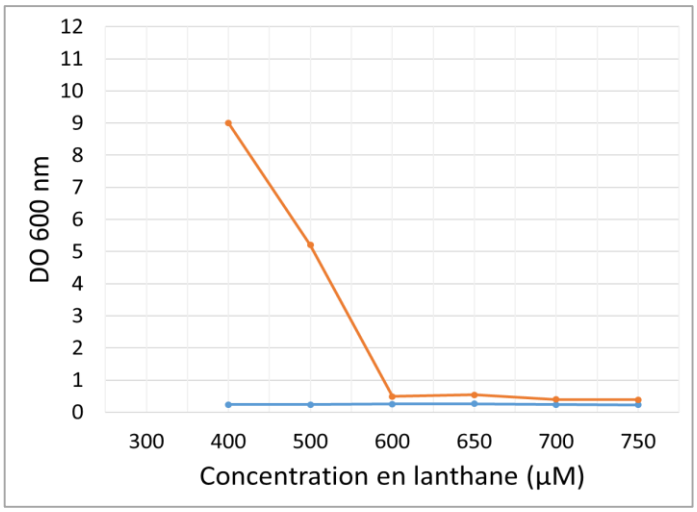
Wysocki, Robert, et Markus J. Tamás. 2010. « How Saccharomyces Cerevisiae Copes with Toxic Metals and Metalloids ». *FEMS Microbiology Reviews* 34 (6): 925-51. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x.

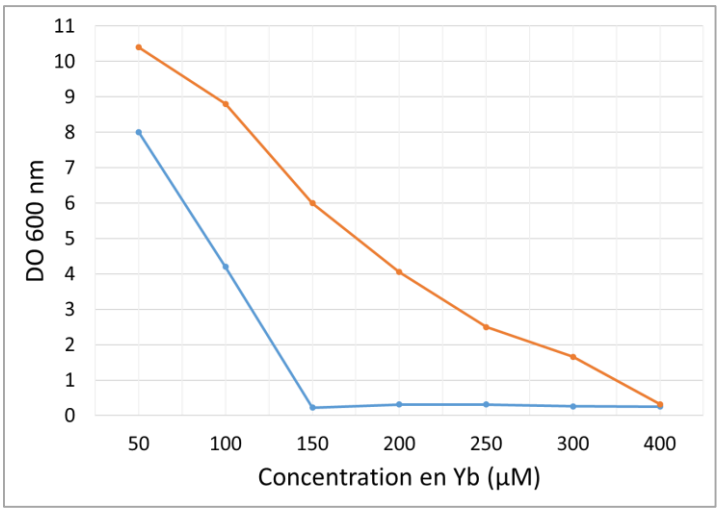
Zhou, Baolu, Zhongxue Li, et Congcong Chen. 2017. « Global Potential of Rare Earth Resources and Rare Earth Demand from Clean Technologies ». *Minerals* 7 (11): 203. https://doi.org/10.3390/min7110203.

# I. Annexes

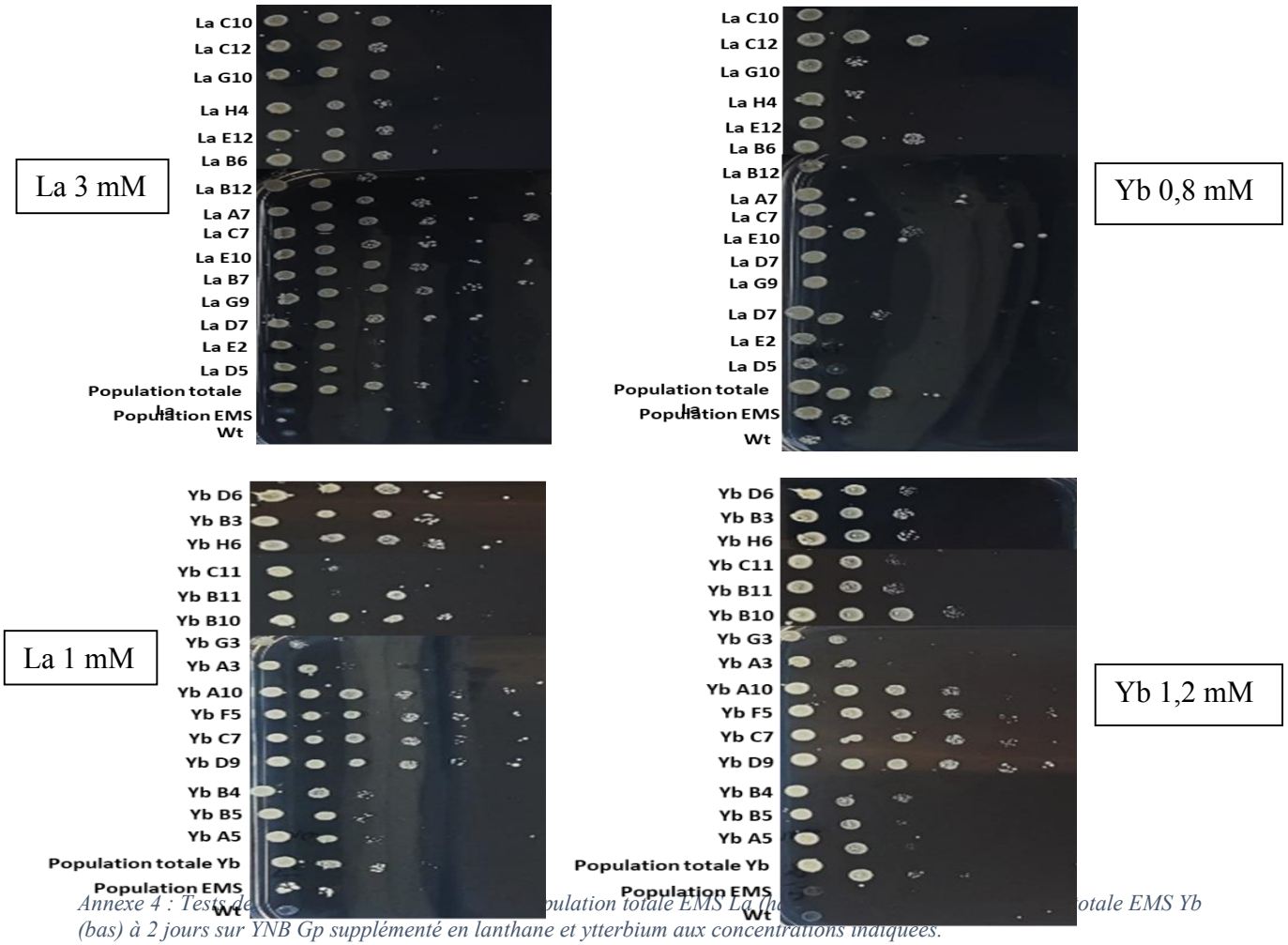
| Element | Species | Treatment (dose) | Post-exposure observation | Findings | References |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ce(III)** | Mice | Gavageor i.v. injection | 7 d | Pulmonary hemorrhage and hepatic congestion, thickenedalveolar septa, liver necrosis, neutrophil infiltrations; | Kawagoe et al. (2008) |
| | | Gavage | 90 d | ↓ WBC, lymphocyte, and platelet, reticulocyte count and %neutrophils; ↑ alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase,cholinesterase, triglycerides and cholesterol; differentialexpression of genes involved in immune/ inflammation response,apoptosis,cell cycle, cell proliferation, cytoskeleton, oxidativestress, signal transduction, transcription, and translation | Cheng et al. (2014) |
| **$nCeO_2$** | Rats | Intratracheal Instillation | 28 d | ↓ Liver weight, hepatocyte enlargement, sinusoidal dilatation;↑ ALT, ↓ albumin levels, Na:K ratio, and triglyceride levels | Nalabotu et al. (2011) |
| | Mice | | 28 d | ↑ Numbers of neutrophils and lymphocytes in bronchoalveolarlavage fluid (BALF); ↑ lactate dehydrogenase activity;pathological changes in the lung tissues | Xue et al. (2013) |
| | Mice | Nose inhalation | | Pulmonary inflammation with secretion of pro-inflammatorycytokines, with lipid peroxidation, GSH depletion and ↑ BALFlactate dehydrogenase | Aalapati et al. (2014) |
| **La(III)** | Rats | Oral Administration | 6 mo | Impaired behavioral performance; ↑ $[Ca^{2+}](i)/Ca^{2+}$-ATPase↓ SOD, CAT and GPx; ↑ MDA | Feng et al. (2006) and He et al. (2008) |
| **La(III), Ce(III) and Nd(III)** | Mice | Gavage | 42 d | Accumulation in hepatocyte nuclei and mitochondria;↓ SOD, CAT, ↑ GPx activity, GSH and MDA in mitochondria,↓↓ SOD, CAT, GPx and GSH; ↑↑ MDA | Huang et al. (2011) |
| | | | 90 d | Histopathological changes in the kidney;and peroxidation levels of lipid, ↑ ROS production and↓ SOD, CAT, GST and GR; ↓ GSH, ascorbic acid and thiols | Zhao et al. (2013) |

*Annexe 1 : Récapitulatif des effets de différentes terres rares sur des rats et souris (Pagano et al., 2015)*
*nCeO2 : nanoparticule de cérium ; (III) : état d'oxydation +3*

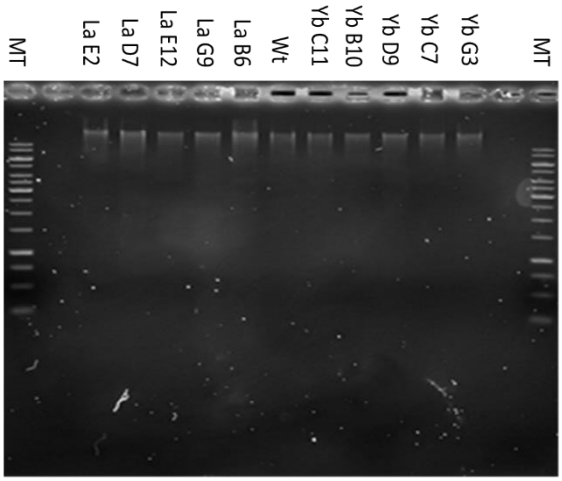


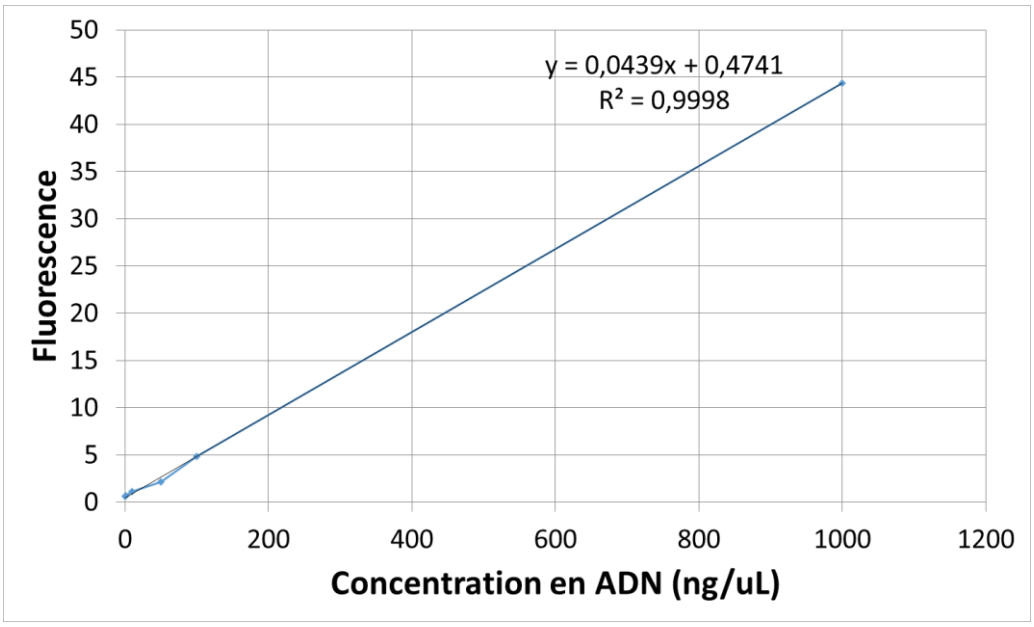

*Annexe 2 : Evolution de la croissance de S. cerevisiae BY4741 à différentes concentrations de lanthane et d'ytterbium.*
*En bleu, la DO à 24h et en orange, la DO à 48h. La culture est ensemencée à DO 0,2 en phase stationnaire, comme pour l'ingénierie évolutive.*



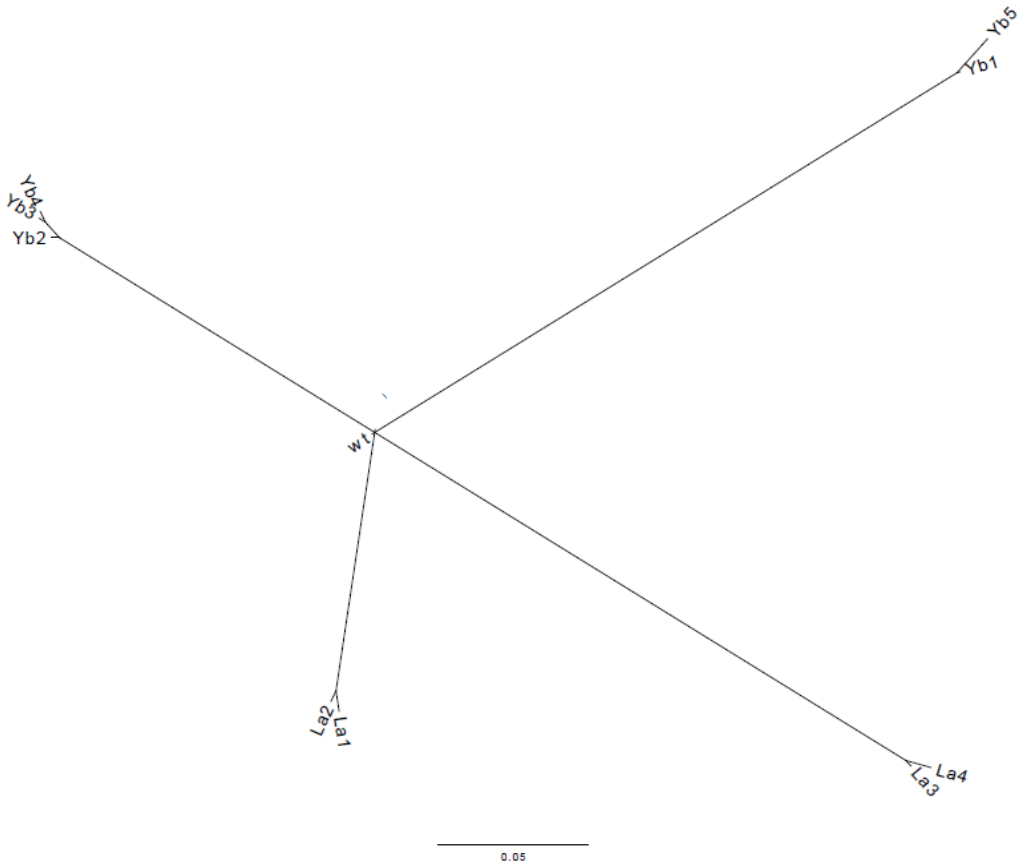

*Annexe 4 : Tests de [illegible] pulation totale EMS La (ha[illegible] otale EMS Yb (bas) à 2 jours sur YNB Gp supplémenté en lanthane et ytterbium aux concentrations indiquées.*




*Annexe 3 : Gel d'électrophorèse des ADN extraits des mutants résistants. Les marqueurs de taille (MT) sont de 1kb.*




*Annexe 5 : Droite étalon obtenue par dosage Picogreen. Les valeurs d'ADN de référence sont de 1 µg/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL et 1 ng/mL.*




*Annexe 6 : Arbre phylogénétique moyen obtenu par analyse phylogénétique bayésienne.*
Yb 1 = C11 ; Yb 2 = B10 ; Yb 3 = D9 ; Yb 4 = C7 ; Yb 5 = G3
*La 1 = E2 ; La 2 = D7 ; La 3 = E12 ; La 4 = G9.*

| Chromosomes | LaE2 | LaD7 | LaE12 | LaG9 | YbC11 | YbG3 | YbB10 | YbD9 | YbC7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 1,27E-05 | 1,27E-05 | 0,00E+00 | 0,00E+00 | 1,27E-05 | 1,27E-05 | 6,37E-06 | 6,37E-06 | 6,37E-06 |
| II | 8,18E-06 | 8,18E-06 | 8,18E-06 | 8,18E-06 | 2,62E-05 | 2,62E-05 | 4,91E-06 | 4,91E-06 | 4,91E-06 |
| III | 4,05E-06 | 4,05E-06 | 0,00E+00 | 0,00E+00 | 8,11E-06 | 8,11E-06 | 4,05E-06 | 4,05E-06 | 4,05E-06 |
| IV | 4,46E-06 | 4,46E-06 | 2,23E-05 | 2,41E-05 | 1,69E-05 | 1,69E-05 | 5,35E-06 | 5,35E-06 | 5,35E-06 |
| V | 6,93E-06 | 6,93E-06 | 9,23E-06 | 1,15E-05 | 1,62E-05 | 1,62E-05 | 1,15E-05 | 1,15E-05 | 1,15E-05 |
| VI | 1,07E-05 | 1,07E-05 | 1,07E-05 | 1,07E-05 | 2,68E-05 | 2,68E-05 | 5,36E-06 | 5,36E-06 | 5,36E-06 |
| VII | 3,84E-06 | 5,12E-06 | 2,43E-05 | 2,43E-05 | 1,28E-05 | 1,28E-05 | 3,84E-06 | 3,84E-06 | 5,12E-06 |
| VIII | 2,32E-06 | 2,32E-06 | 1,16E-05 | 1,16E-05 | 6,97E-06 | 6,97E-06 | 1,39E-05 | 1,39E-05 | 1,39E-05 |
| IX | 1,24E-05 | 6,19E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 | 9,28E-06 |
| X | 3,75E-06 | 3,75E-06 | 7,49E-06 | 7,49E-06 | 1,31E-05 | 1,31E-05 | 5,62E-06 | 5,62E-06 | 5,62E-06 |
| XI | 8,57E-06 | 8,57E-06 | 1,71E-05 | 1,71E-05 | 2,14E-05 | 2,14E-05 | 8,57E-06 | 8,57E-06 | 8,57E-06 |
| XII | 3,87E-06 | 3,87E-06 | 7,74E-06 | 7,74E-06 | 1,16E-05 | 1,16E-05 | 1,16E-05 | 1,16E-05 | 1,16E-05 |
| XIII | 1,18E-05 | 1,03E-05 | 3,25E-05 | 3,25E-05 | 1,77E-05 | 1,77E-05 | 4,43E-06 | 4,43E-06 | 4,43E-06 |
| XIV | 5,14E-06 | 5,14E-06 | 6,86E-06 | 6,86E-06 | 3,43E-06 | 3,43E-06 | 8,57E-06 | 8,57E-06 | 8,57E-06 |
| XV | 7,49E-06 | 7,49E-06 | 6,25E-06 | 6,25E-06 | 1,12E-05 | 1,12E-05 | 6,25E-06 | 6,25E-06 | 6,25E-06 |
| XVI | 4,38E-06 | 4,38E-06 | 5,84E-06 | 5,84E-06 | 4,38E-06 | 4,38E-06 | 1,75E-05 | 1,75E-05 | 1,90E-05 |

*Annexe 7 : Taux de mutations pour chaque chromosome en fonction de la souche séquencée. Les taux de mutations sont normalisés par rapport au nombre et à la taille des ORF par chromosome.*

ANNEXE

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Année universitaire : 2017/2018

**Convention de stage entre**

*Note : pour faciliter la lecture du document, les mots « stagiaire », « enseignant référent », « tuteur de stage », « représentant légal », « étudiant » sont utilisés au masculin*

**1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION**

Nom : Université de Lorraine

Adresse : CS 25233 54052 Nancy

☎ .....

Représenté par (signataire de la convention) Stéphane FLAMENT

Qualité du représentant Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies

Composante/UFR ... : FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES - MASTER BIOMANE

☎ 03 72 74 51 39

mél : karine.jacquot@univ-lorraine.fr

Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX

**2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL**

Nom : UMR 7360 LIEC

Adresse : Faculté des sciences et technologies

Représenté par (nom du signataire de la convention) : Christian MUSTIN

Qualité du représentant : Co-directeur UMR 7360

Service dans lequel le stage sera effectué : UMR LIEC 7360

☎ 03 72 74 52 05

mél : christian.mustin@univ-lorraine.fr

Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) : UMR LIEC site Aiguillettes

**3 - LE STAGIAIRE**

Nom : ORY Prénom : Jordan Sexe : F ☐ M ☒ Né(e) le 02/05/1995

Adresse : 33 rue des Bétis 54840 Velaine-en-Haye

☎ 06 38 65 67 78 mél : jordan.ory3@etu.univ-lorraine.fr

INTITULE DE LA FORMATION OU DU CURSUS SUIVI DANS L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : MASTER BIOTECHNOLOGIES MICROBIOLOGIES ALIMENT NUTRITION ENVIRONNEMENT (BIOMANE)

SUJET DE STAGE : Caractérisation de mutants de Saccharomyces cerevisiae sporulants au lumiume obtenus par l'ingénierie évolutive

Dates : Du 15/01/18 Au 13/07/18

Représentant une durée totale de 6 mois (Nombre de Semaines / de Mois (rayer la mention inutile)

Et correspondant à ..... Jours de présence effective dans l'organisme d'accueil.

Répartition si présence discontinue : ..... nombre d'heures par semaine ou nombre d'heures par jour (rayer la mention inutile).

Commentaire : .....

**ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT**

Nom et prénom de l'enseignant référent :

LEBLOND Pierre

☎ 03.72 74 51 43

mél :pierre.leblond@univ-lorraine.fr

**ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ORGANISME D'ACCUEIL**

Nom et prénom du tuteur de stage : BLAUDEZ Damien

Fonction : Maître de conférences

☎ 03 72 74 51 67 mél : damien.blaudez@univ-lorraine.fr

Caisse primaire d'assurance maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile du stagiaire sauf exception) : CMDE

Page 1

**Article 1 – Objet de la convention**
La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

**Article 2 – Objectif du stage**
Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant(e) acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.
Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.
ACTIVITES CONFIEES :
.....Activités de Recherche en laboratoire.....
.....

COMPETENCES A ACQUERIR OU A DEVELOPPER :
Mener un projet de recherche. Interpréter et valoriser les résultats.

**Article 3 – Modalités du stage**
La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de ..... heures sur la base d'un temps complet/ temps partiel *(rayer la mention inutile)*,

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers : .....
.....

**Article 4 – Accueil et encadrement du stagiaire**
Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.
Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.
Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement.
L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer.
Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITES D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc)
....Maître de stage (L.D. Blandez) + .....
.....doctorant en co-encadrement (N. Grosjean)

**Article 5 – Gratification - Avantages**
En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.
Le montant horaire de la gratification est fixé à 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.
La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.
La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.
L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

***(article 5 suite)*** En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.
La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du/de la stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à. ....554,40..... €
par heure / jour / mois *(rayer les mentions inutiles)*

**Article 5 bis –Accès aux droits des salariés – Avantages** (Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.
Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.
Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : .....
.....

**Article 5ter – Accès aux droits des agents - Avantages** (Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre leur domicile et leur lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.
Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.
Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : .....
.....

**Article 6 – Régime de protection sociale**
Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur.
Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.
Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

**6-1 Gratification d'un montant maximum de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale :**
La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.
Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la sécurité sociale.
En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2° de l'article L.418-2, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

**6.2 – Gratification supérieure** à 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale :
Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15 % du plafond horaire de la Sécurité Sociale.
L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

**6.3 – Protection Maladie du/de la stagiaire à l'étranger**
1) Protection issue du régime étudiant français
- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).
- pour les stages effectués au Québec par les étudiant(e)s de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en université) ;
- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs ; le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants pouvent exister entre les frais engagés et les tarifs français base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance Maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu du droit local (voir 2° ci-dessous).
2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil
En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :
☐ OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français
☒ NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant)
Si aucune case n'est cochée, le 6.3 – 1 s'applique.

**6.4 Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger**
1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :
- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident du travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;
- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;
- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.
Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.
2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.
3) La couverture concerne les accidents survenus :
• dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
• sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
• dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire et obligatoirement par ordre de mission,

*(6-4 suite)*
• lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),
• lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.
4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1/ n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le/la stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.
5) Dans tous les cas :
• si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
• si l'étudiant remplit des missions limitées en-dehors de l'organisme d'accueil ou en-dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

**Article 7 – Responsabilité et assurance**
L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.
Pour les stages à l'étranger ou outremer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.
Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant
Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente.

**Article 8 – Discipline**
Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.
Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.
En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

**Article 9 – Congés – Interruption du stage**
En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.
Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.
NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :
.....
Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.
Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.
Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

***(Article 9 suite)***
En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

**Article 10 – Devoir de réserve et confidentialité**
Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues par eux pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.
Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.
Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

**Article 11 – Propriété intellectuelle**
Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une oeuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.
Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

**Article 12 – Fin de stage – Rapport - Evaluation**
1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale ;
2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage.
Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.
3) Evaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent*(ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent)*.....
4) Modalités d'évaluation pédagogiques : le stagiaire devra *(préciser la nature du travail à fournir –rapport, etc.- éventuellement en joignant une annexe)*.....
NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) :
.....30 ECTS.....
.....
.....
5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

**Article 13 – Droit applicable – Tribunaux compétents**
La présente convention est régie exclusivement par le droit français.
Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

**FAIT A** .....Nancy..... **LE**....01/12/17.....

**POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT**
Nom et signature du représentant de l'établissement
**Stéphane FLAMENT**
Le Doyen
Le Doyen
Secteur Sciences et Technologies
Secteur Biologie
CONSEIL SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
S. FLAMENT
Le Doyen
Stéphane FLAMENT

***POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL***
Nom et signature du représentant de l'organisme d'accueil
.....Christian MUSTIN.....
**Christian MUSTIN**
Directeur adjoint

**STAGIAIRE (ET SON REPRESENTANT LEGAL LE CAS ECHEANT)**
Nom et signature
.ORY Jordan.....

**L'enseignant référent du stagiaire**
**Pierre LEBLOND**

**Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil**
Nom et signature
BLAUDEZ

***Fiches à annexer à la convention :***
- ***Attestation de stage** (page suivante)*
- ***Fiche stage à l'étranger** (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr, pour fiches pays voir site diplomatie.gouv.fr)*
- ***Autres annexes** (le cas échéant)*

## Résumé

L'évolution croissante des technologies et de la population a engendré une utilisation toujours plus importante de métaux tels que le lanthane, une terre rare légère et l'ytterbium, une terre rare lourde. Les mécanismes impliqués dans la tolérance à ces métaux chez les organismes eucaryotes sont très peu étudiés. Ainsi, Sacc*haromyces cerevisiae* a été utilisé à la base d'une expérience d'ingénierie évolutive, stratégie consistant en une exposition prolongée de cette levure à des concentrations croissantes à ces 2 métaux pour générer des résistants et identifier les mécanismes de résistance liés. Le succès de cette stratégie s'est traduit par l'obtention de mutants très résistants aux 2 métaux, avec des niveaux de résistance plusieurs dizaines de fois supérieurs à celui de la souche sauvage, ainsi que l'observation de résistances croisées à d'autres métaux. Enfin le séquençage des génomes des clones les plus résistants a permis d'identifier les mutations issues de cette stratégie. Ces protéines tronquées sont liées au transport du calcium, au transfert de protéines du réticulum à la membrane plasmique, ou encore à l'endocytose. Ces mécanismes de résistance sous-jacents représentent les premières données concernant la résistance de cellules eucaryotes aux terres rares et seront initiateurs pour des expériences complémentaires.



**Mots clés :** Lanthane, Ytterbium, Ingénierie évolutive, *Saccharomyces cerevisiae*



## Abstract

The current evolution of technologies and population have led to an increasing use of lanthanides such as lanthanum and ytterbium, a light and a heavy rare earth element (REE), respectively. The interactions and mechanisms involved in REE tolerance are poorly studied in eukaryotic organisms. *Saccharomyces cerevisiae* was used in an evolutionary engineering experiment that consisted in a continuous and increasing exposition to La or Yb to improve its resistance phenotype. This strategy was successful and led to different mutants several dozen times more resistant to La or Yb compared to the wild-type strain. These mutants also acquired cross-resistance to other metals. The genome of the most resistant mutants was sequenced and allowed the identification of different mutations with the corresponding mutated proteins. These proteins belong to functional groups such as calcium transport, protein transport from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, or the endocytosis. In conclusion, this evolutionary engineering approach brings the first data on REE tolerance mechanisms in eukaryotic cells. Several complementary studies have to be done to improved our comprehension and define precisely the identified mechanisms towards REE.



**Key words:** Lanthanum, Ytterbium, Evolutionary engineering, *Saccharomyces cerevisiae*