HAL
open science

Métallome et homéostasie du fer chez Pseudomonas aerunginosa : rôle des sidérophores pyochéline et pyoverdine

Olivier Cunrath

▶ **To cite this version:**

Olivier Cunrath. Métallome et homéostasie du fer chez Pseudomonas aerunginosa : rôle des sidérophores pyochéline et pyoverdine. Bactériologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ018 . tel-01356371

HAL Id: tel-01356371

https://theses.hal.science/tel-01356371

Submitted on 25 Aug 2016

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 STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE Vie et Santé

[Biotechnologie et signalisation cellulaire]

THÈSE présentée par :

[Olivier CUNRATH]

soutenue le : **28 avril 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Microbiologie moléculaire

METALLOME ET HOMEOSTASIE DU FER CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

[Rôle des sidérophores pyochéline et pyoverdine]

THÈSE dirigée par :

[Mme. SCHALK Isabelle]	Dr., université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

[Mme. MICHAUD-SORET Isabelle]	Dr., CEA Grenoble
[M. CORNELIS Pierre]	Pr., université de Brussels

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Mme. SABATIER Laurence]	Pr., université de Strasbourg
[Mme. RODRIGUE Agnès]	Dr., université de Lyon
[M. FILLOUX Alain]	Pr., Imperial College of London

INTRODUCTION 9

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 11

CHAPITRE 1 13

PSEUDOMONAS AERUGINOSA 13

1. LA VIE PLANCTONIQUE 16

2. LE BIOFILM 16

3. LE MODE DISPERSIF 19

4. L'INFECTION 19

4.1 Modèle d'infection 20

CHAPITRE 2 22

LES MÉTAUX ET LES MICRO-ORGANISMES 22

1. LES MÉTAUX EN BIOLOGIE 24

2. LES MÉTAUX BIOLOGIQUES CHEZ LES BACTÉRIES 25

3. LE TRANSPORT DES MÉTAUX CHEZ LES BACTÉRIES 27

L'import des métaux chez Pseudomonas aeruginosa 28

4. LA RÉSISTANCE AUX MÉTAUX 30

5. LA RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DES MÉTAUX CHEZ LES BACTÉRIES 32

CHAPITRE 3 35

LE FER ET PSEUDOMONAS AERUGINOSA 35

LES SOURCES DE FER 37

1.1 Le fer minéral 37

1.2 Le fer libre 38

1.3 Les sources de fer chez l'hôte 38

1.4 L'hème et les hémoprotéines 38

1.5 Les protéines non hémiques 40

Les autres sources de fer chez l'hôte 40

2. L'ACQUISITION DU FER PAR LES SIDÉROPHORES CHEZ LES BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES 41

3. L'ACQUISITION DU FER PAR LES SIDÉROPHORES CHEZ P. AERUGINOSA 46

3.1 La pyoverdine (PVDI) 46

3.2 La pyochéline (PCH) 54

3.3 Les sidérophores exogènes 59

3.4 L'import de l'hème chez P. aeruginosa 62

3.5 Les autres systèmes d'acquisition du fer chez P. aeruginosa 64

4. LA RÉGULATION 66

4.1 La protéine régulatrice Fur 67

4.2 Les facteurs sigma/anti-sigma 67

4.3 Les petits ARN régulateurs 68

4.4 Le stockage du fer 68
OBJECTIFS **70**

RÉSULTATS **72**

CHAPITRE 4 ..... **74**
ÉTUDE DE L'ORGANISATION CELLULAIRE DES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA VOIE DE LA PYOCHÉLINE **74**
1. INTRODUCTION 76
2. CONTRIBUTION DES AUTEURS 78
3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES (NON PUBLIÉS) 78
3.1 Localisation du régulateur PchR 78
3.2 Étude du sidérosome 78
3.3 Étude de distribution des protéines des voies PCH et PVD 80
3.4 Étude du rôle des protéines codées par les gènes pchH et pchI 81
4. DISCUSSION 84
CHAPITRE 5 ..... **90**
L'ÉTUDE DU MÉTALLOME DE P. AERUGINOSA DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE **90**
1. INTRODUCTION 92
2. CONTRIBUTION DES AUTEURS 94
3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES (NON PUBLIÉS) 94
3.1 Proportion des métaux dans les différentes conditions de culture 94
3.2 Le métallome de la bactérie en présence d'un excès de métal 96
4. DISCUSSION 98
CHAPITRE 6 ..... **102**
L'ÉTUDE DU PROÉTOME DE P. AERUGINOSA DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURE **102**
1. INTRODUCTION 104
2. RÉSULTATS 106
2.1 Le protéome de P. aeruginosa dans différentes conditions de culture 106
2.2 L'activation de l'expression des voies PVD et PCH dans la souche ΔpvdFΔpchA 113
3. DISCUSSION 117
CHAPITRE 7 ..... **121**
IMPLICATION DE LA PYOCHÉLINE ET DE LA PYOVERDINE **121**
DANS L'IMPORT DES MÉTAUX **121**
1. INTRODUCTION 123
2. RÉSULTATS 125
2.1 La régulation de l'expression des voies PCH et PVD par les métaux 125
2.2 Le transport de métaux par la PCH et la PVD 131
2.3 Interaction entre PchR et PCH-métal 134
3. DISCUSSION 136

CHAPITRE 8 ..... **138**
LE RÔLE DES SIDÉROPHORES PCH ET **138**
PVD DANS L'INFECTION **138**
DE DROSOPHILA MELANOGASTER **138**
1. INTRODUCTION 140
2. RÉSULTATS 142
2.1 Implication de la PCH et PVD dans l'infection de Drosophila melanogaster 142
3. DISCUSSION 146

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **148**

MATÉRIEL ET MÉTHODES **153**

ANNEXES **160**

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES **169**

BIBLIOGRAPHIE **173**

LORS DE CETTE THÈSE NOUS AVONS PU DÉMONTRER LES ENZYMES DE BIOSYNTHÈSE DE CES SIDÉROPHORES ADOPTENT UNE ORGANISATION SPÉCIFIQUE AUX PÔLES DES BACTÉRIES. DE PLUS, L'ÉTUDE DE LA COMPOSITION EN MÉTAUX DE P. AERUGINOSA DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE CULTURES A PU DÉMONTRER QUE LA BACTÉRIE ADAPTE SA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN MÉTAUX SELON LA COMPOSITION DU MILIEU EXTRACELLULAIRE **187**

MOTS-CLÉS : PSEUDOMONAS AERUGINOSA, FER, MÉTAUX CHEZ LES BACTÉRIES, SIDÉROPHORES, PYOCHÉLINE, PYOVERDINE **187**

KEY WORDS: PSEUDOMONAS AERUGINOSA, IRON, METALS IN BACTERIA, SIDEROPHORES, PYOCHELIN, PYOVERDINE **187**

Liste des abréviations

aa : acides aminés

ABC : ATP Binding Cassette

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

CCCP : Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazone

Dha : acide Dihydroaeruginoïque

dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate

DTT : DiThioThreitol

DO : Densité Optique

ECF : ExtraCytoplamsic Function

EDTA : Acide Etylène Diamine Tétra Acétique

FRET : Fluorescence (Förster) Resonance Energy Transfert

Fur : Ferric uptake regulator

GFP : Green Fluorescent Protein

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectra

MIC : Minimal Inhibition Concentration

NIC : Non Inhibitory Concentration

NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthase

PCH : pyochéline

PCR : Polymérase Chain Reaction

PVD : pyoverdine

ROS : Reactive Oxygen Species

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram-négatif, pathogène et opportuniste, responsable de nombreuses et sévères infections chez l'homme. Ce micro-organisme, comme la plupart des organismes vivants, a besoin de fer pour sa croissance ainsi que d'autres métaux biologiques comme le zinc, le cuivre, le nickel, le manganèse, le cobalt, le molybdène, le vanadium et bien d'autres.

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'homéostasie des métaux chez cette bactérie et plus particulièrement à leurs systèmes d'acquisition. Bien que tous les métaux biologiques soient d'une grande importance pour *P.aeruginosa*, nos recherches se sont focalisées plus particulièrement sur les systèmes d'acquisition du fer via les sidérophores pyochéline et pyoverdine.

Dans la première partie de ce manuscrit, une synthèse bibliographique permettra de mieux connaître l'organisme étudié (*Pseudomonas aeruginosa*) et de découvrir l'importance des métaux chez les micro-organismes ainsi que leurs voies d'acquisition. Il sera ensuite fait un état des lieux des connaissances sur l'homéostasie du fer chez *Pseudomonas aeruginosa* ; un accent particulier a été mis sur les sidérophores produits par cette bactérie, qui ont été au centre de l'ensemble des recherches effectuées lors de cette thèse. Cette synthèse bibliographique n'a pas la prétention d'être exhaustive, mais permet de fixer les objectifs et d'analyser les résultats obtenus durant ce travail dans un cadre scientifique plus général. La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation des résultats obtenus durant cette thèse et l'ensemble des résultats sera discuté et mis en perspectives dans une troisième partie. Enfin, la quatrième et dernière partie de ce travail décrira les méthodes et les protocoles détaillés utilisés tout au long de cette thèse.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Pseudomonas aeruginosa

Au laboratoire, l'organisme modèle est *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (*P. aeruginosa*). C'est un bacille à Gram-négatif, d'une taille d'un micromètre et demi environ, aérobie strict et mobile grâce à un flagelle polaire (Figure 1). Il peut être retrouvé dans de nombreux milieux aqueux ainsi que dans divers types de sols. Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grands génomes bactériens avec 6,3 millions de paires de bases (Stover *et al.* 2000). La taille du génome résulte d'une complexité génomique plutôt que de duplications de gènes. De plus, le taux en G/C est d'environ 67 % (ce qui est élevé), ce pourcentage variant généralement entre 25 % et 70 % chez les bactéries. La taille du génome et le pourcentage élevé en G/C lui sont nécessaires pour pouvoir coloniser et s'adapter à des environnements changeants, variés et extrêmes. Le génome de *P. aeruginosa* code pour plus de 520 protéines régulatrices, environ 150 protéines de membrane externe et environ 300 protéines de membrane interne ce qui est cohérent avec son exposition à diverses conditions environnementales. Néanmoins, la fonction d'une grande partie des gènes n'est pas encore connue, leur expression se faisant probablement dans des environnements plus complexes que les conditions de culture en laboratoire (Silby *et al.* 2010).

Figure 1 : ***Pseudomonas aeruginosa*.**

Image de microscopie électronique réalisée sur la plateforme de microscopie électronique de l'IGBMC en août 2014 ; Grossissement 11 129 fois ; Échelle : 2 µm.

La capacité de *P. aeruginosa* à s'adapter et à survivre dans un grand nombre de niches écologiques est due au fait que la bactérie est capable de sentir les changements environnementaux et de s'y adapter. En effet, elle peut identifier un changement de pH, de température, de pression

osmotique ou encore un changement dans la concentration en nutriments. *P. aeruginosa* peut supporter des températures allant de 4°C à 42°C (Barbier *et al.* 2014) avec une température de croissance optimale à 37°C (Tsuji *et al.* 1982). Elle peut survivre à des pH variant de 5,4 à 8,5 (Tsuji *et al.* 1982). Chez *P. aeruginosa,* la génération d'énergie est principalement basée sur le catabolisme oxydatif de substrat carboné. La bactérie est capable d'utiliser de nombreuses sources de carbone et choisit la source de carbone optimale en cas de mélange de nutriments par répression contrôlée de certains catabolites (Suh *et al.* 2002). La bactérie utilise comme source de carbone ou d'azote préférentiellement des acides gras ayant de courtes chaînes, des acides aminés ou encore des polyamines (Stanier *et al.* 1966; Lessie and Neidhardt 1967; Meile *et al.* 1982; Tricot *et al.* 1994). En conditions anaérobies, *P. aeruginosa* est également capable d'utiliser le nitrate comme source alternative d'accepteur d'électrons (Davies *et al.* 1989; Zumft 1997). Même si la bactérie a un potentiel de survie limité en conditions anaérobies, d'autres voies de fermentation comme l'utilisation d'arginine (Vander Wauven *et al.* 1984) ou de pyruvate (Eschbach *et al.* 2004; Schreiber *et al.* 2006) ont été identifiées. La bactérie peut également diminuer l'expression de gènes non nécessaires pour diminuer le coût énergétique (Behrends *et al.* 2013). L'ensemble de ces adaptations est finement régulé ce qui permet à la bactérie de pouvoir croître dans de nombreuses conditions environnementales.

1. La vie planctonique

P. aeruginosa peut exister sous différentes formes selon les conditions environnantes. Sa forme mobile est la forme planctonique, sous laquelle elle possède un flagelle polaire lui permettant de se déplacer facilement, afin « d'explorer » et de coloniser de nouvelles niches. La forme planctonique semble être la forme préférentielle pour les bactéries vivant dans des conditions pauvres en nutriments ce qui leur permettent de se déplacer plus facilement vers des niches plus favorables (Madigan *et al.* 2012). De plus, sous cette forme la bactérie a un métabolisme plus élevé lui permettant de proliférer plus rapidement et de s'adapter plus spécifiquement aux nouveaux milieux rencontrés (Lewis 2010; Madigan *et al.* 2012; Nagar and Schwarz 2014).

2. Le biofilm

Le biofilm est une forme quasi sessile pendant laquelle la bactérie s'agrège et s'enrobe grâce à la production d'une matrice extracellulaire de polysaccharides, le plus souvent attachée à une surface (O'Toole *et al.* 2000). Le mode de vie en biofilm présente un grand nombre d'avantages pour la bactérie. Quand la bactérie est sous forme de biofilm, elle est plus résistante. En effet, ce dernier procure une meilleure résistance à des frottements physiques par une matrice extracellulaire dense. Il procure également une meilleure résistance aux métaux en concentrations toxiques (Harrison *et al.* 2007; Workentine *et al.* 2008), à la phagocytose lors d'infections (Simpson *et al.*

1993), au système immunitaire (Leid *et al.* 2005) et aux antibiotiques (Wei and Ma 2013). Dans un second temps, le biofilm a l'avantage d'être sessile ce qui permet aux bactéries de rester dans une niche avantageuse. Le biofilm peut être formé dans des niches riches en nutriments tels les tissus animaux ou les surfaces dans des systèmes fluidiques où les nutriments sont abondants et constamment remplacés comme les perfusions (Madigan *et al.* 2012). Le troisième grand avantage du biofilm est la cohabitation entre bactéries et la proximité de communication. Cette dernière augmente les chances de survie en permettant l'échange de nutriments et en facilitant l'échange génomique (Kuznetsova *et al.* 2013). Finalement, le mode de vie sous forme de biofilm est probablement le mode de vie « par défaut » dans la nature (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Le mode de vie sous forme planctonique est sans doute la norme pour les bactéries vivant dans des conditions extrêmes (Madigan *et al.* 2012).

La formation du biofilm se fait en cinq étapes organisées; (1) l'attachement réversible, (2) l'attachement irréversible, (3) l'étape de maturation précoce, (4) la deuxième étape de maturation et (5) la dispersion (Figure 2).

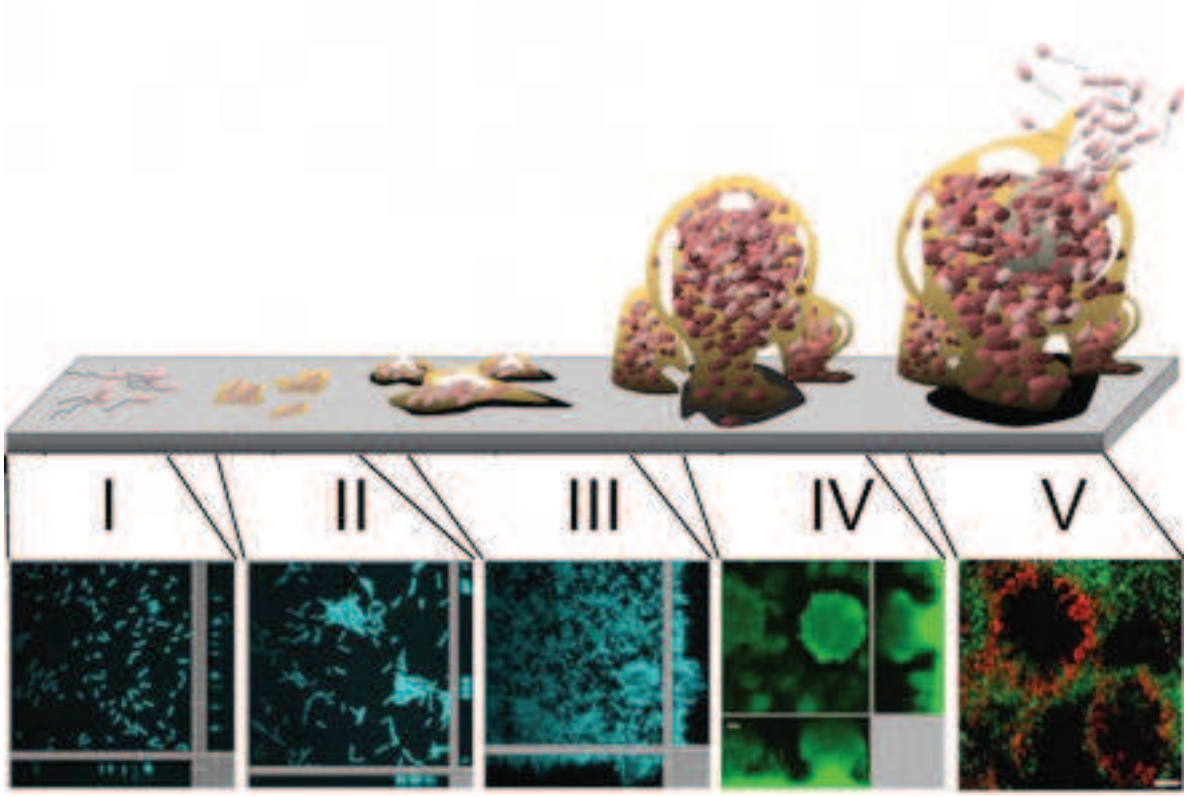


Figure 2 : Étapes de maturation du biofilm de *P. aeruginosa*.

Évolution du biofilm. (I) Attachement réversible à une surface ; (II) Attachement irréversible à la surface ; (III) Etape de maturation précoce ; (IV) Deuxième étape de maturation ; (V) Dispersion.

(1) La première étape de la formation du biofilm consiste à « sonder » une surface propice au développement d'un biofilm. Lorsque la bactérie est sous sa forme planctonique, les adhésines du flagelle et des pili de la bactérie entrent en contact avec la surface. Si les conditions sont

propices au développement du biofilm, la bactérie sécrète des polymères extracellulaires afin de s'y attacher irréversiblement. Dans le cas contraire, la bactérie peut se détacher et explorer d'autres niches biologiques. Le deuxième stade de développement du biofilm (étape II dans la Figure 2) est caractérisé par la perte du flagelle (synonyme de perte de mobilité pour la bactérie). Lors de cette étape, la bactérie synthétise également des polysaccharides extracellulaires (EPS pour exopolysaccharides) tel que le Psl (Polysaccharide Synthesis Locus), le Pel (Pellicule) afin de former la matrice extracellulaire précoce et d'initier la croissance en micro-colonie. Après les étapes d'initiation, les étapes de maturation (étape III et IV dans la Figure 2) se caractérisent principalement par la forte production d'EPS (avec une surproduction d'alginate), d'ADN extracellulaire et de protéines extracellulaires (Wei and Ma 2013). Ces différents composants ont de nombreux rôles dans la formation et le maintien du biofilm (Tableau 1). Les micro-colonies prennent une forme en « champignon » (Figure 2). Une certaine hétérogénéité se forme dans cette structure. Les bactéries du fond de la structure ont plus difficilement accès aux nutriments et à l'oxygène. Afin de contrer ce problème, elles forment des canaux pour faire circuler l'eau, l'oxygène et les nutriments ainsi que pour éliminer les déchets métaboliques. Malgré ces canaux, les bactéries au fond du « champignon » se retrouvent dans des conditions anaérobies (ou du moins dans un milieu appauvri en oxygène) et ont un métabolisme différent de celles vivant sur le « champignon ».

EPS	**Locus**	**Rôle**	**Références**
Psl	PA2231- PA2245	Adhésion initiale Structuration précoce du biofilm Signal pro-inflammatoire Résistance aux antibiotiques Répression des mécanismes de défense de l'hôte Stimulation de la formation du biofilm Guide d'exploration et de formation de micro-colonie	(Ma *et al.* 2007) (Ma *et al.* 2009) (Byrd *et al.* 2009) (Yang *et al.* 2011) (Mishra *et al.* 2012) (Irie *et al.* 2012) (Zhao *et al.* 2013)
Pel	PA3058- PA3064	Formation d'une pellicule Formation de biofilm sur des surfaces solides Agrégation des cellules bactériennes Résistance aux antibiotiques Adhésion initiale en absence de pili de type IV	(Friedman and Kolter 2004) (Colvin *et al.* 2011) (Colvin *et al.* 2011) (Vasseur *et al.* 2005)
Alginate	PA3540- PA3548	Résistance et défense immunitaire Résistance aux antibiotiques et à l'opsonophagocytose Séquestration de ROS Initiation de la mucoïdie Rétention de l'eau et des nutriments	(Leid *et al.* 2005) (Simpson *et al.* 1993) (Simpson *et al.* 1989) (Govan and Deretic 1996) (Sutherland 2001)
ADNe		Nutriments Séquestration	(Mulcahy *et al.* 2010) (Allesen-Holm *et al.* 2006)

		Résistance aux antibiotiques et aux métaux Signal pro-inflammatoire majeur Initiation de la réorganisation du biofilm	(Mulcahy *et al.* 2008) (Fuxman Bass *et al.* 2010) (Gloag *et al.* 2013)
Protéines extra-cellulaires	Flagelle Pili CdrA Cup fimbriae	Interaction initiale du contact cellule-surface Formation de micro-colonies en « champignon » Médiateur d'agrégation, augmentant la stabilité du biofilm Interaction cell-cell et formation des micro-colonies	(O'Toole and Kolter 1998) (O'Toole and Kolter 1998) (Borlee *et al.* 2010) (Giraud *et al.* 2011)

Tableau 1 : Rôles des différents constituants extracellulaires du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wei and Ma 2013).

A la fin de la maturation du « champignon » (étape V dans la Figure 2) sur le dessus du biofilm, une haute mortalité de bactéries est observée. Le biofilm passe dès lors à l'étape de dispersion. Les bactéries à l'intérieur du biofilm se détachent et passent en mode dispersif pour finalement synthétiser *de novo* un flagelle polaire et explorer de nouvelles niches écologiques.

3. Le mode dispersif

Un troisième mode de vie a récemment été identifié chez *P. aeruginosa* correspondant à une forme intermédiaire. Chua *et al.* ont démontré que *P. aeruginosa* peut préexister sous forme de cellule dispersive, se formant après la phase de maturation du biofilm. En effet, la bactérie possède une physiologie différente des deux autres formes. Sous cette forme, les bactéries seraient isolées mais plus résistantes au système immunitaire et moins sensibles à des changements de concentration en fer. Elles seraient également plus virulentes dans le modèle infectieux *Caenorhabditis elegans*. Les cellules dispersives sont capables de retourner sous forme de biofilm ou de se transformer rapidement (en moins de deux heures) en forme planctonique (Sauer *et al.* 2004; Chua *et al.* 2014).

4. L'infection

La complexité génomique permet à *P. aeruginosa* d'être une bactérie pathogène opportuniste capable d'infecter un grand nombre d'organismes, tels que des plantes (Rahme *et al.* 2000), des nématodes (Tan *et al.* 1999), des insectes (Apidianakis and Rahme 2009), des poissons (Clatworthy *et al.* 2009) ainsi que des mammifères (Snouwaert *et al.* 1992). Chez l'homme, elle est responsable de nombreuses infections graves, principalement chez les patients immunodéprimés et les patients atteints de la mucoviscidose. Elle peut causer des infections urinaires, oculaires, cutanées (lésions de type brûlures) et de graves pneumonies (Folkesson *et al.* 2012). Chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections causées par *P. aeuginosa* sont l'une des causes de mortalité majeure. Lors d'une infection persistante, *P. aeruginosa* forme un biofilm ce qui la rend

très résistante aux traitements antibiotiques classiques. De plus, *P. aeruginosa*, possède un grand nombre de mécanismes d'efflux et de chimiotaxie la rendant encore plus résistante aux antibiotiques.

Les infections aiguës par *P. aeruginosa* sont généralement causées par la bactérie sous forme planctonique, alors qu'il est communément pensé que les infections chroniques sont causées par des cellules en biofilm. Les infections nosocomiales peuvent avoir plusieurs causes : des contaminations directes (peau à peau) ou encore des objets venus de l'extérieur comme des plantes ou des fleurs portant la bactérie ; ces dernières sont des sources d'infection pouvant être évitées par de simples mesures d'hygiène. Cependant, les infections les plus communes sont celles rencontrées suite à des contaminations de matériels médicaux tels que des perfusions ou des sondes d'intubation souillées.

Ainsi, quelle que soit la voie d'infection, une fois la bactérie bien installée dans le corps humain, elle va jouer toutes ses cartes génétiques pour y rester.

4.1 Modèle d'infection

De nombreuses études sur la virulence de *P. aeruginosa* sont été réalisées, mais pour mener à bien ces études, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire. En raison des limites imposées par notre éthique scientifique, l'utilisation de modèles mammifères est restreinte. De ce fait, la plupart des études de virulence de *P. aeruginosa* ont été réalisées dans des hôtes non-mammifères tels que les insectes (*Drosophila melanogaster*) (Limmer *et al.* 2011), les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) (Tan and Ausubel 2000), les plantes (*Arabidopsis thaliana*) (Rahme *et al.* 1997; Rahme *et al.* 2000) ou encore les amibes (*Dictyostelium*) (Lima *et al.* 2011). Concernant les études dans des modèles de mammifères, il existe quelques études avancées de virulence chez la souris (Lavoie *et al.* 2011). Néanmoins, les études dans ces différents hôtes ont démontré que la pathogénicité de *P. aeruginosa* repose sur un grand nombre de gènes de virulence souvent exprimés dans n'importe quel modèle d'étude (Alibaud *et al.* 2008).

Chapitre 2

Les métaux et les micro-organismes

1. Les métaux en biologie

Le terme métal désigne l'un des trois groupes d'éléments dans le tableau périodique, les deux autres étant les métalloïdes et les non métaux. Ce groupe des métaux est constitué des métaux alcalins, des alcalino-terreux, des métaux de transition, des métaux pauvres ainsi que des lanthanides et des actinides (Figure 3). Tous les métaux ont la particularité de pouvoir perdre des électrons et former ainsi des cations. Cette lacune électronique leur permet de jouer le rôle d'acide de Lewis pour ainsi former des liaisons avec des ligands non-métalliques, ces derniers se comportant comme des bases de Lewis, en interagissant avec des paires d'électrons libres (Lewis 1923).

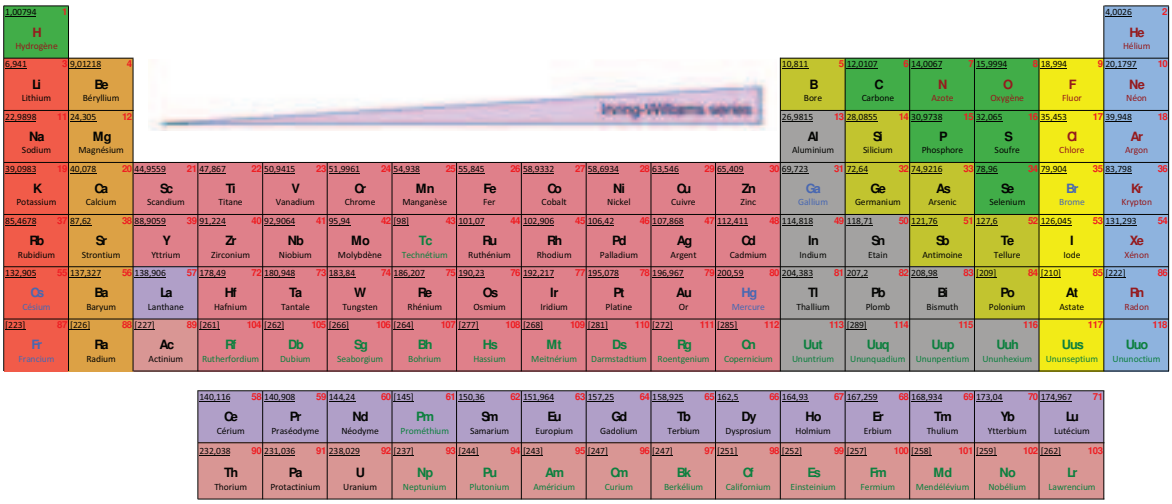


Figure 3 : Tableau périodique.

Représentation des groupes d'éléments dans le tableau périodique avec représentation schématique de la série Irving-Williams pour les métaux de la première ligne des métaux de transition. L'état des éléments est représenté selon la couleur d'écriture : noir – solide ; bleu – liquide ; rouge – gaz ; vert – préparé artificiellement. Le groupe d'appartenance des éléments est représenté selon la couleur de fond : rouge – métaux alcalins ; brun – alcalino-terreux ; rose – métaux de transition ; gris – métaux pauvres ; violet – lanthanides ; saumon – actinides ; vert – non métaux ; kaki – métalloïdes ; jaune – halogènes et bleu – gaz nobles.

Dans le règne du vivant, ces interactions entre biomolécules et ions métalliques ont été et sont essentielles. Il a été estimé qu'un quart à un tiers de toutes les protéines recquièrent des métaux pour leur bon fonctionnement même si cette proportion peut varier selon le type d'organisme ainsi que le type cellulaire (Dupont *et al.* 2006). L'assemblage entre ion métallique et ligand biologique permet d'obtenir un complexe aux caractéristiques uniques. L'affinité entre un métal et un ligand dépend des propriétés intrinsèques de ces derniers et dépend de la polarisation (rapport charge/rayon atomique) de l'ion métallique. Plus il sera polarisé, plus l'interaction avec le ligand

sera forte (Pearson 1966), la polarité augmentant de gauche à droite dans le tableau périodique (Figure 3). Selon ce concept, les métaux peuvent être classés en fonction de leurs capacités à former des complexes stables avec des biomolécules. La série Irving-Williams est une classification simplifiée pour les ions métalliques de transition prédominants dans la nature (Irving and Williams 1948) en fonction de leurs capacités à former des complexes stables avec des biomolécules.

$$Mn(II)<Fe(II)<Co(II)<Ni(II)<Cu(II)>Zn(II)$$

Néanmoins, cette classification ne peut à elle seule expliquer toutes les interactions entre métaux et ligands.

Dans le vivant, les complexes entre biomolécules et métaux ont des rôles déterminants, tant dans la structuration des protéines en permettant le bon repliement des macromolécules, que dans le métabolisme, en catalysant des réactions biochimiques. En effet, le potentiel d'oxydo-réduction des différents métaux joue un rôle clé dans de nombreuses réactions. Les ions cuivre et fer par exemple peuvent exister en nature sous forme réduite (Cu^{+}/Fe^{2+}) et oxydée (Cu^{2+}/Fe^{3+}) ce qui leur permet d'être impliqués dans de multiples mécanismes biologiques.

2. Les métaux biologiques chez les bactéries

Depuis l'apparition de la vie il y a environ 4 milliards d'années, les micro-organismes ont eu recours aux métaux pour assurer les mécanismes cruciaux nécessaires à leur survie. Ils ont été confrontés à d'innombrables changements environnementaux et ont dû constamment s'adapter à leur environnement. L'apparition de la photosynthèse, il y a environ 3 millions d'années et ainsi l'augmentation accrue du taux de dioxygène a été une des plus grandes catastrophes écologiques. Cette augmentation en dioxygène, d'abord dissous dans les océans puis relâché progressivement dans l'atmosphère, a entrainé l'oxydation de l'environnement qui jusque là était fortement réducteur (Madigan *et al.* 2012). Ce changement drastique n'a pas seulement fait varier le taux d'oxygène mais aussi la biodisponibilité d'un grand nombre d'éléments, notamment celle du fer et du cuivre. Le fer étant soluble sous forme réduite et très pauvrement soluble sous forme oxydée, il est devenu difficilement accessible dès l'apparition de l'oxygène provoquant une carence en fer dans une grande partie des milieux naturels. L'oxydation du cuivre, quant à lui, l'a rendu soluble et ainsi bio-accessible donc utilisable par les micro-organismes. Ces derniers ont ainsi dû s'adapter à ce changement en mettant en place des systèmes d'acquisition du fer très efficaces, en utilisant le cuivre comme bioélément. L'utilisation des métaux a donc été fortement influencée par la biodisponibilité de ces derniers. Malgré les avancées des études dans ce domaine, la spéciation des métaux dans les cellules selon les différents milieux que peuvent rencontrer les micro-organismes reste mal connue. Quelques données permettent néanmoins d'avoir un aperçu de la complexité du phénomène. Des quantifications de métaux dans les bactéries, poussées en conditions de culture de laboratoire ont été réalisées et confrontées aux concentrations connues de métaux dans un milieu

naturel. On peut classer les métaux en quatre groupes d'éléments ; les métaux majeurs, les éléments traces, les éléments essentiellement toxiques et les éléments uniquement toxiques (Tableau 2).

Ion métallique	Concentration dans l'eau de mer	Concentration dans *E. coli*	CMI
Na^{+}	457 mM	236 mM	≥ 50 mM
Mg^{2+}	55,5 mM	44-54 mM	≥ 50 mM
K^{+}	9,72 mM	161-210 mM	≥ 50 mM
Ca^{2+}	9,98 mM	0,3-1,5 mM	≥ 50 mM
Mn^{2+}	36,4 nM	1,7 µM	20 mM
Fe^{2+}/Fe^{3+}	179 nM	180 µM	≥ 50 mM (FeIII)
Co^{2+}	4,58 nM	0,5 µM	1 mM
Ni^{2+}	92,0 nM	5 µM	1 mM
Cu^{2+}/Cu^{+}	47,2 nM	18 µM	1 mM
Zn^{2+}	153 nM	270 µM	1 mM
Mo^{6+}	104 nM	8 µM	≥ 50 mM
W^{6+}	544 pM	n.d.	≥ 50 mM
V^{5+}	39,3 nM	77 µM	5 mM
Cr^{6+}	962 pM	1,1 µM	200 µM
Cd^{2+}	979 pM	n.d.	500 µM
Al^{3+}	371 nM	n.d.	2 mM
Ag^{+}	2,78 nM	n.d.	20 µM
Au^{+}	55,8 pM	n.d.	20 µM
Hg^{2+}	150 pM	n.d.	10 µM
Tl^{+}	48,9 pM	n.d.	2 mM
Pb^{2+}	145 pM	n.d.	5 mM
U^{6+}	12,6 nM	n.d.	2 mM

Tableau 2 : Teneurs en métal d'une bactérie.

Représentation des concentrations des éléments majeurs (en vert), éléments traces (en jaune), éléments essentiellement toxiques (en orange) et des éléments uniquement toxiques (en rouge). Dans la dernière colonne sont notées les valeurs de CMI (Concentration Minimale d'Inhibition) pour chaque élément chez *E. coli*. Selon (Nies and Silver 2007) & (Outten and O'Halloran 2001).

Il est généralement admis que les métaux biologiques les plus abondants sont : Na, Mg, K et Ca. De plus, la plupart des métaux de transition de la première ligne dans le tableau périodique (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) font partie des métaux biologiques ainsi que le molybdène (Mo) et le tungstène (W). Chaque métal biologique joue un rôle différent. Le magnésium trouvé à des concentrations très élevées dans les cellules est généralement associé à des fonctions de stabilisation des macromolécules et des membranes (Groisman *et al.* 2013). Le fer, métal de transition le plus utilisé, est impliqué, de par sa capacité à exister sous deux formes d'oxydation (Fe^{2+} et Fe^{3+}) dans le transfert d'électrons et le métabolisme de l'oxygène (Andrews *et al.* 2003). Le fer est également très

présent en tant que clusters fer-soufre dans diverses métalloprotéines telles que les ferrédoxines, des déshydrogénases et des nitrogénases (Lill 2009). Le zinc peut préexister sous un seul stade d'oxydation (Zn^{2+}) en solution et n'est donc pas utilisé pour le transfert d'électrons. Il est plutôt utilisé dans la structuration des protéines, comme dans les doigts de zinc ou peut jouer le rôle d'acide de Lewis dans les sites catalytiques (Porcheron *et al.* 2013). Les autres métaux ne représentent qu'environ 30 % des métaux trouvés dans toutes les métalloprotéines. Le cobalt est principalement présent dans la vitamine B_{12}, (Moore *et al.* 2014) alors que le nickel est nécessaire dans des enzymes tels que les hydrogénases, l'uréase ou quelques superoxyde-dismutases (Ge *et al.* 2013). Le manganèse est un cofacteur de certaines superoxyde-dismutases (Lisher and Giedroc 2013) et le molybdène est un cofacteur d'un complexe impliqué dans des oxydases de sulfites, des nitrogénases ainsi que des réductases de nitrates (Iobbi-Nivol and Leimkuhler 2013). Le cuivre est quant à lui utilisé dans des oxydases de cytochrome ainsi que dans de nombreuses enzymes périplasmiques chez les bactéries (Hodgkinson and Petris 2012). Le vanadium ainsi que le tungstène peuvent être retrouvés dans certains micro-organismes et peuvent remplacer le molybdène respectivement dans des nitrogénases et des oxydoréductases. Il a aussi été rapporté que certaines rares protéines peuvent utiliser des métaux toxiques comme cofacteurs tels que le plomb, le titane ou encore l'uranium (Cvetkovic *et al.* 2010). Certaines protéines peuvent également nécessiter plusieurs métaux pour leur bon fonctionnement (Waldron and Robinson 2009; Porcheron *et al.* 2013).

3. Le transport des métaux chez les bactéries

En vue de cette large utilisation des métaux, les bactéries ont dû développer une grande variété d'importeurs afin de subvenir aux différents besoins en métaux. Chez les bactéries à Gram négatif, les métaux bio-disponibles diffusent principalement à travers la membrane externe grâce à des porines ayant une faible sélectivité (Manara *et al.* 2012). En cas de faible biodisponibilité du métal, comme pour le fer par exemple, les bactéries ont développé des transporteurs de membrane externe hautement spécifiques, couplés à une machinerie énergétique localisée dans la membrane interne, permettant l'import du fer (Schalk *et al.* 2011). Pour traverser la membrane cytoplasmique, les bactéries utilisent principalement des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Ainsi, le magnésium, le fer, le manganèse, le nickel et le zinc passent la membrane cytoplasmique chez les Gram négatives et chez les Gram positives grâce aux transporteurs ABC, aidés pour les Gram négatives par des protéines chaperonnes périplasmiques (ter Beek *et al.* 2014). Le cuivre, quant à lui, est importé via des ATPases de type P_1 possédant un site de liaison du métal au niveau du cytoplasme, afin de limiter la diffusion libre du cuivre dans le cytosol (Porcheron *et al.* 2013) (Figure 4).

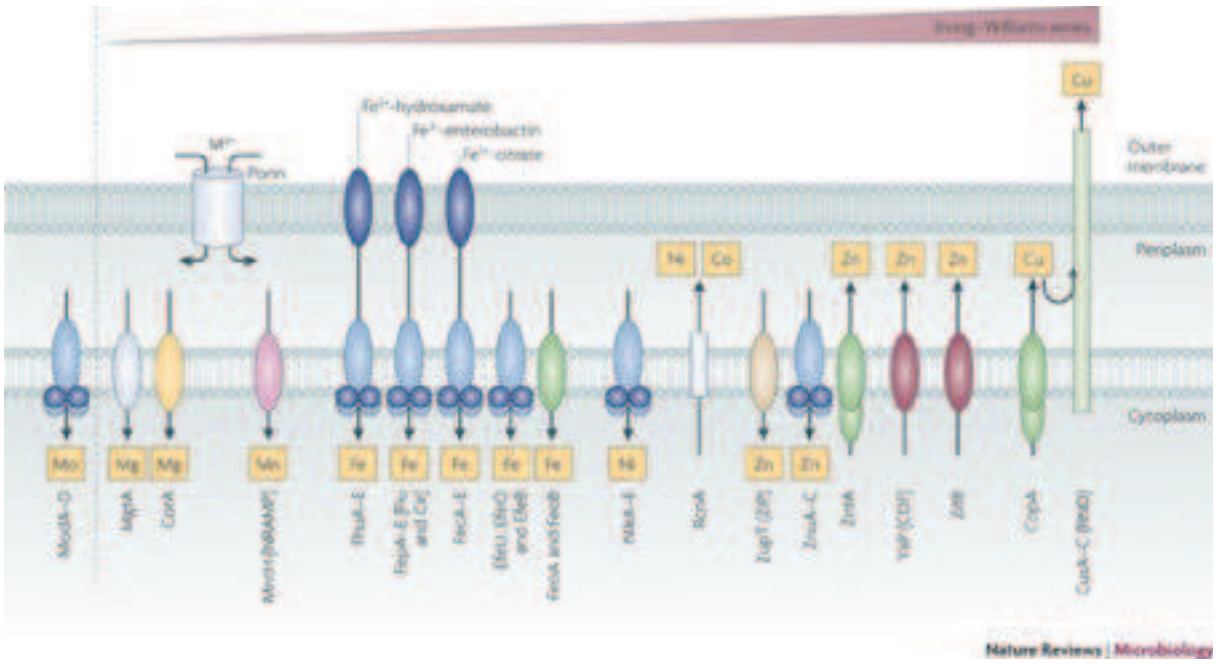


Figure 4 : Système de transport des métaux chez *Escherichia coli* (Waldron and Robinson 2009) .

E. coli possède un grand nombre de transporteurs pour les différents métaux. CDF, Cation Diffusion Facilitator ; Cir, Colicin I receptor ; CusA-C, Copper-sensitive operon ; EfeU, Elemental ferrous iron Uptake ; Feo, Ferrous iron-uptake system ; Fep, Ferric enterobactin-transporting protein ; Fiu, Ferric iron uptake ; NRAMP, Natural Resistance Associated with Macrophage Protein ; RND, Resistance and NoDulation ; ZIP Zrt/Irt-like Protein ; Znu, Zinc uptake ; ZupT, Zinc-uptake Transporter.

L'import des métaux chez Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa est une bactérie très étudiée sous un grand nombre d'aspects, mais peu d'études sur les systèmes d'acquisition des métaux ont été réalisées. A ce jour, aucune expérience n'a identifié précisément les métaux dont *P. aeruginosa* a besoin pour sa survie. Il est communément admis que cette dernière se comporte comme *E. coli*, qui est beaucoup plus étudiée. En 2001, Outten et O'Halloran ont réalisé une étude portant sur le contenu en métal d' *E.coli*, identifiant ainsi tous les métaux utilisés par la bactérie en conditions de culture de laboratoire (Outten and O'Halloran 2001). Parmi les métaux de transition, le fer, le zinc et le cuivre représentent les trois éléments majeurs. En plus de ces trois métaux, le vanadium, le chrome, le manganèse, le cobalt, le nickel et le molybdène ont été détectés. En plus des métaux de transition, le magnésium, le potassium et le calcium ont été dosés.

A partir de cette étude, on peut donc conclure qu'il existe des systèmes d'acquisition pour chacun de ces éléments chez *E. coli* et par extrapolation également chez *P. aeruginosa* (Figure 5). L'import à travers la membrane externe se fait pour la plupart des métaux par diffusion passive via des porines. Selon la Pseudomonas Genome Database (www.pseudomonas.com) il existe 18 porines différentes identifiées chez *P. aeruginosa* dont certaines laissent passer des métaux. (Duchesne *et*

al. 2013). En effet, il a été montré que le magnésium et le fer pouvaient passer à travers la porine OprQ. L'ajout de $FeCl_3$ diminuait l'expression de la porine (Arhin and Boucher 2010).

- Le Magnésium

Le magnésium pourrait diffuser à travers la porine OprQ pour entrer dans le périplasme (Arhin and Boucher 2010) où il serait pris en charge par un des trois systèmes d'acquisition identifié chez *P. aeruginosa*. En effet, le magnésium passe du périplasme au cytoplasme soit par le transporteur ABC de type-P2 MgtA homologue à celui identifié chez *E.coli* (Wang *et al.* 2014) soit par un des deux canaux métalliques MgtE ou CorA (Payandeh *et al.* 2013; Coffey *et al.* 2014; Takeda *et al.* 2014) .

- Le Vanadium

En ce qui concerne l'import de vanadium, très peu d'études ont été réalisées. Seul Baysse *et al.* suggèrent que le vanadium pourrait être importé via la pyochéline, sidérophore produit par *P. aeruginosa*, mais qu'il doit probablement exister une autre voie d'acquisition (Baysse *et al.* 2000).

- Le Chrome

Aucun système d'acquisition n'a été identifié chez *P. aeruginosa*.

- Le Manganèse

L'import du manganèse à travers la membrane interne peut se faire chez *P. aeruginosa* grâce au canal métallique MgtE (Coffey *et al.* 2014).

- Le Fer

L'acquisition du fer (sujet de mes travaux de thèse) a été largement étudiée et sera détaillée ci-dessous.

- Le Cobalt et le Nickel

L'import du cobalt et du nickel à travers la membrane interne peut se faire grâce au canal métallique CorA (Tripathi and Srivastava 2006; Guskov and Eshaghi 2012).

- Le Cuivre

Chez *P. aeruginosa*, la diffusion du cuivre à travers la membrane externe a lieu grâce à la porine OprC. (Yoneyama and Nakae 1996) et à travers la membrane interne grâce au transporteur ABC de type-P HmtA. (Lewinson *et al.* 2009).

- Le Zinc

En ce qui concerne l'import du zinc à travers la membrane interne, des études ont mis en avant l'action d'un transporteur ABC, ZnuABC pour (ZiNc Uptake) qui serait sous la régulation de Zur (Ellison *et al.* 2013), une protéine cytoplasmique capable de lier le Zn présent dans le cytoplasme. Lorsque Zur détecte une forte concentration de Zn, le complexe Zur-Zn inhibe la transcription de *znuABC*. Le transport *via* ZnuABC est composé d'une protéine périplasmique ZnuA, d'une perméase ZnuB et de l'ATPase ZnuC (Patzer and Hantke 1998). En plus de ce système spécifique,

le transporteur ABC de type-P HmtA (pour Heavy metal transporter A) a été identifié pour transporter le zinc à travers la membrane cytoplasmique (Lewinson *et al.* 2009). A ce jour, aucun autre système d'acquisition du zinc n'a été identifié chez *P. aeruginosa*.

- Le Molybdène

L'acquisition du molybdène se fait grâce au cluster ModABC. ModA, une protéine périplasmique de liaison, lie le molybdène ou le molybdate et le délivre au transporteur ABC ModBC. Ce dernier est composé de ModB qui est la partie transmembranaire et ModC la partie ATPase cytoplasmique (Pederick *et al.* 2014).

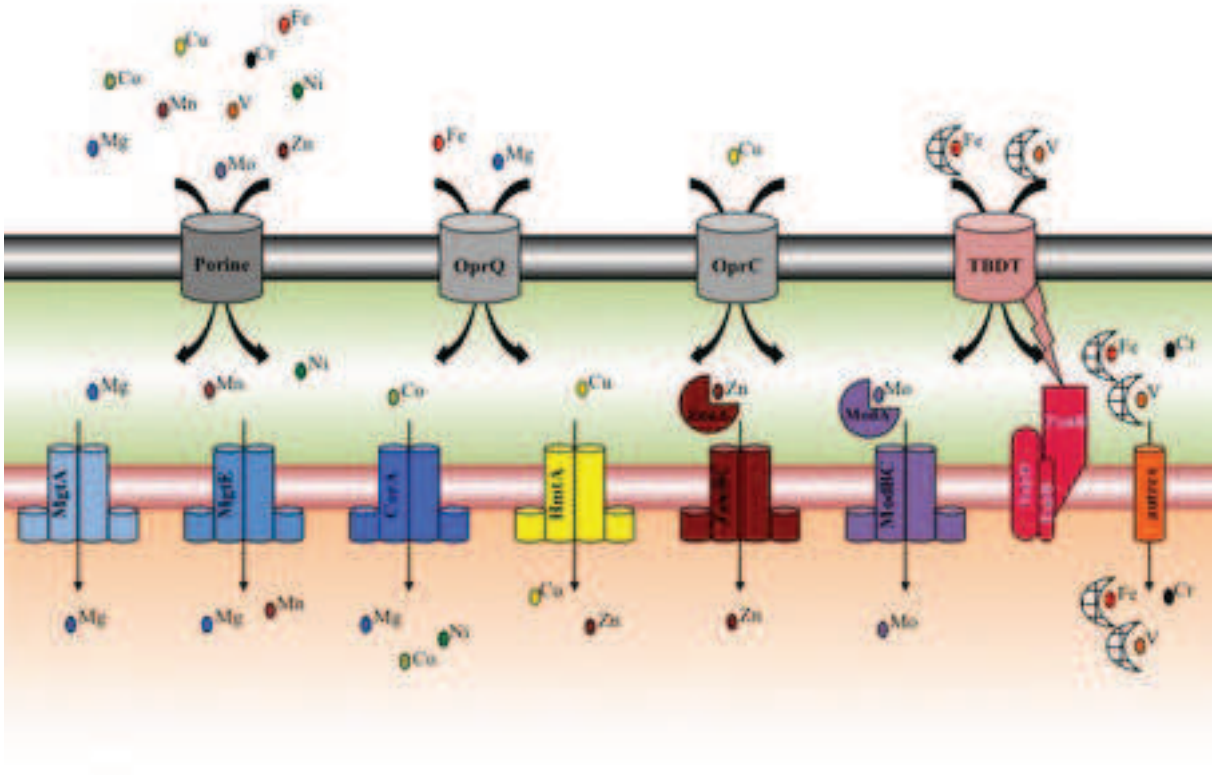


Figure 5 : Système d'acquisition des métaux chez *P. aeruginosa*

Les métaux passent la membrane externe principalement *via* des porines et diffusent ainsi dans le périplasme dans lequel ils sont pris en charge par des transporteurs spécifiques, le plus souvent des transporteurs ABC. Certains métaux sont complexés à des métabolites secondaires et sont ainsi transportés à l'intérieur de la bactérie tandis que pour d'autres métaux, des protéines de liaison périplasmiques s'assurent de la liaison du métal afin d'assurer le transport vers la membrane interne.

4. La résistance aux métaux

Les métaux biologiques sont essentiels à la vie des micro-organismes, mais à fortes concentrations, ils deviennent toxiques. Pour contrôler l'entrée des métaux biologiques et éviter l'entrée de métaux abiotiques, les bactéries ont dû développer des systèmes de résistance. Sept grands principes de résistance ont été identifiés chez les bactéries (Silver and Phung 1996; Lemire

et al. 2013). En excès de métal, la bactérie peut diminuer l'expression des protéines impliquées dans l'import et ainsi réduire l'acquisition des métaux (Ma *et al.* 2009) ou augmenter l'expression des pompes à efflux (Nies 1999; Nies 2003) et de ce fait activer l'expulsion des contaminants. En excès de métaux toxiques, certains micro-organismes sont capables de synthétiser des polymères à la surface de la paroi bactérienne, formant ainsi un biofilm mono- ou multi-espèce, pouvant piéger le métal et réduire son acquisition (Harrison *et al.* 2007). Des données récentes montrent également que les sidérophores produits par les micro-organismes pour acquérir le fer jouent un rôle non négligeable dans la résistance aux métaux chez les bactéries. Les sidérophores séquestrent les métaux et diminuent ainsi leurs diffusions via les porines dans les cellules bactériennes (Braud *et al.* 2009; Schalk *et al.* 2011; Chaturvedi *et al.* 2012; Hannauer *et al.* 2012). Alors que les mécanismes biochimiques ne sont pas connus, de nombreux micro-organismes peuvent aussi précipiter des métaux toxiques au niveau de la membrane cytoplasmique en tant qu'oxydes ou sulfures métalliques (Zannoni *et al.* 2008). Une autre stratégie de résistance consiste à utiliser des protéines de stockage, permettant d'une part de chélater le métal pour ainsi diminuer sa toxicité et permettant d'autre part de stocker le métal en cas de carence (Carrondo 2003). Une dernière stratégie consiste à modifier chimiquement le potentiel redox du métal le rendant ainsi moins toxique (Silver and Phung 1996). Enfin, si le métal contaminant altère des protéines ou d'autres complexes au sein de la bactérie, celle-ci peut répondre par une surexpression de protéines réparatrices (Harrison *et al.* 2009) ou en court-circuitant les étapes métaboliques nécessitant la protéine altérée en exprimant d'autres protéines moins sensibles aux métaux (Lemire *et al.* 2010) (Figure 6).

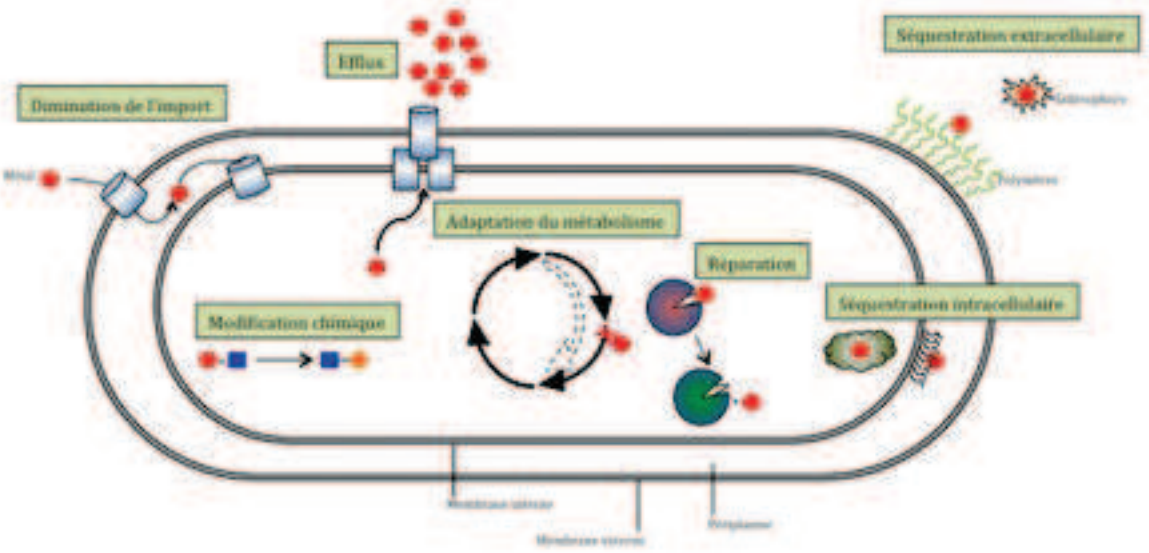


Figure 6 : Les différentes stratégies pour résister aux métaux toxiques.

Les bactéries ont plusieurs façons de se défendre face à un excès de métaux en quantité toxique (Lemire *et al.* 2013).

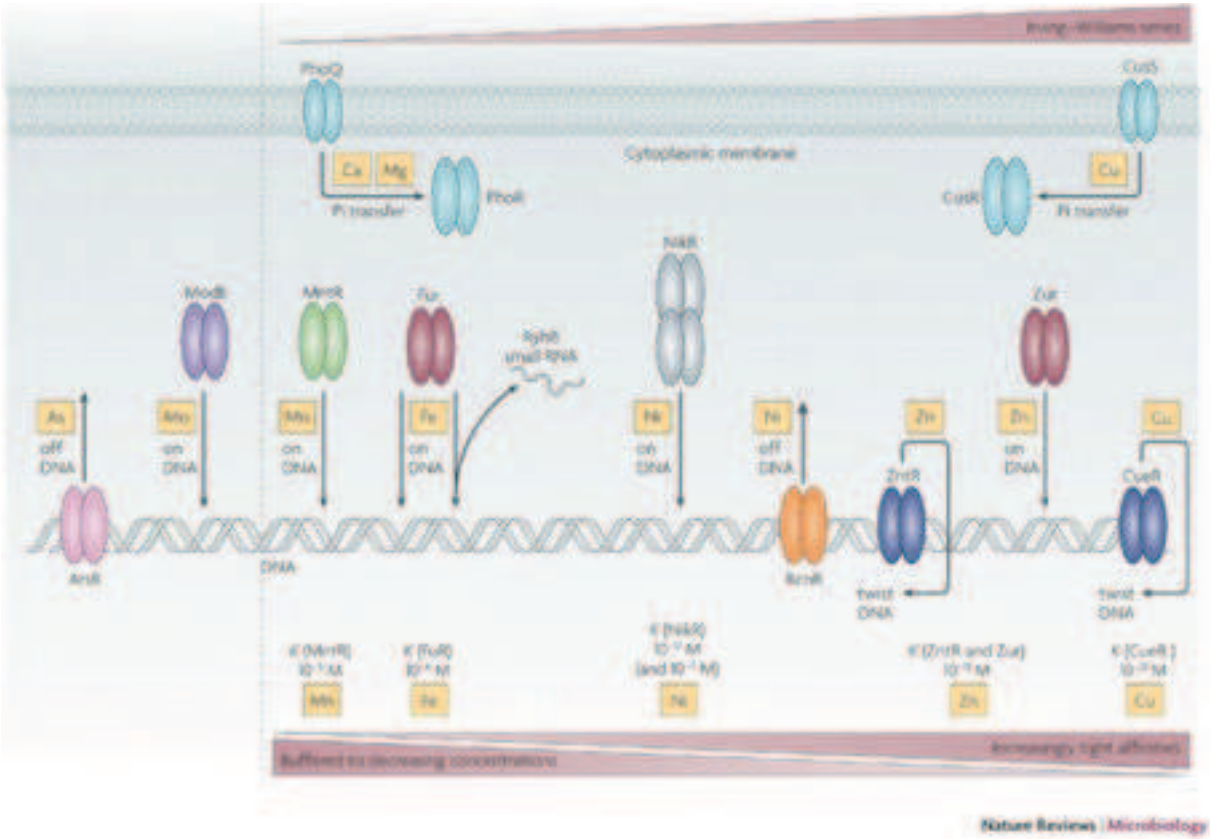
5. La régulation de l'homéostasie des métaux chez les bactéries

Tout cet ensemble doit être finement régulé pour que les bactéries conservent la bonne concentration en métaux. En effet, afin de contrôler les quantités de métaux importées et exportées, les bactéries ont développé des régulateurs spécifiques aux différents métaux contrôlant l'expression des gènes codant pour des transporteurs de métaux ou des systèmes impliqués dans la résistance aux métaux (Waldron *et al.* 2009). Sept familles de régulateurs cytoplasmiques de haute affinité et intervenant dans la régulation de la concentration des métaux ont été identifiées dans différentes bactéries (Giedroc and Arunkumar 2007; Braymer and Giedroc 2014). La publication des différentes structures cristallographiques de ces familles de régulateurs transcriptionnels a permis d'une part de les classer selon leurs structures et d'autre part de mieux comprendre leurs fonctions. Parmi ces sept familles, quatre familles de régulateurs transcriptionnels sont impliquées dans l'homéostasie des métaux en induisant l'expression des gènes impliqués dans la détoxification, le stockage et l'efflux des métaux. En effet, pour les familles de régulateurs ArsR (impliqué dans la régulation de : Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Hg, Pb, As, Sb et Bi), CsoR (Ni et Cu) et CopY (Cu), la liaison du métal sur le répresseur a pour conséquence d'inhiber l'interaction du répresseur avec l'ADN, permettant ainsi de libérer l'accès à la région promotrice. Pour la famille de régulateur

MerR (Cu, Zn, Ag, Cd, Au, Hg et Pb), la liaison du métal sur la protéine régulatrice, également liée à l'ADN, engendre un changement de conformation rendant la région promotrice accessible. Pour ces quatre familles de régulateurs transcriptionnels, le métal joue le rôle de dé-répresseur. Les trois autres familles, Fur (Mn, Fe, Ni et Zn), DtxR (Mn et Fe) et NikR (Ni), jouent le rôle de répresseurs en inhibant l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition des métaux. En effet, la liaison du métal induit un changement conformationel de la protéine régulatrice qui va se lier à une région promotrice de l'ADN et inhiber ainsi l'expression des gènes. Dans ce cas, le métal joue le rôle de co-répresseur. Ces trois dernières familles sont spécifiques aux métaux biologiques alors que les quatre autres familles sont aussi capables de lier et de senser des métaux non biologiques (Giedroc and Arunkumar 2007).

De plus, il existe plusieurs régulateurs de métaux à deux composants, tel que PhoP/PhoQ impliqué dans l'homéostasie du Ca et du Mg (Waldron and Robinson 2009). PhoQ agit en tant que protéine kinase associée à la membrane cytoplasmique qui, en faible concentration de magnésium périplasmique, s'auto-phosphoryle et active PhoP. PhoP agit en tant qu'activateur des gènes PAG (PhoP-activated genes) ainsi qu'en tant que répresseur des gènes PRG (PhoP-repressed genes). En revanche, en concentration de magnésium périplasmique élevée, PhoQ inhibe PhoP résultant dans la répression des gènes PAG et peut-être dans l'activation des gènes PRG (Kato *et al.* 1999).

Des régulateurs spécifiques tels que IscR, qui régule l'état des clusters fer-soufre (Lemire *et al.* 2013) ont également été identifiés. Enfin, de petits ARN régulateurs impliqués dans la régulation du fer ont également été identifiés récemment (Waldron and Robinson 2009; Oglesby-Sherrouse and Murphy 2013) (Figure 7).



<u>Figure 7:</u> Senseurs de métaux chez *Escherichia coli* (Waldron and Robinson 2009)

Afin de réguler les taux de métaux dans la bactérie, *E. coli* possède différents régulateurs. Les flèches indiquent le mode d'action des régulateurs : flèche pointant vers l'ADN, co-répression ; flèche partant de l'ADN, dé-répression ; autour de l'ADN (twist), changement conformationel. La couleur de la protéine indique la famille du régulateur : MerR (bleu), ArsR-SmtB (rose), Fur (rouge), Régulateur à deux composés (bleu ciel), DtxR (vert), CsoR-RcnR (orange), NikR (gris) et ModE (violet). RyhB est un ARN régulateur sous le contrôle de Fur. *K* indique l'affinité pour le métal.

Quel que soit le métal (essentiel ou non), la bactérie a dû trouver un moyen de réguler finement sa concentration intracellulaire afin de trouver le bon équilibre entre besoin et toxicité.

Chapitre 3

Le Fer et *Pseudomonas aeruginosa*

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'ensemble des métaux biologiques, mais une attention plus particulière a été apportée au fer. Le fer, 4ème élément le plus abondant sur la croûte terrestre, peut exister sous forme réduite (Fe^{2+}, fer ferreux) et sous forme oxydée (Fe^{3+}, fer ferrique). A pH physiologique et en conditions oxydantes le fer ferrique prédomine. Cette forme est peu soluble, elle précipite et devient ainsi très faiblement biodisponible avec une concentration de fer libre d'environ 10^{-9} M en solution. Malgré sa faible biodisponibilité en conditions aérobies, le fer est un élément essentiel à la vie pour la quasi-totalité des organismes. Ce rôle essentiel dans les mécanismes biologiques a son origine dans (i) la grande biodisponibilité de ce métal aux premiers stades de l'évolution de la vie (avant l'apparition de la photosynthèse), (ii) sa capacité à lier des ligands dans différentes orientations et (iii) sa capacité à transférer des électrons. Par exemple, le fer est impliqué dans le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire, il est un cofacteur des enzymes impliquées dans la synthèse, la transcription et la réparation de l'ADN, il est également nécessaire dans la phosphorylation oxydative, le transport et le stockage de l'oxygène et la photosynthèse. Au vu de l'importance du fer dans les processus biologiques, les micro-organismes ont besoin de ce nutriment précieux peu importe les conditions de croissance. Les sources de fer accessible aux micro-organismes sont variées, allant du fer cristallin jusqu'au fer complexé à des biomolécules.

Bien qu'essentiel, le fer peut être toxique à de fortes concentrations. En effet, le fer peut engendrer des radicaux libres *via* la réaction de Fenton. En effet, le Fe(II) peut produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux d'hydroxyle (*OH) hautement mutagènes. Pour cela, la bactérie doit d'une part contrôler constamment la concentration de fer intracellulaire et d'autre part éviter le fer libre dans la bactérie en le liant à des protéines de stockage (Cornelis *et al.* 2011).

Les sources de fer

1.1 Le fer minéral

La dégradation de la roche mère est à l'origine des minéraux dans les sols. Les processus d'altération des minéraux primaires, aussi appelée pédogenèse, forment les minéraux secondaires, accessibles aux micro-organismes (Bockheim and Gennadiyev 2000). Les minéraux secondaires sont constitués essentiellement des argiles, des oxy- hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, des carbonates, des sulfates, des sulfures, des chlorures et des phosphates.

Les argiles sont des composés naturels sous forme de grains de l'ordre du micromètre caractérisés par des propriétés spécifiques : surface et structure spécifiques, capacité d'absorption de l'eau et de gonflement et multiples possibilités d'échanges ioniques (capacité à lier des cations tels que le fer) (Bailey 1980). Les oxy-hydroxydes de fer peuvent préexister sous forme amorphe et cristalline et constituent de par leur structure une source de fer plus accessible aux micro-

organismes. Enfin, les carbonates ($R^{2+}CO_3^{2-}$), les sulfates ($R^{2+}SO_4^{2-}$), les sulfures ($R^{2+}S^{2-}$), les chlorures ($R^{2+}2Cl^-$) et les phosphates ($R^{2+}HPO_4^{2-}$) représentent la source de fer minéral la plus bioaccessible dans les sols. (R^{2+} : ion métallique tels que les ions Ca, Mg, Fe, Pb, Zn, Cu).

1.2 Le fer libre

Par le fait que le fer précipite sous forme d'hydroxyde ferrique en conditions oxydatives et à pH neutre, le fer ferrique libre et soluble reste une source très restreinte ; sa concentration dans les milieux aqueux tels les océans, varie entre 0,2 et 2 nM. Ce fer (III) libre et soluble provient essentiellement de la solubilisation des minéraux secondaires et des poussières (Conway and John 2014). En revanche, le fer ferreux est plus soluble et peut être plus facilement incorporé par les micro-organismes (Weber *et al.* 2006).

1.3 Les sources de fer chez l'hôte

Lors d'une infection d'un mammifère par un micro-organisme, une rude bataille autour du fer se déclenche. Les sources de fer disponible chez l'hôte sont variées et les bactéries ont donc dû développer des systèmes d'acquisition efficaces pouvant concurrencer les systèmes de l'hôte pour l'acquisition du fer (Figure 21).

1.4 L'hème et les hémoprotéines

L'hème est une biomolécule de 616 Da qui associe une protoporphyrine et un atome de fer (Fe^{2+}) (Figure 8). Approximativement 70 % du fer dans le corps humain est lié à l'hème. Ce dernier peut être synthétisé dans la plupart des cellules mais est principalement présent dans les érythrocytes et hépatocytes (Hamza and Dailey 2012). L'hème est une molécule essentielle, mais à forte concentration elle peut être cytotoxique, c'est pour cela que 95 % de l'hème est lié à des hémoprotéines.

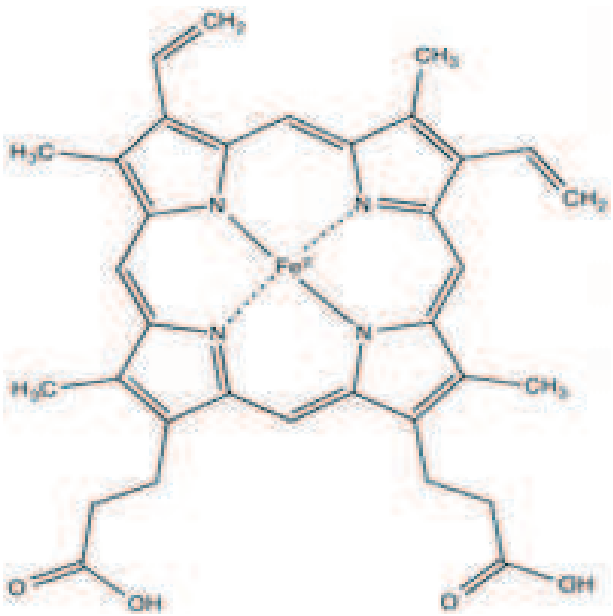


Figure 8 : Hème en complexe avec un atome de fer ferreux

- **L'hémoglobine**

La majeure partie de l'hème est associée à l'hémoglobine qui est principalement présente dans les érythrocytes. L'hémoglobine joue un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène depuis les poumons vers les tissus et dans l'évacuation du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons. Ce tétramère de 80 kDa peut lier quatre molécules d'hème avec une affinité de l'ordre de 10^{-15} M (Genco and Dixon 2001). L'hémoglobine peut préexister sous trois formes différentes : la methémoglobine (hème-Fe^{3+}) (forme incapable de transporter l'oxygène,
1-2 %), la désoxyhémoglobine (hème-Fe^{2+}) et l'oxyhémoglobine (hème-Fe^{2+}-O_2).

- L'hémopexine

L'hémopexine est une glycoprotéine d'environ 60 kDa avec une haute affinité pour l'hème (10^{-13} M). Cette protéine est présente dans le plasma afin de prendre directement en charge l'hème libéré suite à la lyse des érythrocytes. L'hémopexine a donc un rôle protecteur contre le stress oxydatif. Une fois en complexe avec l'hème, le duo hémopexine-hème est dirigé vers le foie pour y être recyclé (Wandersman and Delepelaire 2004).

- L'haptoglobine

L'haptoglobine est une glycoprotéine de 86 kDa assemblée en dimère liant l'hémoglobine libérée lors de l'hémolyse avec une affinité de l'ordre de 10^{-12} M (Andersen *et al.* 2012).

- L'albumine

Représentant la protéine la plus abondante dans le sérum (60 % des protéines), l'albumine est une protéine globulaire monomérique de 68 kDa. Elle peut lier l'hème avec une affinité de
10^{-8} M (Hrkal and Klementova 1984).

- Les autres hémoprotéines

Les hémoprotéines jouent un rôle important chez les mammifères et chez les plantes ; il en existe un grand nombre comme certaines peroxidases, le cytochrome b, la myoglobine, la cytoglobine ou la neuroglobine.

1.5 Les protéines non hémiques

Seulement environ 3 % du fer humain est lié à des protéines n'utilisant pas l'hème, telles que la transferrine et la lactoferrine (Winter *et al.* 2014). Néanmoins, même ces faibles ressources de fer sont exploitées par les micro-organismes afin de subvenir à leurs besoins en fer.

- La transferrine

La transferrine est une glycoprotéine de 76 kDa présente principalement dans le sérum. (Winter *et al.* 2014). Chaque molécule de transferrine lie deux atomes de fer et est responsable du transport du fer depuis l'intestin vers les organes de l'hôte (Drakesmith and Prentice 2008).

- La lactoferrine

La lactoferrine est une glycoprotéine de 80 kDa appartenant à la famille de la transferrine liant le fer non hémique. C'est une protéine qui se trouve dans la lymphe et les muqueuses, avec un rôle important dans la première ligne de défense de l'hôte contre les infections (Ward *et al.* 2002). En effet, des actions antivirales, antifongiques et antibactériennes ont été identifiées dans différents endroits du corps humain comme la peau, dans la sueur, dans la salive ou encore dans les muqueuses intestinales (Farnaud and Evans 2003; Artym 2010; Park *et al.* 2011).

- Les ferritines

Les ferritines sont des protéines de stockage du fer existant chez l'ensemble des organismes utilisant le fer. Chez les bactéries, les ferritines ou bactérioferritines sont également capables de lier l'hème et de stocker ainsi le fer (Laghaei *et al.* 2014). Les ferritines de l'hôte sont responsable du stockage du fer dans les tissus et peuvent lier le fer en cas de surcharge, ayant ainsi un rôle antioxydant (Cohen-Solal *et al.* 2014). Les ferritines et bactérioferritines sont capables de lier jusqu'à 4 500 atomes de fer par molécule. Chez l'homme, 25 % du fer est lié à des protéines de stockage du fer ce qui représente une réserve de fer non fonctionnel (Winter *et al.* 2014).

- **Les autres sources de fer chez l'hôte**

La concentration de fer libre est estimée à environ 10^{-18} M en raison de sa faible solubilité. Chez l'hôte, le fer est essentiellement lié à des protéines séquestrant le fer comme l'hème, la lactoferrine, la transferrine ou les ferritines (25 % est stocké dans des ferritines ou d'autres protéines de stockage (Winter *et al.* 2014)). De ce fait, la concentration en fer libre dans les fluides de l'organisme de l'hôte, biodisponible pour un pathogène durant l'infection est estimée à environ 10^{-18} M.

Le citrate est un métabolite du cycle de Krebs produit par la citratase pouvant chélater le fer ferrique avec une stoechiométrie 2:1 et représente une ressource de fer non négligeable pour les micro-organismes.

2. L'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries Gram négatives

Vu l'importance du fer et sa faible biodisponibilité en conditions oxydantes, (allant de 10^{-9} M jusqu'à 10^{-18} M chez l'hôte), les micro-organismes ont dû trouver un moyen efficace pour subvenir à leurs besoins en fer, (concentration de 10^{-6} M nécessaire pour une croissance optimale). Les bactéries (Schalk and Guillon 2013) et d'autres organismes tels que certaines plantes (Higuchi *et al.* 2014) et certains champignons (Ecker *et al.* 1982) ont développé un moyen très efficace afin de subvenir à leurs besoins en fer dans toutes les conditions qu'elles rencontrent. Cette stratégie consiste à synthétiser et sécréter de petites molécules organiques (PM < 2 500 Da) appelées sidérophores. Ces composés sont synthétisés à l'intérieur des cellules bactériennes et sécrétés dans l'environnement de la bactérie où ils vont chélater le fer. Les sidérophores sont capables de chélater le fer (III) avec une très forte affinité pouvant aller jusqu'à 10^{42} M^{-1} pour l'entérobactine par exemple (Loomis and Raymond 1991). En revanche, l'affinité des sidérophores pour le fer (II) est nettement plus faible. Il a également été démontré que les sidérophores peuvent chélater d'autres métaux que le fer. En effet, la pyoverdine par exemple peut chélater des métaux tels que Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Fe, Ga, Hg, Mn, Pb, Sn, Tb, Tl, Ni et Zn (Braud *et al.* 2009; Schalk *et al.* 2011; Hannauer *et al.* 2012).

Plus de 500 sidérophores de structures chimiques différentes ont été identifiés à ce jour (Hider and Kong 2010). Les sidérophores ont été classés en quatre groupes selon les fonctions chélatrices : les sidérophores à groupements catécholate, phénolate, carboxylate, hydroxamate et se rajoutent les sidérophores mixed (possédant plusieurs groupements) (Figure 9A). Étant donné que le fer forme préférentiellement un complexe hexacoordiné, certains sidérophores possèdent trois dentates pour la coordination du métal. Lorsque les sidérophores n'ont que deux ou un dentate, ils chélatent le fer avec une stoechiométrie de deux ou trois sidérophores pour un ion ferrique.

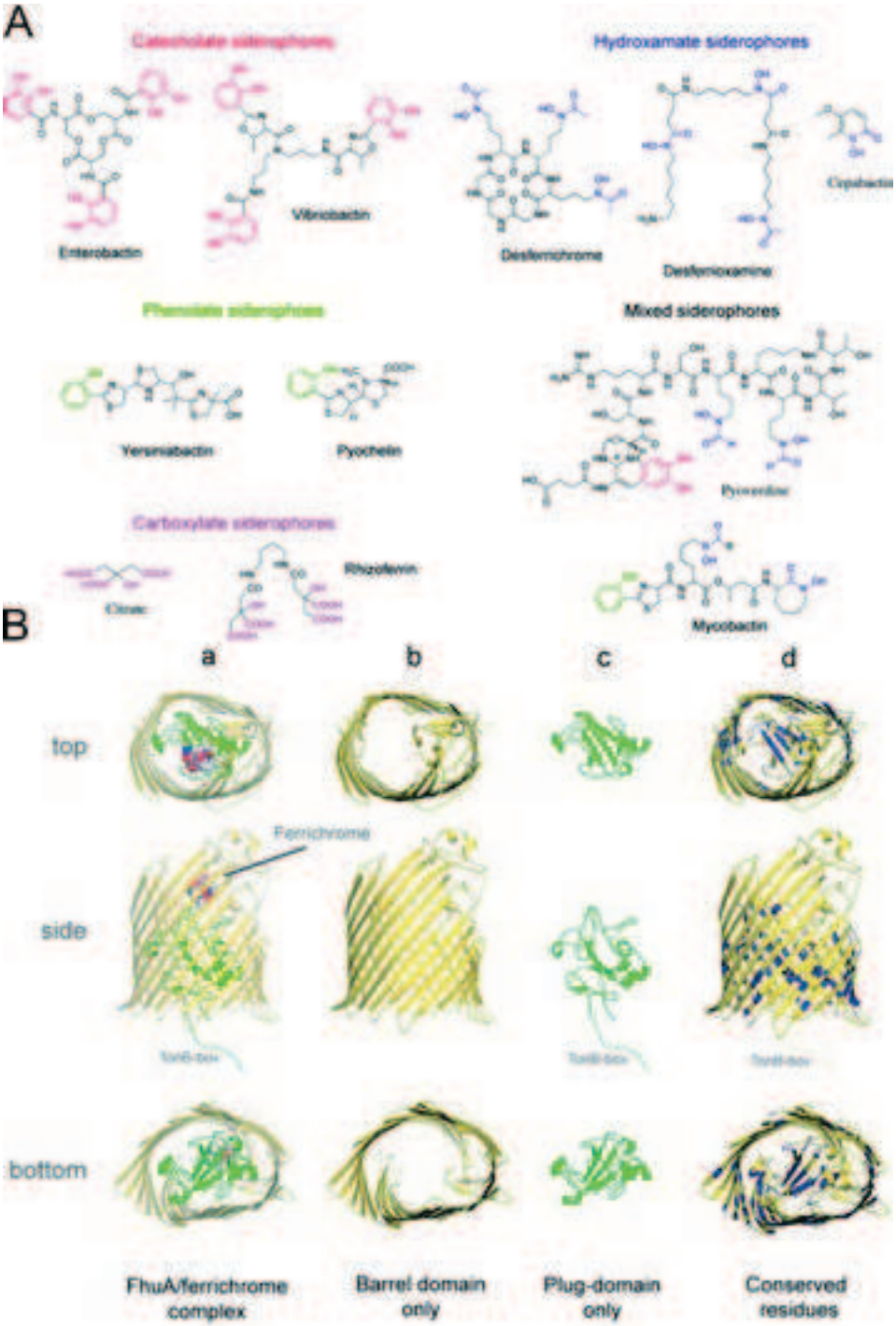


Figure 9 : Exemples de sidérophores et structure générale de leurs transporteurs de membrane externe (Noinaj *et al.* 2010; Schalk and Guillon 2013).

(A) Les sidérophores sont variés et peuvent avoir soit un type de groupement chélateur soit un mix de groupements. Les fonctions chélatrices sont en couleur sur chaque sidérophore. (B) Structure de FhuA avec son ligand ferrichrome.

Les sidérophores sont généralement synthétisés dans la cellule bactérienne par voie enzymatique, puis excrétés dans l'environnement du micro-organisme par des transporteurs ABC ou des pompes à efflux. Après chélation du fer, le complexe sidérophore-fer est ensuite reconnu à la surface de la bactérie par des transporteurs TonB-dépendant (TBDT) enchâssés dans la membrane

externe, qui ont tous la même structure générale. Ces TBDT sont composés en C-terminal d'un large tonneau β (22 brins β antiparallèles) permettant l'insertion dans la membrane, d'un bouchon (domaine globulaire formé de 4 feuillets β) qui obture le pore du tonneau, d'une région de cinq ou six résidus appelés boîte TonB et pour certains d'un domaine de signalisation en N-terminal interagissant avec un régulateur sigma (Noinaj *et al.* 2010; Schalk *et al.* 2012). Le site de liaison du sidérophore-ferrique se trouve sur la partie extracellulaire du transporteur et est composé de résidus appartenant au bouchon et au tonneau (Cornelis and Bodilis 2009; Schalk *et al.* 2012) (Figure 9B).

Ces TBDTs ont la particularité d'effectuer un transport énergie-dépendant. En effet, les TBDTs localisés dans la membrane externe sont activés par un complexe protéique localisé dans la membrane interne et appelé la machinerie TonB, qui est elle-même activée par le gradient de protons de la membrane interne (Sauter *et al.* 2003). La machinerie TonB est composée de trois protéines : TonB, ExbB et ExbD (Sauter *et al.* 2003). Elle interagirait avec une stoechiométrie de 2 TonB, 4 ExbB et 14 ExbD et est localisée dans la membrane interne (Sauter *et al.* 2003). Cette machinerie *via* une interaction avec la boîte TonB du transporteur, fournit à ce dernier l'énergie nécessaire pour la translocation du complexe sidérophore-fer à travers la membrane externe (Cornelis *et al.* 2009; Llamas *et al.* 2014). Le mécanisme moléculaire impliqué dans ce transfert d'énergie de la membrane interne à une protéine de membrane externe reste encore méconnu, mais il a été suggéré que grâce au gradient de protons la protéine TonB subirait un changement de conformation lui permettant d'interagir avec la boîte TonB du transporteur permettant ainsi la formation d'un canal dans le transporteur (Ferguson and Deisenhofer 2004). Le mécanisme de formation de ce canal reste également méconnu. Il a été proposé qu'il y aurait un basculement du bouchon vers le périplasme ou un déroulement plus ou moins total du bouchon dans le périplasme (Chakraborty *et al.* 2007). Chez *P. aeruginosa*, trois protéines TonB ont été identifiées, TonB1, TonB2 et TonB3. Seul TonB1 serait impliqué dans le transport du fer *via* les sidérophores pyoverdine et pyochéline (Zhao and Poole 2002; Adams *et al.* 2006; Shirley and Lamont 2009).

Ces TBDTs sont hautement spécifiques d'un sidérophore donné. Lorsqu'une bactérie utilise plusieurs sidérophores, elle a dans son génome des gènes codant pour des TBDTs spécifiques pour chaque sidérophore. *P. aeruginosa* a dans son gènome 32 gènes codant pour des TBTDs (Llamas *et al.* 2009). D'après des études protéomiques (Llamas *et al.* 2006) 11 de ces TBDTs seraient impliqués dans l'acquisition du fer.

Arrivé dans le périplasme, le complexe sidérophore-Fe est, en général, pris en charge par des protéines périplasmiques associées à des transporteurs ABC. Ces protéines permettent l'acheminement du complexe vers les transporteurs ABC enchassés dans la membrane interne pour le transport des complexes vers le cytoplasme. Pour la dissociation du fer des sidérophores, trois mécanismes ont été proposés chez les bactéries Gram négatives: l'hydrolyse du sidérophore, la

réduction du fer ou une modification chimique du sidérophore. Tous auraient pour but de diminuer l'affinité du sidérophore pour le fer. Dans le cas de l'entérobactine, un sidérophore produit par *E. coli* et un archétype dans le domaine des sidérophores, le mécanisme de dissociation du fer de ce sidérophore implique une hydrolyse du chélateur couplée à une réduction du fer ferrique en fer ferreux (Brickman and McIntosh 1992). Les produits de dégradation sont ensuite sécrétés vers le milieu extracellulaire (Figure 10 A gauche). Ce mécanisme d'assimilation du fer par les sidérophores que nous venons de décrire ci-dessus est valable pour tous les sidérophores utilisés par *E. coli* et par de nombreuses bactéries Gram négatives. Il y a pourtant des divergences dans ces mécanismes avec par exemple le cas de la salmochéline, sidérophore de *Salmonella*. Pour cette voie, il a été proposé que le complexe sidérophore-fer subit déjà une première hydrolyse dans le périplasme avant le transport à travers la membrane interne. Le fer serait ensuite libéré dans le cytoplasme par un mécanisme impliquant une hydrolyse totale du sidérophore et une réduction du fer (Lin *et al.* 2005; Zhu *et al.* 2005). Ici encore les produits de dégradation sont sécrétés dans le milieu extracellulaire (Figure 10 A droite) (Brickman and McIntosh 1992; Zhu *et al.* 2005; Schalk and Guillon 2013). De même dans le cas de la pyoverdine, un mécanisme complètement différent a été mis en évidence avec une dissociation du fer de son sidérophore dans le périplamse bactérien (voir page 46 pour plus de détails) (Figure 10 B).

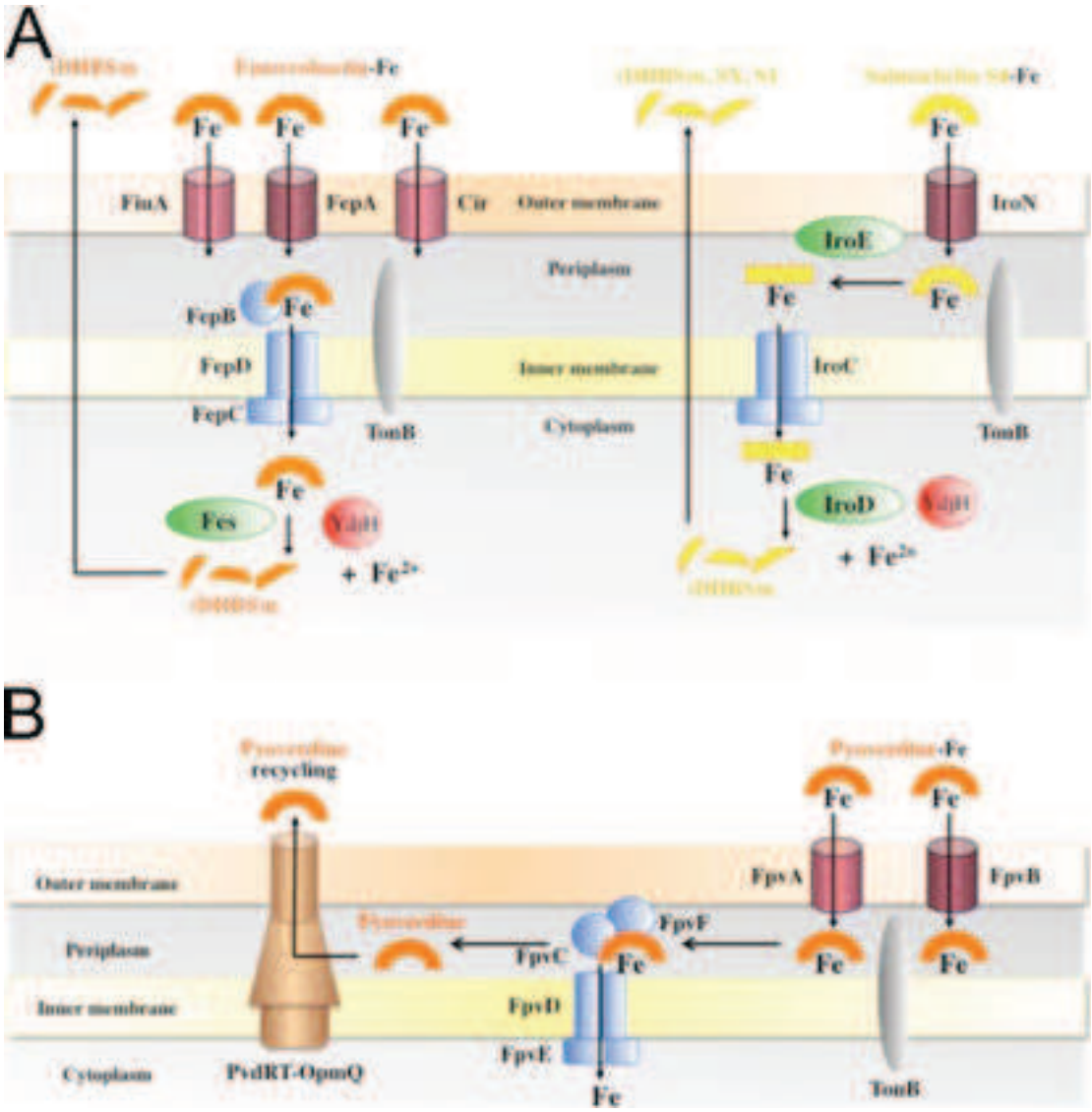


Figure 10 : Exemples de voie d'acquisition de fer *via* des sidérophores (Schalk and Guillon 2013).

Les sidérophores sont synthétisés et excrétés dans le milieu extracellulaire puis chélatent le fer. Le complexe sidérophore-fer ainsi formé est reconnu et transporté par des transporteurs TBDT et entre dans le périplasme. Le complexe passe soit (A) entièrement la membrane interne pour une dissociation dans le cytoplasme soit (B) la dissociation se fait dans le périplasme, le sidérophore est ré-excrété dans le milieu extracellulaire et le fer est transporté dans le cytoplasme. Pour plus de détail voir le texte.

Les bactéries synthétisent et utilisent des sidérophores endogènes, mais elles possèdent aussi des systèmes d'acquisition du fer *via* des sidérophores exogènes, produits par d'autres organismes et se trouvant dans l'environnement de la bactérie. En effet, une grande partie des bactéries possèdent plus de systèmes d'acquisition de sidérophores exogènes qu'endogènes (Schubert *et al.* 1999; Cornelis and Dingemans 2013). *P. aeruginosa* par exemple, produit deux sidérophores endogènes, mais il a été rapporté que cette bactérie peut utiliser au moins neuf sidérophores exogènes (voir page 54). Cette stratégie de « siderophore piracy » n'est pas seulement réduite aux

bactéries, mais il existe également des bactéries pouvant utiliser des sidérophores produits par des champignons (Traxler *et al.* 2012).

3. L'acquisition du fer par les sidérophores chez *P. aeruginosa*

Contrairement aux systèmes d'acquisition des autres métaux, les systèmes d'acquisition du fer ont été largement étudiés. Afin de subvenir à ses besoins en fer, *P. aeruginosa* sécrète deux sidérophores ; la pyoverdine et la pyochéline et est également capable d'utiliser des sidérophores exogènes (sidérophores produits par d'autres micro-organismes). De plus, *P. aeruginosa* possède de nombreuses autres voies d'acquisition du fer telles que l'acquisition du fer ferreux, l'acquisition du fer stocké dans l'hème, l'acquisition du citrate ferrique et probablement d'autres voies pas encore identifiées.

3.1 La pyoverdine (PVDI)

Les pyoverdines (PVD) forment une grande famille de sidérophores produits par les *Pseudomonas* fluorescents. Les PVDs sont des chélateurs à forte affinité pour le fer avec comme groupement chélateur un catéchol et deux hydroxamates. Leur implication dans l'acquisition du fer a été mise en évidence il y a une quarantaine d'années (Meyer and Abdallah 1978; Meyer and Hornspreger 1978). De nos jours, plus de 60 analogues de PVDs ont été identifiés chez plusieurs souches du genre *Pseudomonas* (Meyer *et al.* 2008). Les PVDs sont toutes composées de trois parties :

- un chromophore dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline), responsable de la couleur vert-jaune et de la fluorescence de la molécule ;
- une chaîne peptidique, de séquence et de taille (de 6 à 12 acides aminés) variables selon la souche productrice, ancrée en position C1 du chromophore ;
- une chaîne latérale en position C3 du chromophore, composée pour la plupart des cas d'un diacide carboxylique ou de son amide correspondante.

P. aeruginosa, selon les souches, produit trois PVD qui diffèrent au niveau de la séquence de leur chaîne peptidique (Schalk and Guillon 2013). A chaque PVD est associé un TBDT spécifique (Cornelis *et al.* 1989). La PVD produite par *P. aeruginosa* PAO1 est PVDI (Figure 11) et son transporteur spécifique FpvAI.

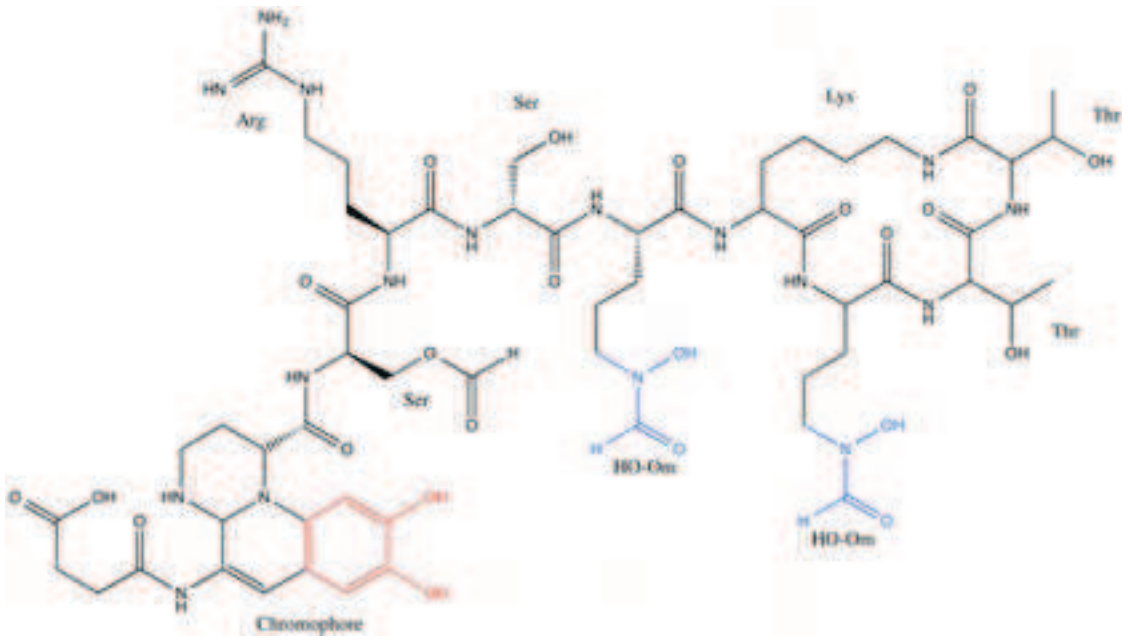


Figure 11 : Structure de la pyoverdine I

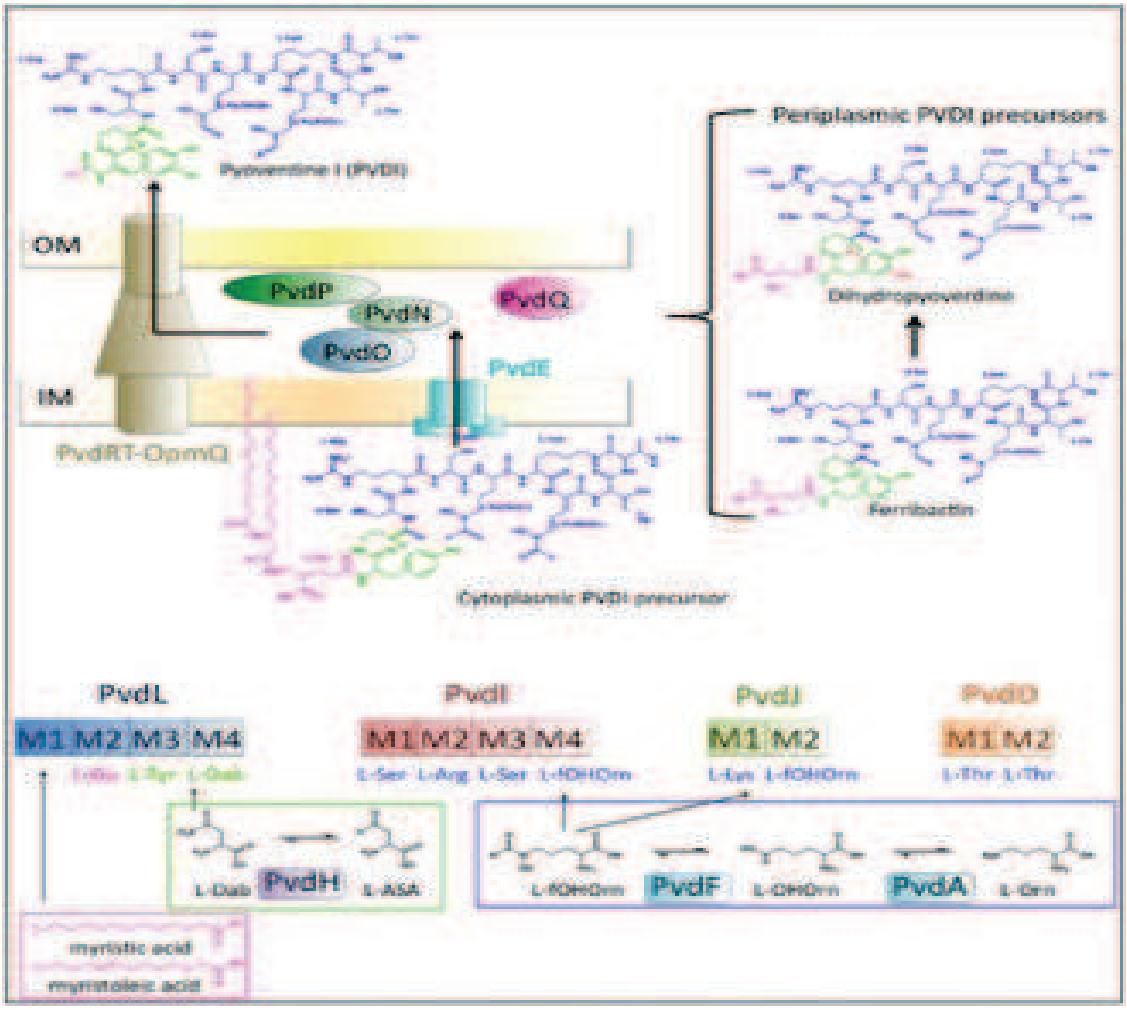
La pyoverdine I est composée d'un chromophore couplé à une chaîne peptidique et à une chaîne latérale. En rouge est représenté le catéchol du chromophore qui intervient dans la chélation du fer. En bleu sont représentés les groupements hyrdoxamates qui interviennent également dans la chélation du fer.

La biosynthèse de la PVDI

La biosynthèse de la PVDI se fait en une multitude d'étapes et dans deux compartiments de la bactérie. En effet, la biosynthèse est initiée dans le cytoplasme et requiert sept enzymes, dont quatre NRPSs (Non-Ribosomal Peptide Synthethase), et se finit dans le périplasme où le sidérophore subit une maturation faisant intervenir cinq autres enzymes (Schalk and Guillon 2013) (Figure 12).

Il a été suggéré que la biosynthèse de la PVDI s'initie par la NRPS PvdL (seule NRPS de biosynthèse de la PVDI commune à tous les génomes de *Pseudomonas*) (Ravel and Cornelis 2003; Gross and Loper 2009). Cette dernière comporte quatre modules ; le premier module est capable de lier une chaîne myristique ou myristoléique à l'aide du couplage avec le coenzyme A (Mossialos *et al.* 2002). Aucune PVD identifiée de nos jours ne possède de chaîne grasse, signifiant que celle-ci doit être hydrolysée au cours de la biosynthèse. PvdL intègre ensuite trois acides aminés (L-Glu, L-Tyr et L-Dab) à cette chaîne (Mossialos *et al.* 2002; Drake and Gulick 2011). Le L-Dab, acide aminé non naturel, est synthétisé par PvdH et présenté au quatrième module de PvdL (Vandenende *et al.* 2004). L-Tyr et L-Dab vont former la structure du chromophore, qui à ce stade n'est pas encore cyclisé et donc non fluorescent. Le précurseur est ensuite transmis aux NRPS suivantes PvdI, PvdJ et PvdD qui intègrent la chaîne peptidique. PvdI, possédant quatre modules également, intègre dans l'ordre les acides aminés L-Ser, L-Arg, L-Ser et L-fOHOrn. PvdJ, NRPS à deux modules, intègre une L-Lys et une L-fOHOrn. Les deux acides aminés L-fOHOrn utilisés par PVDI

et PvdJ sont synthétisés par PvdA et PvdL (McMorran *et al.* 2001; Meneely *et al.* 2009). Finalement PvdD, NRPS à deux modules, intègre deux L-Thr et libère le précurseur qui est transporté dans le périplasme *via* le transporteur PvdE (Ackerley *et al.* 2003; Schalk and Guillon 2013). Le précurseur formé au cours de la biosynthèse dans le cytoplasme a été isolé et sa structure chimique a été déterminée (Hannauer *et al.* 2012). Il possède encore la chaîne grasse attachée au premier acide aminé (Glu) en N-terminal et le chromophore n'est pas cyclisé. C'est d'ailleurs cette structure qui a permis de démontrer que le précurseur cytoplasmique de la PVD possédait une chaîne grasse liée au premier résidu et que ce groupement est très probablement présent depuis le début de l'assemblage du sidérophore. Il a été suggéré que la chaîne grasse permet au précurseur d'être associé à la membrane interne durant sa synthèse. De plus, au début de ma thèse, des expériences de marquage fluorescent d'une enzyme de biosynthèse, PvdA, ont montré que cette enzyme est associée partiellement à la membrane interne et est concentrée aux pôles de la bactérie (Imperi *et al.* 2008; Guillon *et al.* 2012) (Figure 13 A). Plus récemment et en utilisant la même approche, notre laboratoire ainsi qu'une autre équipe ont montré que d'autres enzymes de biosynthèse sont également partiellement associées à la membrane interne, le tout formant un sidérosome (Imperi and Visca 2013). Un sidérosome serait un complexe multi-protéique, contenant toutes les enzymes de biosynthèse du sidérophore associé à la membrane interne. De plus, il a été observé que ces sidérosomes sont concentrés plutôt aux pôles de la bactérie. Cette association à la membrane des enzymes de biosynthèse des sidérophores aurait pour but d'une part de limiter la diffusion des précurseurs du sidérophore dans le cytoplasme et d'augmenter ainsi la productivité d'autre part. Ce type d'organisation permet aussi de limiter la chélation de fer dans le cytoplasme par ces précurseurs de sidérophores, ce qui pourrait être toxique pour la bactérie (Schalk and Guillon 2013).



<u>Figure 12 :</u> Schéma de la biosynthèse de la pyoverdine selon (Schalk and Guillon 2013).

La biosynthèse de la PVDI fait intervenir quatre NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) ainsi que trois autres enzymes dans le cytoplasme (PvdA, PvdF et PvdH). Le précurseur formé dans le cytoplasme est transporté dans le périplasme par le transporteur ABC PvdE pour être maturé par les enzymes PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ puis excrété par la pompe PvdRT-OpmQ.

Une fois dans le périplasme, le précurseur de la PVDI est maturée grâce à cinq enzymes, PvdM, PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ (Figure 12). Lors de la maturation, la chaîne myristique ou myristoléique est coupée par l'action de PvdQ (Yeterian *et al.* 2010; Drake and Gulick 2011). En effet, il a été démontré que cette enzyme, de la famille des NTN hydrolases, est capable de cliver la chaîne grasse du précurseur de la PVDI (Bokhove *et al.* 2010; Schalk *et al.* 2011). PvdP, une tyrosinase, est impliquée dans la maturation du chromophore du précurseur de la PVD (Nadal-Jimenez *et al.* 2014). Les rôles exacts des enzymes PvdM, PvdN et PvdO n'ont pas clairement été identifiés. Ils interviendraient probablement dans la cyclisation du chromophore ou dans des étapes précédant cette dernière, car la délétion de ces mutants entraine la formation d'un sidérophore non fluorescent (Voulhoux *et al.* 2006; Yeterian *et al.* 2010).

En ce qui concerne la distribution des enzymes de maturation, des expériences de marquage fluorescent ont montré que PvdQ est distribué de façon homogène dans le périplasme (Guillon *et al.* 2012) (Figure 13 B). Ceci suggère qu'aucune organisation précise n'est requise pour la maturation de la pyoverdine (Schalk and Guillon 2013) dans ce compartiment cellulaire. De même, les images de microscopie de fluorescence montrent que la PVDI nouvellement synthétisée se concentre et se répartit dans tout le périplasme de *P. aeruginosa* (Yeterian *et al.* 2010). Une fois la PVDI synthétisée, elle est exportée vers le milieu extracellulaire afin de chélater le fer se trouvant dans l'environnement de la bactérie et de subvenir au besoin de la bactérie.

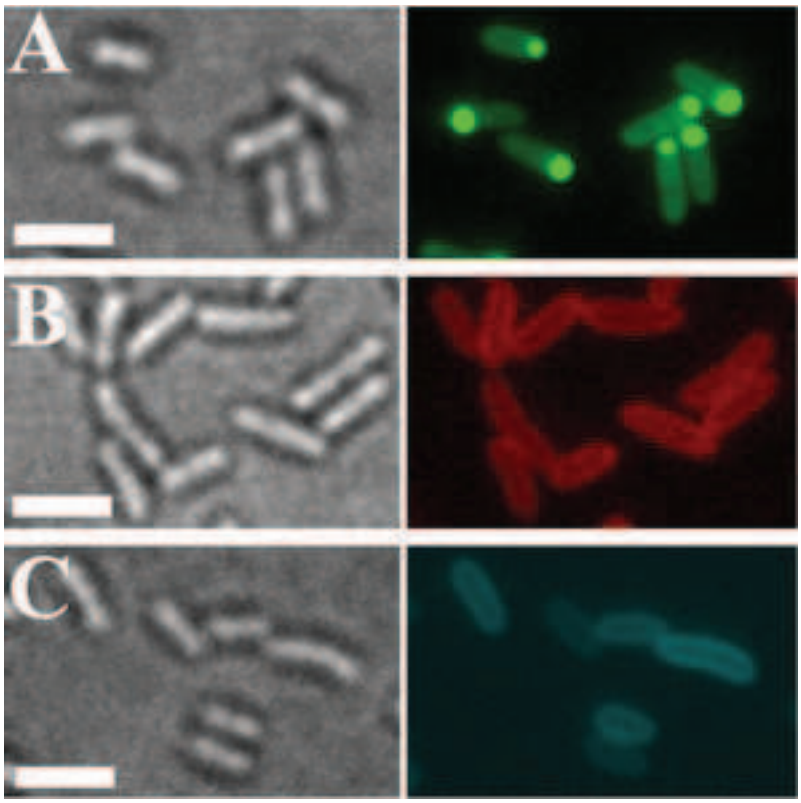


Figure 13 : Localisation de protéines impliquées dans la biosynthèse de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* selon (Schalk and Guillon 2013)

Images de microscopie à épifluorescence des souches *pvdAeyfp* (souche avec un tag eYFP en C-terminal) (A) *pvdQmcherry* (souche avec un tag emCHERRY en C-terminal) (B) et de pyoverdine périplasmique (C). Les images de gauche correspondent à des images en fond blanc et celles de droite à des images de fluorescence YFP (A), mcherry (B) et PVDI (C). L'échelle est de 2 µm.

La sécrétion de PVDI

Le mécanisme d'export de la PVDI néo-synthétisée a longuement été controversé. Le locus de la PVDI contient trois gènes, *pvdRT-opmQ*, codant pour une pompe à efflux. Des études récentes ont pu prouver l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la PVDI néosynthétisée (Hannauer *et al.* 2010). En effet, la délétion de la pompe à efflux et la délétion des transporteurs de membrane externe FpvA et FpvB ont eu pour conséquence une diminution de 30 %

de la production de PVDI et une accumulation de cette dernière dans le périplasme (Figure 13 C). L'absence d'inhibition totale pour la sécrétion de PVDI indique qu'au moins un autre système d'export peut prendre le relais (Hannauer *et al.* 2010; Schalk and Guillon 2013).

L'import du complexe PVDI-fer

Une fois sécrétée dans le milieu extracellulaire, la PVDI chélate le fer(III) ambiant avec une affinité de 10^{31} M^{-1} (Albrecht-Gary *et al.* 1994). Le complexe PVDI-fer est ensuite reconnu par un des deux transporteurs TonB dépendant FpvA ou FpvB. Le transporteur FpvA, qui est le transporteur majoritairement exprimé, est constitué comme tous les TBDTs d'un large tonneau β (22 brins β antiparallèles reliés entre eux par de grandes boucles extracellulaires et des coudes périplasmiques), un bouchon (domaine globulaire formé par 4 feuillets β), la boîte TonB (partie qui permet l'interaction avec le complexe TonB/ExbB/ExbD) et un domaine de signalisation interagissant avec le régulateur sigma FpvR localisé dans la membrane interne (Cobessi *et al.* 2005; Brillet *et al.* 2007). Le site de liaison de la PVDI est localisé du coté extracellulaire de FpvA et est composé d'acides aminés essentiellement hydrophobes appartenant au bouchon et au tonneau. La liaison se fait avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Schalk *et al.* 2001; Clement *et al.* 2004) et est très spécifique. En effet, seule la PVDI est reconnue par ce transporteur (Greenwald *et al.* 2009) et non les deux autres PVD produites par les autres espèces de *P. aeruginosa*. La liaison du complexe PVDI-fer sur le transporteur et l'interaction de FpvA *via* sa TonB box avec la machinerie TonB induit un changement de conformation dans le transporteur permettant la formation d'un canal ; le complexe est ainsi transporté dans le périplasme (Greenwald *et al.* 2009; Schalk *et al.* 2012).

Il a été montré que la PVDI peut chélater d'autres métaux que le fer avec des affinités plus faibles. Au laboratoire, nous avons montré que la PVDI peut chélater les métaux suivants: Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Fe, Ga, Hg, Mn, Pb, Sn, Tb, Tl, Ni et Zn. En revanche, seuls les complexes avec les métaux Ag, Al, Cd, Co, Cu, Fe, Ga, Hg, Mn, Ni et Zn se lient sur le récepteur FpvAI, montrant que ce transporteur peut reconnaître la PVDI en complexe avec de nombreux autres métaux que le fer (Hannauer *et al.* 2012), ces complexes sont tous transportés à travers la membrane externe vers le périplasme par FpvA (Hannauer *et al.* 2012).

La dissociation et le recyclage

Lorsque que le complexe PVDI-fer est entré dans le périplasme, il est pris en charge par les deux protéines de liaison périplasmique FpvC et FpvF associées au transporteur ABC FpvDE (Brillet *et al.* 2012). Le complexe PVDI-fer est ensuite dissocié par réduction du Fe(III) en Fe(II) (Greenwald *et al.* 2007) dans le périplasme et non dans le cytoplasme comme pour les autres voies d'acquisition du fer par les sidérophores chez *E. coli*. Les protéines impliquées dans la réduction du

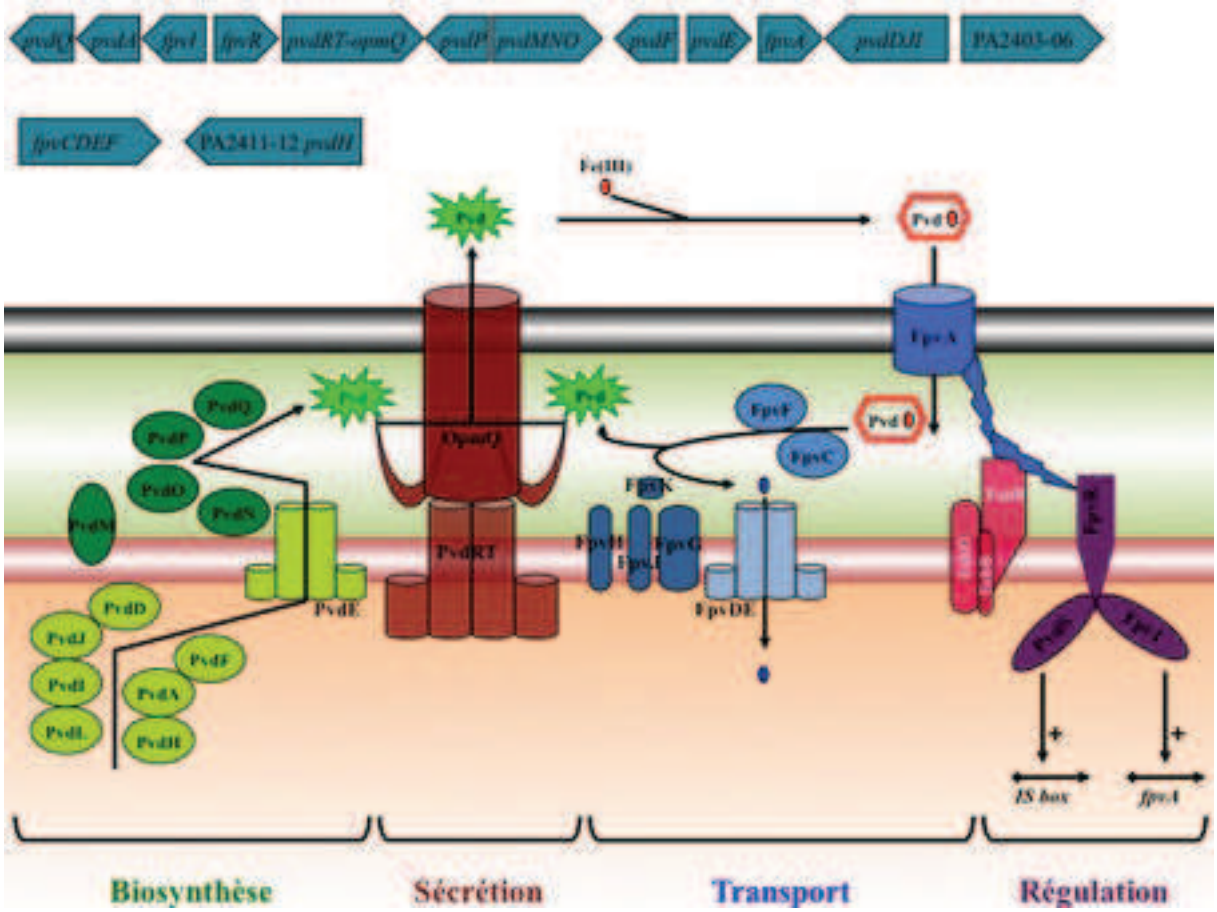
fer n'ont pas encore été identifiées à ce jour, mais cette réduction du fer intervient probablement lorsque la PVDI ferrique est en interaction avec les deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF (Brillet *et al.* 2012). Ce mécanisme n'implique aucune modification chimique ou hydrolyse de la PVDI (Greenwald *et al.* 2007). Le Fe(II) ainsi libéré et probablement encore en complexe avec FpvC est amené au transporteur ABC FpvDE, qui transporte le fer vers le cytoplasme (Brillet *et al.* 2012). L'apo-pyoverdine en complexe probablement avec FpvF (Brillet *et al.* 2012) est amené à la pompe PvdRT-OpmQ et l'apo PVDI est recyclée dans le milieu extracellulaire (Schalk *et al.* 2002; Greenwald *et al.* 2007) par la pompe PvdRT-OpmQ déjà impliquée dans la sécrétion de la PVDI nouvellement synthétisée (Yeterian et al). La PVDI peut alors repartir pour un nouveau cycle de transport de fer (Grennwald et al 2007).

Lorsqu'un autre complexe PVDI-métal que le complexe PVDI-fer est transporté dans le périplasme par FpvA, il ne se dissocie pas mais est ré-excrété par la pompe PvdRT-OpmQ (Hannauer *et al.* 2012).

La régulation de l'expression de la voie PVDI

La régulation de l'expression des gènes de la voie PVDI implique une régulation positive et négative. La PVDI en complexe avec le fer se lie à la surface de la bactérie sur le transporteur FpvA, ce qui induit un changement de conformation du domaine de signalisation de celui-ci permettant l'activation du régulateur sigma FpvR ancré dans la membrane interne (Brillet *et al.* 2007). FpvR libère ainsi deux facteurs sigma PvdS et FpvI qui induisent l'expression des gènes de l'opéron *pvd* en recrutant l'ARN polymérase sur les opérons de la PVDI contenant la IS box (TAAAT-N16/17-CGT) (Visca *et al.* 2002; Llamas *et al.* 2014). PvdS induit l'expression de l'ensemble des gènes de biosynthèse et FpvI induit l'expression de FpvA (Llamas *et al.* 2014).

L'ensemble de cette voie et négativement régulé par la protéine régulatrice Fur, décrite plus bas (page 62).



<u>Figure 14 :</u> Voie de la pyoverdine chez *P. aeruginosa*

Représentation schématique du locus PVD et de la voie PVD. La biosynthèse (décrite plus haut) fait intervenir sept enzymes au niveau du cytoplasme, cinq au niveau du périplasme et un transporteur ABC. La sécrétion se fait *via* la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Dans le milieu extracellulaire, la PVD chélate le fer et est transportée dans le périplasme par le TBDT FpvA. Dans le périplasme le comlexe PVDI-Fe est dissocié et le Fe(II) est importé dans le cytoplasme grâce au transporteur ABC FpvDE. La PVD est recyclée et sécrétée à nouveau par la pompe à efflux. L'induction de l'expression de l'ensemble des protéines de la voie PVD est assurée par les régulateurs FpvR/FpvI/PvdS.

3.2 La pyochéline (PCH)

La pyochéline (PCH) est une petite molécule qui résulte de la condensation d'une molécule de salicylate et de deux cystéines (Cox *et al.* 1981). Ce petit sidérophore est produit par *P. aeruginosa* mais aussi par *Burkholdéria cepacia*. La PCH possède trois centres chiraux en C4', C2'' et C4'' et lors de sa synthèse chez *P. aeruginosa* deux isoformes sont produites, la PCH1 et la PCH2 (Figure 15). *Pseudomonas fluorescence* produit l'enantio-pyochéline, l'enantiomère de la PCH. Quand la PCH se complexe au fer, la configuration *S* au niveau du centre chiral C2'' est convertie en *R*. Ainsi, seule la PCH1 complexe le fer (Schlegel *et al.* 2004; Schlegel *et al.* 2006). La PCH possède quatre groupements pouvant intervenir dans la formation du complexe PCH_2-Fe, le phénolate, l'imine, l'amine tertiaire et le carboxyle, et nécessite ainsi une deuxième molécule pour chélater le fer. Bien que le complexe ferri-PCH ait été détecté avec une stoechiométrie 1:1, le plus souvent il est retrouvé avec une stoechiométrie 2:1. Dans le cas où il n'y a qu'une PCH, la coordination du fer est complétée par des molécules naturellement disponibles tels que le citrate, ou des sidérophores comme la cépabactine ou autres (Cobessi *et al.* 2005; Schlegel *et al.* 2006; Tseng *et al.* 2006). La pyochéline est capable de lier d'autres métaux que le fer tels que Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl et Zn avec des affinités plus faibles (Ka du Cu pour la PCH: $10^{25.0}$ M^{-2} ; Zn : $10^{26.0}$ M^{-2} ; Fe : $10^{28.8}$ M^{-2}) (Braud *et al.* 2009; Youard *et al.* 2011; Brandel *et al.* 2012).

La voie de la pyochéline implique 14 gènes sur quatre opérons (*pchDCBA*, *pchR*, *pchEFGHI* et *fptABCX*) (Figure 17).

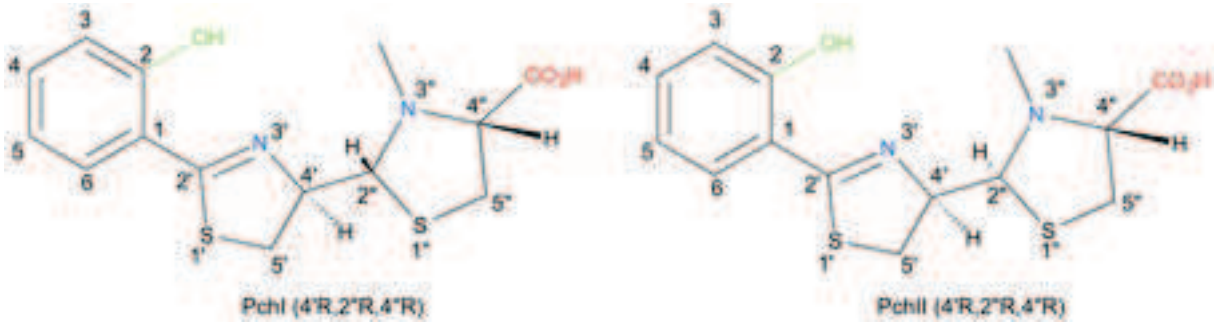


Figure 15 : Structure des deux formes de pyochéline produites par *P. aeruginosa*.

En couleur sont représentés des groupements qui interviennent dans la chélation du fer. Vert – phénolate ; Bleu – iminie/amine tertiaire ; Rouge – carboxyle.

La biosynthèse de la PCH

La biosynthèse de la PCH résulte de la condensation du salicylate et de deux molécules de cystéine subissant des modifications lors de la synthèse. La biosynthèse est exclusivement

cytoplasmique et fait intervenir sept enzymes de biosynthèse organisées en deux opérons ; *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Serino *et al.* 1997; Reimmann *et al.* 1998).

La biosynthèse de la pyochéline (Figure 16) débute avec la transformation du chorismate en salicylate en passant par l'isochorismate, assurée par les protéines PchA et PchB. PchA, une isochorismate synthase est une enzyme appartenant à la famille des MST (Menaquinone, Sidérophore et Tryptophane) utilisant le chorismate comme substrat et magnésium-dépendant. Elle a pour rôle d'isomériser le cycle pour former l'isochorismate (Gaille *et al.* 2003; Meneely *et al.* 2013). Dans le cadre de la biosynthèse de la PCH, PchB, une isochorismate-pyruvate lyase, forme ensuite l'acide salicylique et une molécule de pyruvate (Gaille *et al.* 2002). PchB possède, en plus de sa fonction d'isochorismate pyruvate lyase, une fonction de chorismate mutase. En effet, des études *in vitro* ont montré que PchB est capable d'utiliser directement le chorismate pour former du préphenate, précurseur des acides aminés aromatiques (Gaille *et al.* 2002). PchA et PchB, enzymes essentielles à la biosynthèse de la pyochéline, sont homologues à un grand nombre d'enzymes, car elles utilisent un substrat universel, le chorismate. Leurs activités enzymologiques ont suscité plusieurs études structurales et enzymologiques (Lamb 2011; Meneely *et al.* 2013; Meneely *et al.* 2013).

Lorsque l'acide salicylique est formé, PchD va activer ce précurseur en l'adénylant (Serino *et al.* 1997). Cette molécule activée peut ainsi être covalament chargée sur le premier module de thiolation de PchE, la première NRPS intervenant dans la biosynthèse de la pyochéline. En même temps, PchE active, grâce à son module d'adénylation, une première L-cystéine et la lie covalament sur son deuxième module de thiolation (Reimmann *et al.* 1998; Quadri *et al.* 1999; Reimmann *et al.* 2004). Le bon chargement des précurseurs et des cystéines est assuré par la thioestérase non essentielle PchC (Reimmann *et al.* 2004). Les deux molécules sont ensuite condensées et cyclisées grâce au module de cyclisation de PchE. Le centre chiral en C4' de la PCH possède une configuration *R*, signifiant que la cystéine intégrée par PchE doit être une D-cystéine. L'épimérisation de la L-Cys en D-Cys est assurée par le module d'épimérisation de PchE (Patel *et al.* 2003). La molécule formée par PchE est l'acide dihydroaeruginoique (Dha). Ce précurseur, capable de chélater le fer peut être retrouvé dans le milieu extracellulaire de *P. aeruginosa* (Serino *et al.* 1997). Dans le cadre de la biosynthèse de la Pch, le Dha est ensuite transféré sur PchF, la deuxième NRPS, par addition nucléophile d'une cystéine, préalablement chargée sur PchF, sur le Dha. Le chargement de cette deuxième cystéine sur le module de thiolation de PchF se fait sous le contrôle de PchC (Reimmann *et al.* 2004). Une fois que la deuxième cystéine est liée au Dha, elle subit une cyclisation grâce au module de cyclisation pour former la nor-pyochéline liée au module de thiolation (Patel *et al.* 2003). Après méthylation du deuxième cycle thioazolidine assurée par le

module de méthylation de PchF, la Pch néoformée est réduite et ainsi dissociée de PchF par la réductase PchG (Patel and Walsh 2001; Reimmann *et al.* 2001) (Figure 16).

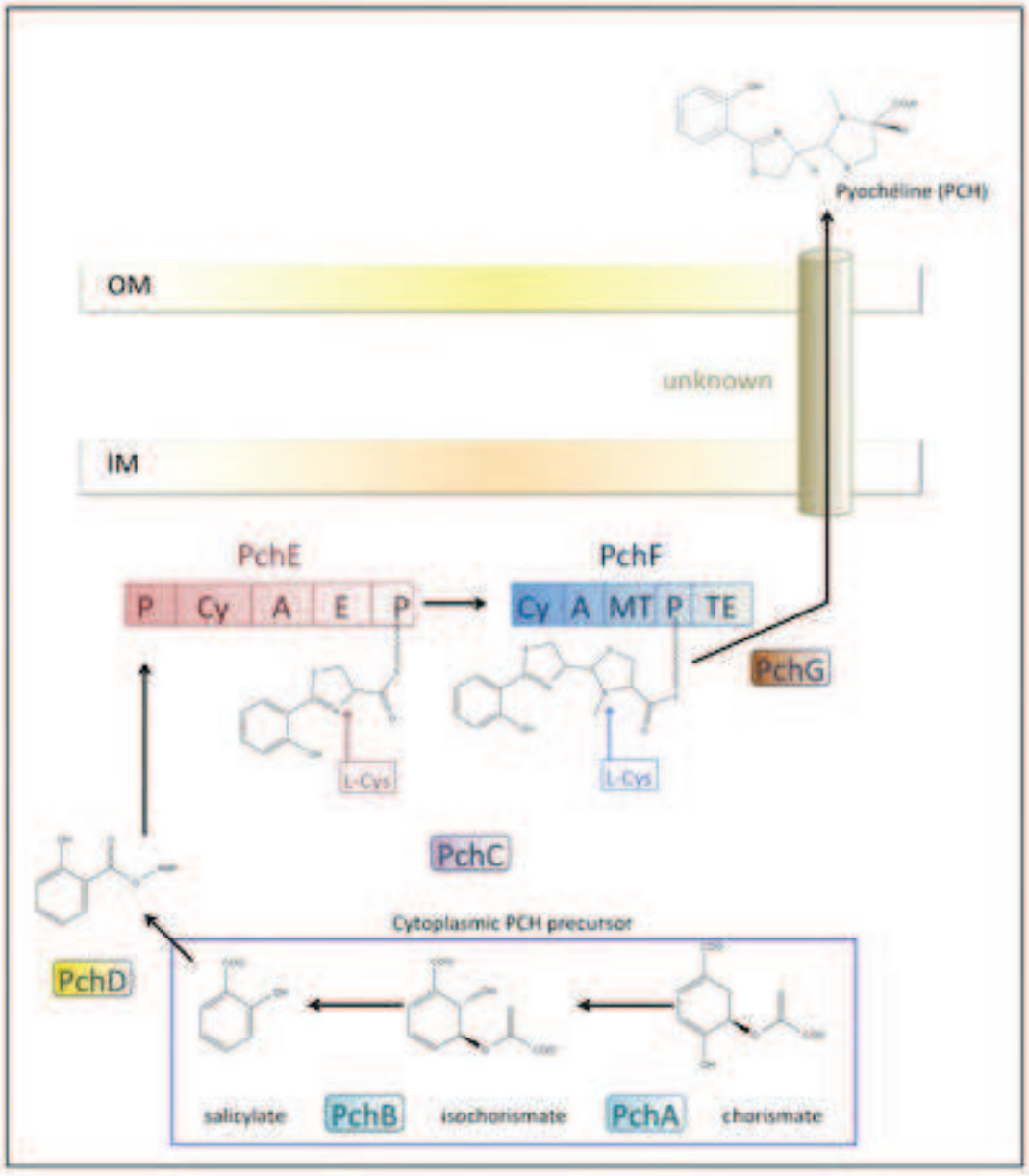


Figure 16 : Schéma de la biosynthèse de la pyochéline.

La biosynthèse de la pyochéline se fait exclusivement dans le cytoplasme et fait intervenir sept enzymes dont deux NRPS. Chacune des NRPS (PchE et PchF) intègrent une L-cystéine. L'export de la pyochéline se fait par des mécanismes encore inconnus.

La sécrétion de la PCH

Le mécanisme de sécrétion de la pyochéline n'est pas encore connu. Bien qu'il y ait deux gènes, *pchI* et *pchH*, dont les études d'alignement de séquence révèlent une homologie avec des transporteurs ABC, leur implication dans l'excrétion de la PCH n'a pas pu être démontré. En effet, leurs délétions n'entrainent pas de diminution de la quantité de PCH détectée dans le milieu extracellulaire (Reimmann *et al.* 2001). En revanche, il est possible qu'en l'absence de ces deux protéines, un autre système d'efflux prenne le relais pour sécréter la PCH. L'implication des deux

gènes, *pchI* et *pchH* dans la virulence de *P. aeruginosa* a cependant bien été identifié (Feinbaum *et al.* 2012) et il a également été suggéré que les protéines codées par ces deux gènes seraient impliquées dans un système de sécrétion de type 3 (Alibaud *et al.* 2008). De plus amples études seront nécessaires pour identifier d'une part le mécanisme de sécrétion de la PCH et d'autre part le rôle des deux protéines codées par les gènes *pchI* et *pchH*.

L'import du complexe PCH_2-Fe

Après chélation du fer dans l'environnement de la bactérie avec probablement une stoechiométrie PCH_2-Fe, le complexe PCH_2-Fe est réabsorbé par *P. aeruginosa* grâce au transporteur de membrane externe FptA et de la perméase de membrane interne FptX pour le passage de la membrane externe et interne respectivement. Les gènes codant pour ces protéines sont dans un opéron commun *fptABCX*.

FptA a une structure semblable a celle de tous les TBDTs : un tonneau β de 22 brins β antiparallèles reliés entre eux par de grandes boucles extracellulaires et des coudes périplasmiques, un domaine globulaire formé par 4 feuillets β et la boîte TonB, qui permet l'interaction avec le complexe TonB/ExbB/ExbD. Contrairement à FpvA, FptA ne possède pas de domaine de signalisation sigma/anti-sigma (Cobessi *et al.* 2005). La liaison du complexe PCH_2-Fe à FptA se fait sur la face extracellulaire du transporteur avec un site de liaison composé de résidus hydrophobes du bouchon et du tonneau (Cobessi *et al.* 2005). Comme tous les sidérophores, la PCH peut chélater de très nombreux métaux, qui sont ensuite reconnus par FptA, mais seuls les complexes avec le Fe, le Co, le Ga et le Ni s'accumulent dans la bactérie en présence de PCH (Braud *et al.* 2009). Comme tous les TBDTs, FptA est très sidérophore spécifique et est même énantio-sélective, car seule la pyochéline et non l'entantiopyochéline est reconnue et transportée par FptA (Hoegy *et al.* 2009; Brillet *et al.* 2011). Une fois le complexe dans le périplasme, ce dernier est très certainement transporté vers le cytoplasme via la perméase FptX (Thomas 2007; Youard *et al.* 2011; Schalk and Guillon 2013) (Michel *et al.* 2007). FptX est une perméase appartenant à une famille de transporteurs de sidérophores à une seule sous-unité (Cuiv *et al.* 2004) dont l'énergie nécessaire pour le transport est fournie par la force proton motrice de la membrane interne. Contrairement à FptA, FptX est non énantio-spécifique et peut transporter l'enantio-PCH chargée en fer (Reimmann 2012).

L'opéron contenant les deux transporteurs *fptA* et *fptX* code pour deux autres protéines FptB et FptC dont la fonction n'est pas encore connue. Des expériences de mutagenèse ont révélé que ni FptB ni FptC ne sont nécessaires à la production ou à l'acquisition de la PCH (Michel *et al.* 2007).

Le fer se dissocie de la PCH dans le cytoplasme bactérien, mais à ce jour le mécanisme impliqué n'a pas pu être mis en évidence et décortiqué.

La régulation de l'expression de la voie PCH

L'expression des gènes de la voie PCH est régulée positivement et négativement. PchR est un régulateur cytoplasmique faisant partie de la famille des régulateurs de type AraC (Heinrichs and Poole 1993). Après transport à travers la paroi bactérienne, le complexe PCH_2-Fe présent dans le cytoplasme se lie à PchR et ce complexe protéique induit l'expression des gènes des deux opérons de la biosynthèse *pchDCBA* et *pchEFGHI* ainsi que de l'opéron de l'import *fptABCX* et réprime sa propre expression. Cette activation/répression se fait grâce à la présence d'une PchR-box en amont des opérons (séquence de 32 paires de bases) (Michel *et al.* 2005). Des études d'énantiospécificité ont montré que PchR peut être activé par la PCH ainsi que par son énantiomère, l'énantio-PCH (Youard *et al.* 2011; Lin *et al.* 2013).

L'ensemble des opérons de la voie de la pyochéline est réprimé par la protéine régulatrice Fur, décrite ci-dessous.

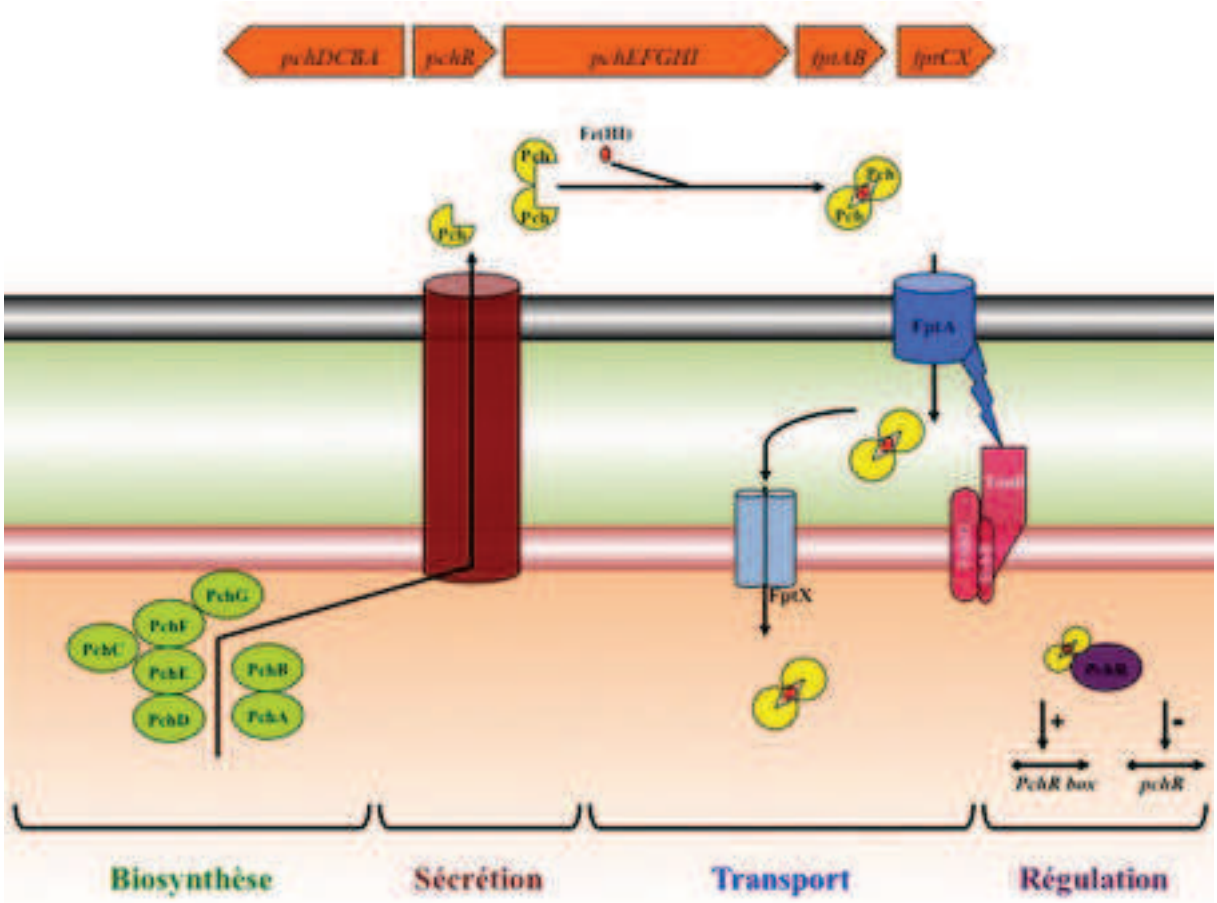


Figure 17 : Voie de la pyochéline chez *P. aeruginosa.*

Représentation schématique du locus PCH et de la voie PCH. La biosynthèse (décrite plus haut) fait intervenir sept enzymes au niveau du cytoplasme. Le mécanisme de sécrétion n'a pas encore été identifié. Dans le milieu extracellulaire, deux molécules de PCH chélatent le fer et sont transportées par le TBDT FptA à travers la membrane externe et par la perméase de membrane interne FptX. Une fois dans le cytoplasme, le complexe est reconnu par le régulateur PchR qui induit (à l'exception de sa propre expression) l'expression de l'ensemble des gènes de la voie pyochéline.

3.3 Les sidérophores exogènes

En plus de la PVDI et de la PCH, *P. aeruginosa* peut également utiliser des sidérophores produits par d'autres micro-organismes (Figure 18). Ce phénomène de piratage de sidérophore permet à la bactérie de mieux lutter contre ses compétiteurs dans un environnement poly microbien (Traxler *et al.* 2012).

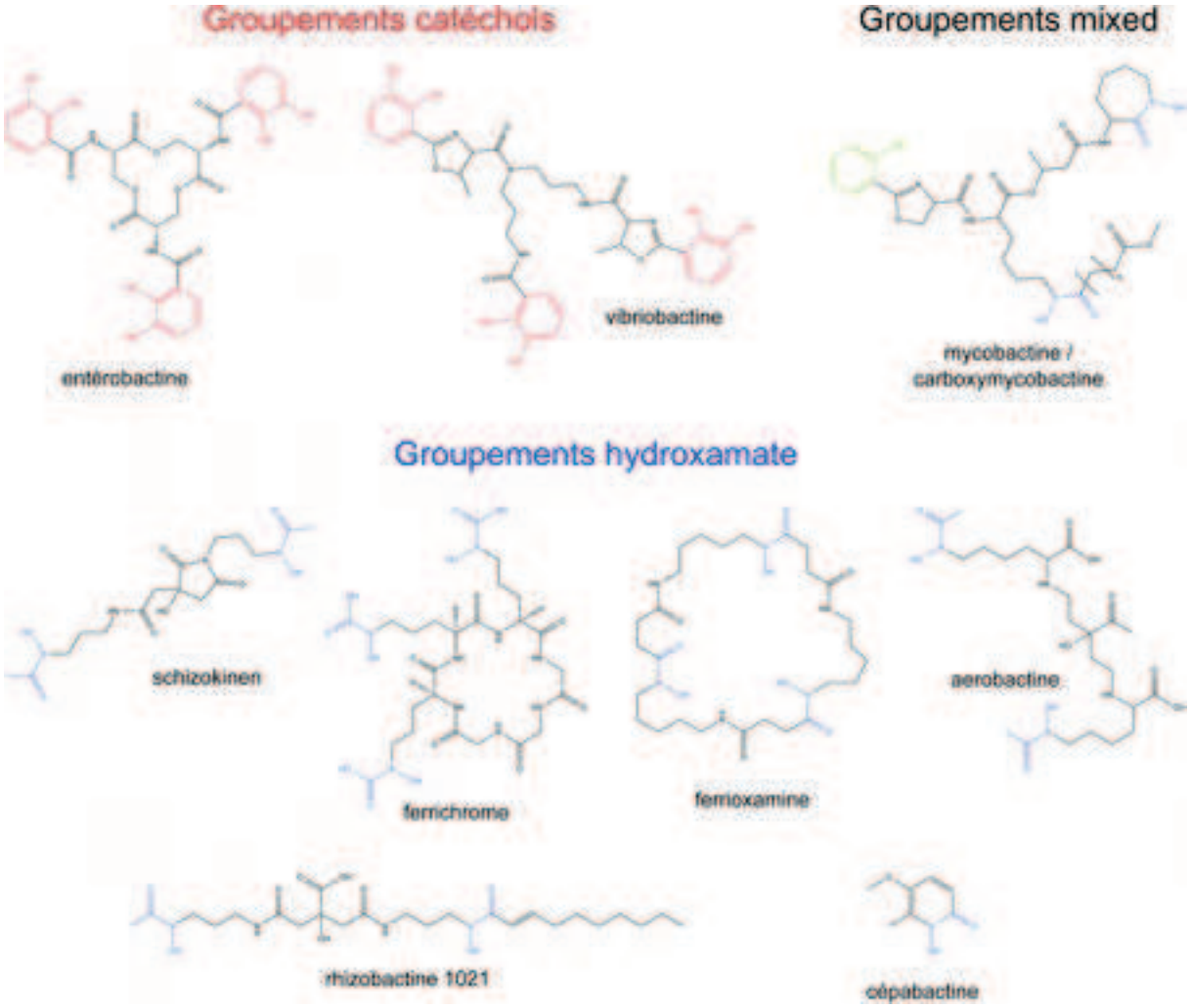


Figure 18 : Structure des sidérophores exogènes utilisés par *P. aeruginosa.*

En couleur sont représentés les groupements intervenant dans la chélation du fer. Rouge – catéchol ; Bleu – hydroxamate ; Vert – phénolate.

L'entérobactine

L'entérobactine est le sidérophore majeur produit par *E. coli* et la voie d'acquisition du fer par ce sidérophore chez *E. coli* a été décrite à la page 38. Ce sidérophore possède trois groupements catéchols et a une affinité pour le fer de l'ordre de 10^{42} M^{-1} (Raymond *et al.* 2003). Il forme un complexe de stoechiométrie 1:1. Chez *P. aeruginosa*, le transport du complexe entérobactine ferrique à travers la membrane externe est assuré par les transporteurs TonB dépendant PfeA et PirA (Poole *et al.* 1990; Dean and Poole 1993; Thulasiraman *et al.* 1998; Ghysels *et al.* 2005). Chez *P. aeruginosa*, quatre gènes homologues à *fep*BCDG ont été identifiés (Lewenza *et al.* 2005). Ces protéines pourraient être responsables du transport du complexe ferri-entérobactine à travers la membrane interne. L'activation de l'ensemble de la voie d'acquisition *via* l'entérobactine se fait en présence de cette dernière et en carence de fer. En effet, le complexe ferri-entérobactine se liant sur le transporteur PfeA ou PirA, induit l'expression des gènes de transport de l'entérobactine grâce au

système à deux composantes PfeR/PfeS (Dean and Poole 1993; Dean *et al.* 1996) avec un mécanisme probablement assez semblable à celui décrit pour la voie PVDI. L'ensemble est également sous le contrôle négatif de la protéine régulatrice Fur.

La desferrioxamine B et le ferrichrome

La desferrioxamine B est un sidérophore produit par le genre *Streptomyces* et possède trois groupements hydroxamate permettant une stoechiométrie 1:1 pour la chélation du fer avec une affinité de 10^{31} M^{-1} (Raymond and Carrano 1979). Le ferrichrome est un sidérophore produit par les genres *Ustilago*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Comme la desferrioxamine, le ferrichrome possède trois groupements hydroxamate et a une affinité de l'ordre de 10^{29} M^{-1} (Raymond and Carrano 1979) pour une stoechiométrie 1:1 avec le fer. Il a également été montré que le ferrichrome peut chélater d'autres métaux tels que Bi, Cd, Cu, Hg, Pb ou Zn (Hernlem *et al.* 1996; Neubauer *et al.* 2000).

Chez *P. aeruginosa*, le transport du complexe ferrioxamine ainsi que du ferrichrome est assuré par les transporteurs TonB dépendant FoxA et FiuA (Llamas *et al.* 2006; Banin *et al.* 2008; Hannauer *et al.* 2010). Le complexe ferrioxamine serait ensuite transporté à travers la membrane interne via la perméase FoxB (Cuiv *et al.* 2007; Hannauer *et al.* 2010). Concernant le ferrichrome, le complexe pourrait soit passer par la perméase FiuB soit par FoxB. Dans le cytoplasme, la libération du fer implique une réduction du fer et une acétylation du ferrichrome, ce dernier étant ensuite recyclé dans le milieu extracellulaire (Hannauer *et al.* 2010). L'expression des protéines impliquées dans le transport de la desferrioxamine B et du ferrichrome serait sous le contrôle des facteurs sigma/anti-sigma FoxI/FoxR ainsi que FiuI/FiuR et de la protéine régulatrice Fur.

La cépabactine

Très peu d'études ont été réalisées pour comprendre le transport du fer *via* la cépabactine. Ce petit sidérophore, produit par le genre *Burkholderia*, est un hydroxamate cyclisé qui peut chélater le fer avec une stoechiométrie 3:1 (Thomas 2007). Il peut être utilisé par *P. aeruginosa* et stimule la croissance bactérienne en conditions de carence de fer (Meyer 1992). Le transporteur (probablement un TBDT), impliqué dans l'import du complexe fer-cépabactine, n'a pas encore été identifié (Mislin *et al.* 2006). De plus, il a été montré qu'en présence de pyochéline, la cépabactine forme un complexe pyochéline-cépabactine-fer avec une stoechiométrie 1:1:1 (Klumpp *et al.* 2005).

La mycobactine

Mycobacterium tuberculosis produit le sidérophore mycobactine pour subvenir à ses besoins en fer (Rodriguez 2006). C'est une molécule regroupant deux fonctions hydroxamate et un phénolate permettant de former un complexe de stoechiométrie 1:1. Il a été montré que *P.*

aeruginosa possède au moins un transporteur TonB dépendant, nommé FemA (pour Ferric-myobactin receptor) capable d'acquérir le fer *via* la mycobactine et la carboxymycobactine (Llamas *et al.* 2008). Ce transporteur est sous le contrôle des facteurs sigma/anti-sigma FemI/FemR et de la protéine régulatrice Fur.

L'aerobactine, la rhizobactine 1021 et la schizokinen

L'aerobactine est un sidérophore produit par *E. coli* (Garenaux *et al.* 2011), la rhizobactine 1021 est produit par *Sinorhizobium meliloti* et la schzokinen par *Bacillus megaterium* (Cianciotto 2007). Ils possèdent tous des groupements hydroxamate et forment des complexes ferriques pouvant être reconnus et transportés par *P. aeruginosa*. Le transporteur ChtA est capable de transporter les trois complexes ferri-sidérophore à travers la membrane externe (Cuiv *et al.* 2006). Il a été montré que la schizokinen peut passer la membrane cytoplasmique *via* la perméase FoxB (Cuiv *et al.* 2007).

La vibriobactine

La vibriobactine est un sidérophore composé de trois catéchols produit par *Vibrio cholerae*. *P. aeruginosa* possède un transporteur TonB dépendant, FvbA (Ferric vibriobactin), capable d'importer la vibriobactine. Son expression est sous le contrôle de Fur et de FvbR, une protéine régulatrice de type IcIR (Elias *et al.* 2011)

3.4 L'import de l'hème chez P. aeruginosa

L'hème représente environ 70 % du fer dans le corps humain et constitue la source en fer majeure pour les pathogènes lors d'infections. Comme décrit plus haut, l'hème est principalement lié à des hémoprotéines (tels que l'hémoglobine ou l'hémopexine) et les pathogènes doivent donc rivaliser avec ces dernières. *P. aeruginosa* a développé deux systèmes capables d'acquérir le fer de l'hème ; le système Phu et le système Has. Le système Phu est composé du transporteur TonB dépendant PhuR et de l'opéron *phuSTUVW* (Ochsner *et al.* 2000). Le transporteur PhuR entre en compétition directe avec les hémoprotéines ou lie l'hème libre et transporte spécifiquement l'hème à travers la membrane externe grâce à la l'énergie fournie par la machinerie TonB. L'hème ainsi acquis est pris en charge par la protéine de liaison périplasmique PhuT (Ochsner *et al.* 2000). Le transporteur ABC PhuUVW fait ensuite transiter l'hème à travers la membrane interne et transfère l'hème à la protéine chaperonne PhuS (Bhakta and Wilks 2006; O'Neill and Wilks 2013). L'hème est ensuite dégradé par l'oxygénase HemO en biliverdine, monoxyde de carbone ce qui libère le Fe(II) (Barker *et al.* 2012). Le groupe de gène Phu est négativement régulé par la protéine Fur.

Chez *Serratia marcesens*, le système Has est composé du transporteur HasR, de l'hémophore $HasA_P$, de la protéine HasB, du transporteur HasED et des facteurs sigma/anti-sigma

HasI/HasS (Wandersman and Delepelaire 2004; Wandersman and Delepelaire 2012). Chez *P. aeruginosa,* des homologues de l'ensemble de ces gènes ont été identifiés (Letoffe *et al.* 1998; Lewenza *et al.* 2005; Llamas *et al.* 2008). L'hémophore $HasA_P$ est sécrété grâce au système de sécrétion de type 1 qui impliquerait HasD (partie ATPase), HasE (partie membranaire) et le complexe TolC/HasF (Masi and Wandersman 2010). Dans le milieu extracellulaire, $HasA_P$ entre en compétition avec les hémoprotéines de l'hôte. Grâce à sa forte affinité pour l'hème, $HasA_P$ acquiert ce dernier et se fixe sur le transporteur HasR (Letoffe *et al.* 1999). Le transporteur HasR transporte l'hème à travers la membrane externe probablement grâce à l'énergie fournie par le complexe HasB-ExbB-ExbD, complexe similaire à la machinerie TonB (Lefevre *et al.* 2008; de Amorim *et al.* 2013). L'ensemble est finement régulé par les facteurs sigma/anti-sigma HasI/HasS et est réprimé par le système Fur (Biville *et al.* 2004; Llamas *et al.* 2008; Wandersman and Delepelaire 2012; Malki *et al.* 2014) (Figure 19).

En l'absence de ces deux systèmes d'acquisition de l'hème, *P. aeruginosa* n'est potentiellement plus capable d'utiliser l'hème comme source de fer (Ochsner *et al.* 2000).

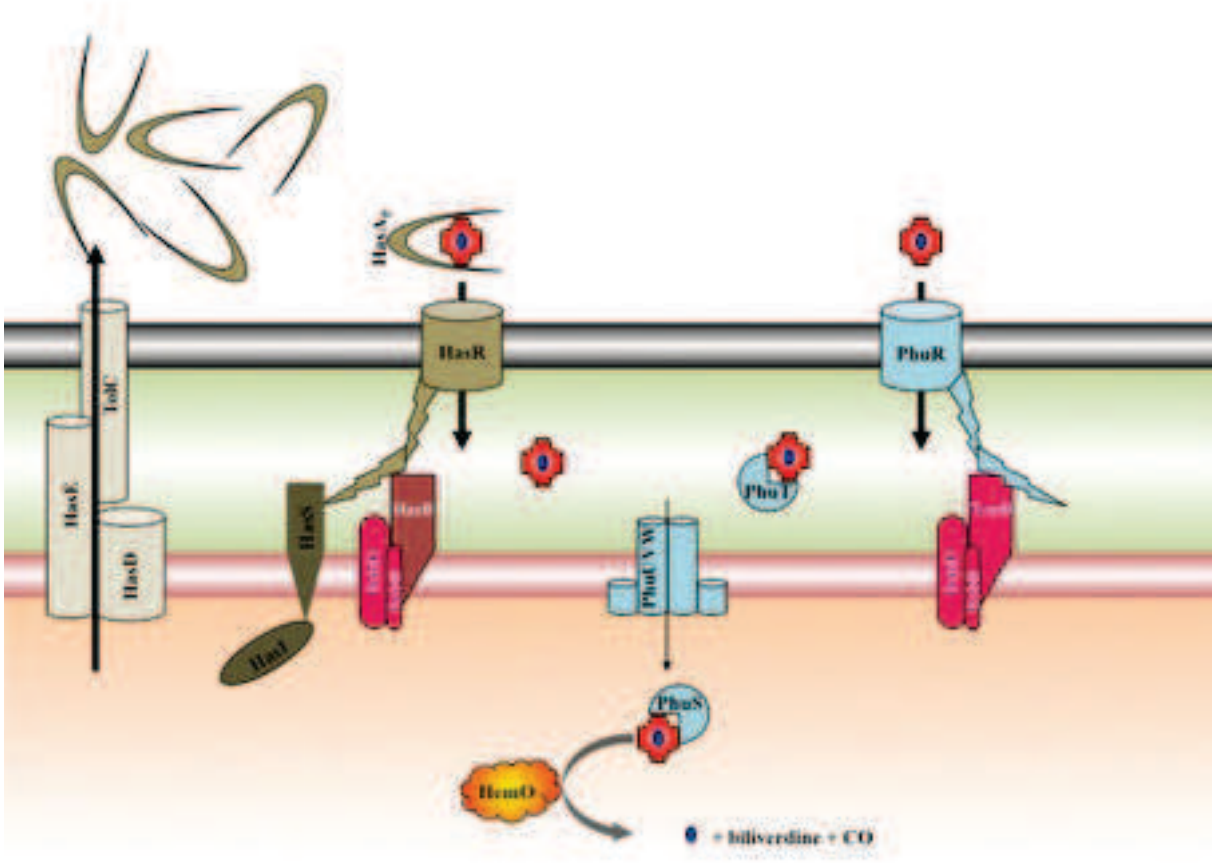


Figure 19 : Système d'acquisition de l'hème chez *P. aeruginosa.*

Deux systèmes d'acquisition de l'hème ont été identifiés chez *P. aeruginosa.* Le système Has (gauche), impliquant l'excrétion d'un hémophore ($HasA_P$) et le transport actif *via* le TBDT HasR. A droite, le système Phu impliquant le TBDT PhuR, peut transporter directement l'hème, une protéine périplasmique PhuT, le transporteur de membrane

interne PhuUVW ainsi que la protéine chaperonne cytoplasmique PhuS. La libération du fer depuis l'hème se fait grâce à l'oxygénase HemO.

3.5 Les autres systèmes d'acquisition du fer chez P. aeruginosa

L'import du fer ferreux

Le fer ferreux est la forme minoritaire du fer rencontrée dans l'environnement naturel de *P. aeruginosa*. En revanche, en conditions anaérobies ou de microaérobie, conditions rencontrées en biofilm par exemple, le fer ferreux peut préexister et être disponible pour la bactérie (Andrews *et al.* 2003). De plus, même en conditions aérobies à pH physiologique, la bactérie sécrète des métabolites secondaires, nommés phénazines, ayant un fort potentiel redox (Wang and Newman 2008) (Figure 20 A). Celles-ci permettraient de réduire le fer ferrique en fer ferreux directement dans le milieu extracellulaire ou dans le périplasme (Wang *et al.* 2011). Le fer ferreux diffusant *via* des porines (tel que OprQ) dans le périplasme, il pourrait ainsi être pris en charge par le système d'acquisition FeoABC enchâssé dans la membrane interne. La voie FeoABC décrite pour la première fois chez *E. coli* (Kammler *et al.* 1993) est composée d'un transporteur (FeoB) et de deux protéines cytoplasmiques régulatrices (FeoA et FeoC) (Cartron *et al.* 2006; Cornelis and Dingemans 2013). FeoB est un transporteur du fer de la membrane cytoplasmique, composé de 773 acides aminés avec un module GTPase en partie N-terminale (Seyedmohammad *et al.* 2014). Le rôle de FeoA et de FeoC a longuement été inconnu. Des études récentes suggèrent que FeoA ainsi que FeoC auraient un rôle régulateur au niveau protéique (Weaver *et al.* 2013; Kim *et al.* 2015). L'expression de cette voie est réprimée par la protéine cytoplasmique Fur dont la fonction est décrite ci-dessous (Figure 20 B).

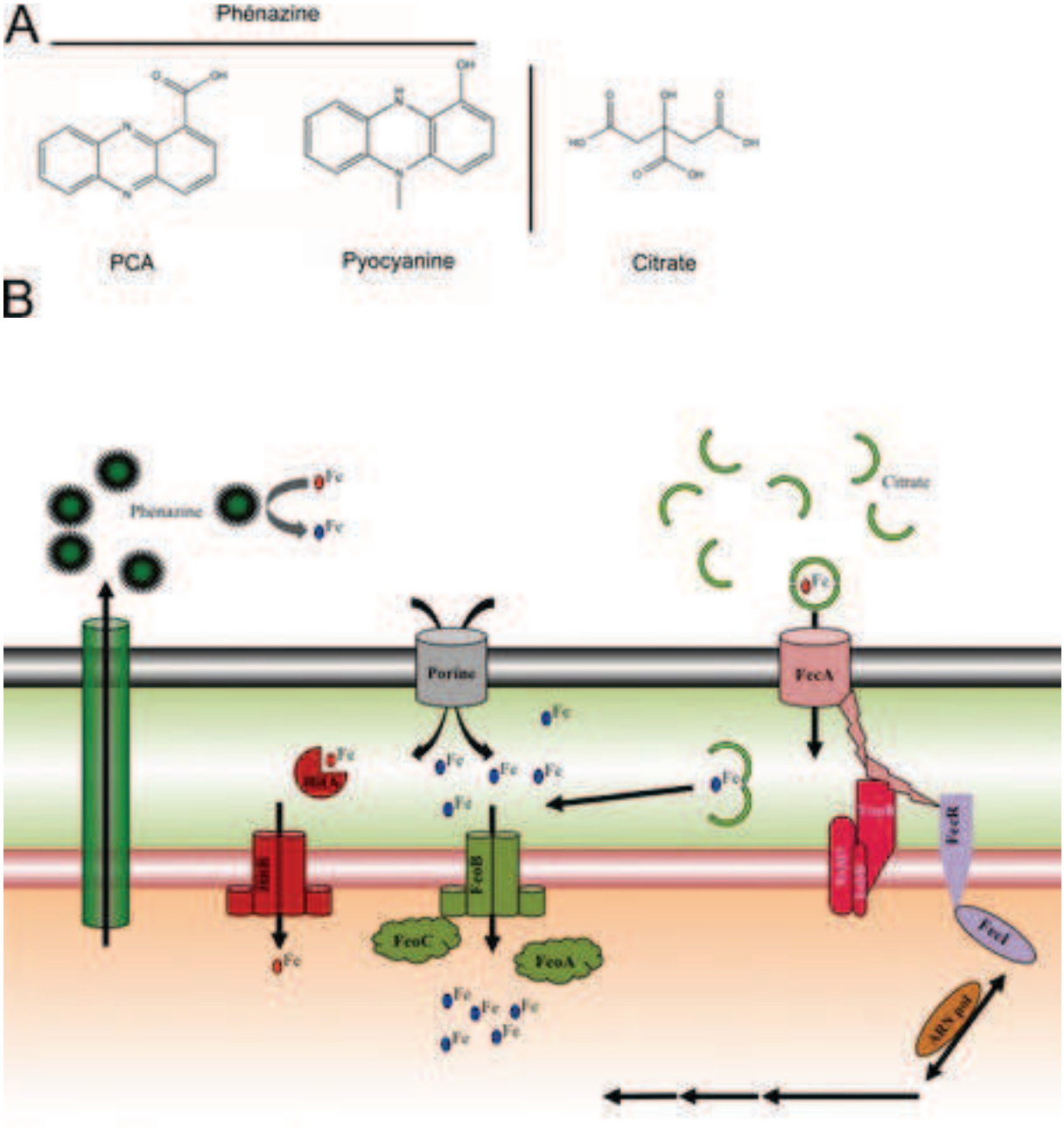
L'import du fer ferrique

Le fer ferrique, forme faiblement soluble et ainsi moins biodisponible représente une source de fer non négligeable pour la bactérie. Bien que cette forme de fer soit principalement prise en charge par les sidérophores, une perméase de fer ferrique HitB et une protéine de liaison périplasmique HitA ont été identifiées chez *P. aeruginosa* (Garcia-Contreras *et al.* 2013). Ces protéines, identifiées pour la première fois chez *Haemophilus influenza* seraient impliquées dans l'acquisition du fer ferrique à travers la membrane interne (Sanders *et al.* 1994) (Figure 20B).

L'import du citrate-ferrique

Le citrate, métabolite du cycle de Krebs, peut chélater le fer ferrique et ainsi servir de source de fer pour les micro-organismes (Figure 20 A droite). *P. aeruginosa* possède un système spécifique d'acquisition du fer en complexe avec le citrate. En effet, le transporteur TonB-dépendant FecA permet de lier le citrate-ferrique à la surface de la bactérie et de le transporter à

travers la membrane externe (Marshall *et al.* 2009). Il a été proposé que le citrate-ferrique serait ensuite dissocié par un mécanisme impliquant une réduction du fer et le fer (sous forme ferreuse) pris en charge par le transporteur de fer ferreux FeoB (Marshall *et al.* 2009). L'expression de FecA est positivement régulée par l'intermédiaire des facteurs sigma/anti-sigma FecI/FecR (Potvin *et al.* 2008) et négativement par Fur (Figure 20 B).



<u>Figure 20 :</u> Système d'acquisition du fer *via* le citrate, le système Feo et le système Hit chez *P. aeruginosa.*

(A) Structure des deux phénazines les plus utilisées par *P. aeruginosa* : phenazine-1-carboxylic acid (PCA) et pyocyanine ainsi que la structure du citrate. (B) Les phénazines sont sécrétées sous forme réduite dans le milieux extracellulaire et réduit le fer(III) en fer(II). Le fer(II) peut transiter *via* des porines dans le périplasme et être pris en charge par le transporteur ABC FeoB pour être transporté vers le cytoplasme. Le fer(III) peut également passer la membrane externe *via* des porines et est pris directement en charge par la protéine de liasion périplasmique HitA qui présente le fer ferrique à la HiTB pour le passage à travers la membrane interne. Le citrate, métabolite omniprésent,

chélate le fer et les complexes formés sont transportés à travers la membrane externe *via* FecA. Le fer est libéré dans le périplasme par un mécanisme de réduction et pris en charge par FeoB. FecR/FecI qui régulent l'expression de FecA. Adapté depuis (Cornelis and Dingemans 2013).

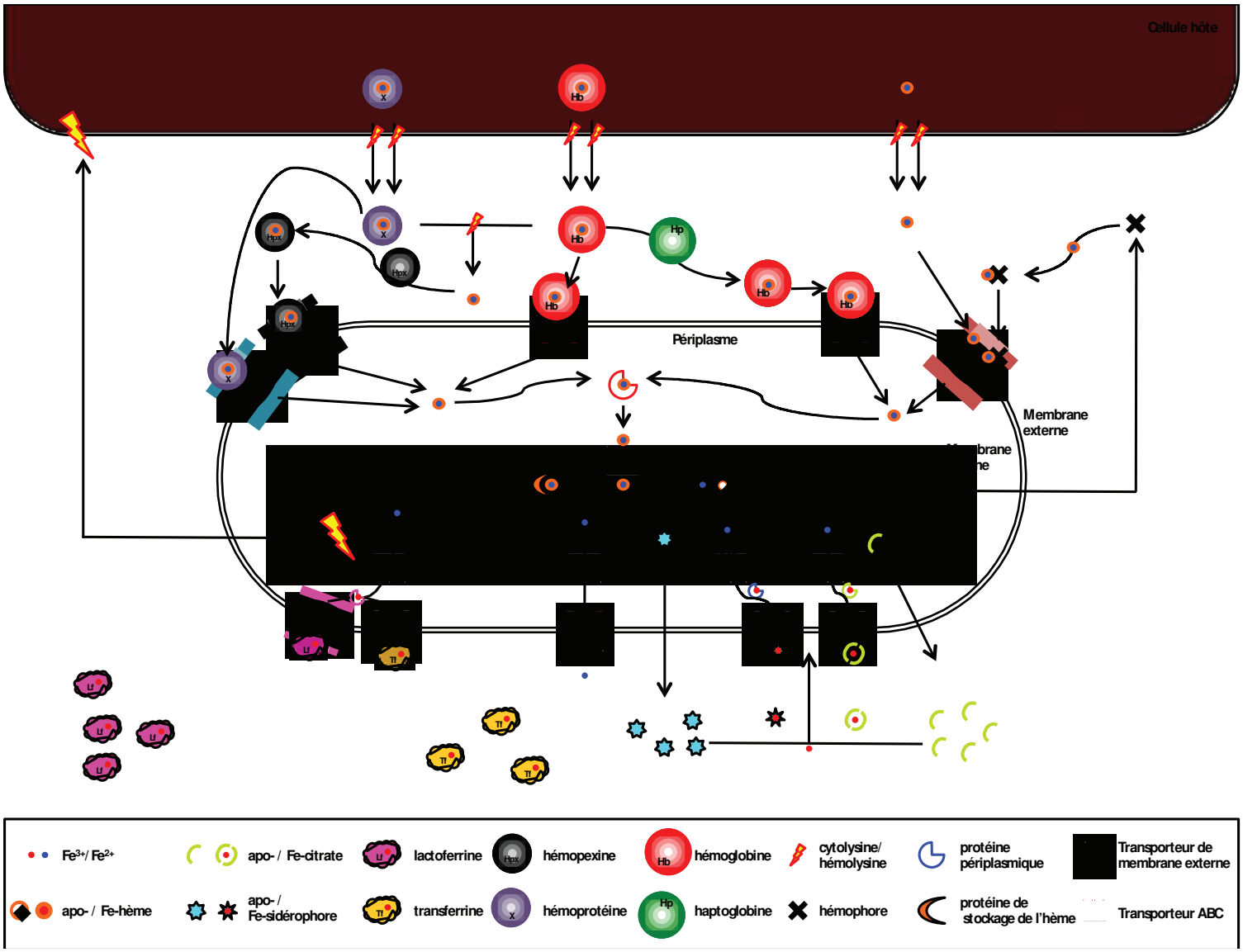


Figure 11 : Système d'acquisition du fer chez les gram-négatives en conditions infectieuses.

Afin de subvenir à leurs besoins en fer, les bactéries gram-négatives mettent en jeu un grand nombre de systèmes d'acquisition du fer. Fe : fer ; Hb : hémoglobine ; Hp : haptoglobine ; Hpx : hémopexine ; X : autres hémoprotéines.

4. La régulation

Bien qu'essentiels, le fer et l'hème peuvent être toxiques à forte concentration, ceci en raison de leur capacité à former des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species). Pour cela, *P. aeruginosa* a dû développer un système complexe de régulation de l'homéostasie du fer, comprenant une régulation pour l'acquisition du fer et de l'hème ainsi que pour leur stockage. A ce

jour, aucun système d'efflux du fer ou de l'hème n'a été identifié, probablement en raison de la faible biodisponibilité de ces derniers.

4.1 La protéine régulatrice Fur

La protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) est un répresseur contrôlant l'expression de la grande majorité des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Cette protéine d'environ 15 kDa (134 acides aminés) a été identifiée pour la première fois chez *E. coli* et a été largement étudiée depuis (Bagg and Neilands 1987). Fur est une protéine formant des dimères dont chaque monomère est composé d'un domaine de liaison à l'ADN (en N-terminal) et d'un domaine de dimérisation (en C-terminal). Chez *P. aeruginosa,* Fur possède un site de liaison métallique pour le fer (Fe^{2+}) dont la liaison est essentiellement assurée par des histidines (Lewin *et al.* 2002; Lee and Helmann 2007; Fillat 2014). Lorsque la concentration normale intracellulaire de fer est atteinte, le fer libre se lie sur le répresseur Fur. Cette liaison engendre un changement conformationel permettant à la protéine de se lier à une séquence spécifique de l'ADN nommée FUR-Box. Un dimère s'associe de chaque côté de la double hélice d'ADN. Cette liaison empêche l'ARN polymérase de s'y lier et réprime ainsi l'expression de ces gènes (Fillat 2014) (Figure 22). En plus de son rôle répresseur, Fur peut également activer l'expression de certains gènes *via* la répression de petits ARN régulateurs. En effet, il a été montré que BfrB (une protéine impliquée dans le stockage du fer) est sous le contrôle positif de Fur (Wilderman *et al.* 2004) ainsi qu'un certain nombre de superoxide dismutases (Vasil 2007).

La protéine Fur fait partie de la superfamille des protéines régulatrices Fur. En plus de la protéine impliquée dans la régulation du fer, il existe cinq autres protéines régulatrices appartenant à cette superfamille ; Zur (Zinc uptake regulator) ; Nur (Nickel uptake regulator) ; Mur (Manganese uptake regulator) ; PerR (Peroxide stress regulator) et Irr (Heme availability regulator) (Fillat 2014). Chez *P. aeruginosa* seul Fur et Zur ont été identifiées (Ellison *et al.* 2013; Fillat 2014).

4.2 Les facteurs sigma/anti-sigma

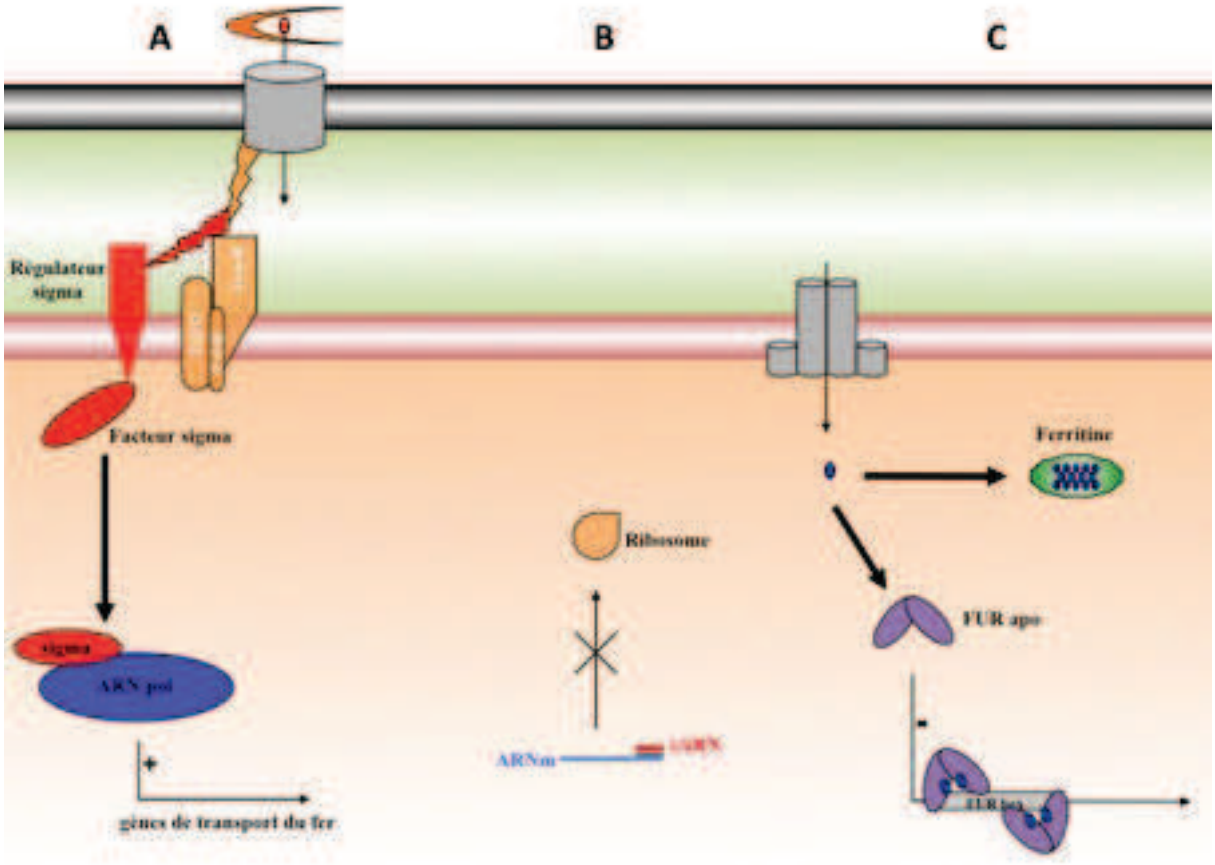
L'expression de la majorité des transporteurs TonB dépendant (sauf FptA) est positivement régulée via un facteur sigma régulateur ancré dans la membrane interne (aussi appelé facteur anti-sigma) et un facteur sigma cytoplasmique appartenant à la famille des ECF (ExtraCytoplasmic Function) (Braun 1997). La liaison des sidérophores chargés en fer avec leur site de liaison sur les TBDTs induit un changement de conformation du domaine de signalisation, qui devient ainsi disponible pour interagir avec le facteur anti-sigma ancré dans la membrane interne. Cette interaction induit un changement conformationnel du facteur anti-sigma, libérant ainsi le facteur sigma dans le cytoplasme. Ce dernier peut ensuite recruter l'ARN polymérase et induire l'expression des gènes du transport du fer (Potvin *et al.* 2008; Llamas *et al.* 2014) (Figure 22).

4.3 Les petits ARN régulateurs

L'importance des petits ARN régulateurs impliqués dans l'homéostasie du fer est étudiée seulement depuis peu mais il a déjà été démontré qu'ils jouent un rôle significatif. En effet, trois petits ARN régulateurs (PrrF1, PrrF2 et PrrH) ont un rôle dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*. PrrF1 et PrrF2 sont deux petits ARN d'environ 35 acides nucléiques avec une homologie de 95 % impliqués dans l'expression d'au moins une soixantaine de gènes (Vasil 2007). Ces petits ARN interagiraient avec des régions complémentaires dans les ARN messagers et empêcheraient ainsi la traduction (Wilderman *et al.* 2004). En plus de PrrF1 et PrrF2, plus récemment, un petit ARN PrrH a été identifié et des expériences récentes montrent qu'il serait également impliqué dans l'homéostasie de l'hème chez *P. aeruginosa* (Reinhart *et al.* 2014) (Figure 22).

4.4 Le stockage du fer

P. aeruginosa a développé un grand nombre de systèmes d'acquisition du fer afin de subvenir à ses besoins et l'ensemble de ces systèmes est finement régulé afin d'éviter une surcharge en fer. Pour limiter cette surcharge en fer libre et pour stocker le fer dans la bactérie, *P. aeruginosa* possède au moins deux ferritines différentes (Moore *et al.* 1994) : une bactérioferritine (BfrB) capable de lier le fer mais aussi responsable du stockage de l'hème (Rui *et al.* 2012) ainsi qu'une ferritine bactérienne (FtnA) capable de lier le fer (Yao *et al.* 2011). BfrB et FtnA sont des protéines de 24 sous-unités avec une cavité d'environ 80 Å de diamètre dans laquelle le fer minéral est stocké et avec une capacité d'accueil allant jusqu'à
4 500 atomes de fer (Yao *et al.* 2011). Le relargage du fer stocké dans les ferritines nécessite d'une part la présence d'une réductase NADP ferredoxine (Fpr) et d'autre part, pour BfrB, la présence d'une seconde ferredoxine (Bfd) afin de correctement prendre en charge le fer ainsi libéré (Yao *et al.* 2012) (Figure 22).



<u>Figure 22 :</u> Systèmes de régulation du fer chez *P. aeruginosa.*

(A) La liaison d'un complexe sidérophore-fer engendre une cascade de signalisation aboutissant à la libération d'un facteur sigma dans le cytoplasme. Celui-ci peut recruter l'ARN polymérase et induire l'expression des gènes. (B) De petits ARN (sARN) peuvent s'hybrider aux ARN messagers (ARNm) pour bloquer leurs traductions et ainsi inhiber l'expression des protéines. (C) En présence de fer, le fer libre est stocké dans des ferritines bactériennes ou des bactérioferritines. De plus, le fer est reconnu par la protéine régulatrice Fur induisant un changement de conformation ce qui va provoquer sa liaison sur la boîte Fur (FUR-box) en amont des gènes d'acquisition du fer et bloquer leur expression.

Objectifs

Bien que l'acquisition du fer *via* les sidérophores chez *P. aeruginosa* ait été largement étudiée, certains aspects tels que le rôle précis et l'importance de la PCH chez *P. aeruginosa* restent encore largement méconnus. En effet, la grande majorité des études de ces trente dernières années portaient sur l'étude de la PVD, toujours considérée comme sidérophore majoritaire chez *P. aeruginosa*. Au laboratoire, la plupart des études portaient sur la biosynthèse, la sécrétion, l'import et la distribution des enzymes impliquées dans la voie-PVD. En revanche, la PCH, molécule non fluorescente et ayant une affinité pour le fer plus faible que la PVD a été largement moins étudiée. Lors de cette thèse nous nous sommes donc intéressés à ce petit sidérophore qu'est la PCH et avons essayé de mieux comprendre son rôle chez *P. aeruginosa*.

- Le premier objectif fixé a été d'étudier la distribution des protéines impliquées dans la voie PCH. Cette étude faisait suite aux travaux de localisation des protéines de la voie PVD. En effet, au début de ma thèse, le laboratoire commençait à avoir des données sur l'existence de sidérosomes au niveau de la membrane interne pour la voie PVD localisée. Dans ce projet de thèse, nous avons donc voulu étudier la localisation cellulaire des enzymes de biosynthèse de la pyochéline et vérifier l'existence d'un sidérosome.

- Dans un second temps, nous avons voulu déterminer le rôle de la pyochéline dans l'homéostasie de métaux autres que le fer dans la bactérie. En effet, des études de notre laboratoire, ont montré que la pyochéline est capable d'importer d'autres métaux que le fer mais nous ne savions pas si ce transport avait une signification biologique et aucune étude n'avait été effectuée sur la régulation de cet import.

- Ensuite, pour mieux comprendre l'homéostasie des métaux chez *P. aeruginosa* et l'implication des sidérophores, nous avons jugé important d'analyser la composition en métaux (métallome) de cellules de *P. aeruginosa* productrices ou non de sidérophores. Cette investigation s'est accompagnée d'une étude protéomique de *P. aeruginosa*.

- Pour finir, nous nous sommes intéressés à l'importance des sidérophores durant l'infection en essayant d'identifier le ou les sidérophores pouvant être mis en jeu dans cette situation.

En résumé, cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre l'importance de la pyochéline chez *P. aeruginosa*. En effet, bien que la pyochéline soit toujours considérée comme un

sidérophore secondaire, *P. aeruginosa* a conservé ce sidérophore tout au long de son évolution, suggérant qu'il a un rôle bien particulier qu'il nous reste plus qu'à identifier.

Résultats

Chapitre 4

Étude de l'organisation cellulaire des protéines impliquées dans la voie de la pyochéline

1. Introduction

L'étude de la voie PCH était jusque là essentiellement restreinte à l'étude enzymatique des différentes étapes de la biosynthèse de ce sidérophore (Youard *et al.* 2011) et de l'import de sa forme ferrique à travers la membrane externe *via* le TBDT FptA (Cobessi *et al.* 2005; Mislin *et al.* 2006). Concernant le passage à travers la membrane interne, une publication a pu mettre en évidence l'implication éventuelle de la perméase FptX dans l'import à travers la membrane cytoplasmique du complexe PCH_2-Fe (Michel *et al.* 2007). En revanche, aucun travail sur la localisation et l'organisation cellulaire des protéines impliquées dans la voie PCH n'a été accompli. En effet, de plus en plus d'études montrent que les protéines cytoplasmiques ont une certaine organisation cellulaire dans les bactéries (Dworkin 2009; Shapiro *et al.* 2009; Rudner and Losick 2010). Concernant la localisation des enzymes de biosynthèse de sidérophores, notre laboratoire et celui de P. Visca ont mis en évidence la localisation particulière d'une enzyme de biosynthèse de la PVD, PvdA (Imperi *et al.* 2008; Guillon *et al.* 2012). Laurent Guillon dans notre équipe a montré que PvdA est partiellement associée à la membrane interne et est plus concentrée aux pôles de la bactérie (Guillon *et al.* 2012). Des études réalisées au laboratoire, non publiées au début de ma thèse, ont également montré une localisation au niveau de la membrane interne et aux pôles de la bactérie des autres enzymes de biosynthèse de la voie PVD. Suite à ces résultats, nous nous sommes questionnés sur la localisation et l'organisation cellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la PCH ainsi que sur celle des autres protéines de la voie de la PCH. Pour cela, nous avons décidé de suivre la même approche utilisée lors de l'étude de la voie PVD. Nous avons donc procédé à un marquage au niveau chromosomique des protéines avec des protéines fluorescentes de type mCherry, GFP ou YFP. Nous avons choisi deux enzymes impliquées dans la biosynthèse, PchA et PchE, PchA étant la première enzyme impliquée dans la synthèse du précurseur et PchE étant une NRPS impliquée dans l'incorporation d'une cystéine. De plus, nous avons voulu comparer la localisation des enzymes de biosynthèse de la voie PVD et de la voie PCH. Pour cela, nous avons procédé à un double marquage, un marquage de la voie PVD et un marquage de la voie PCH dans une même souche. Nous avons également voulu visualiser des protéines impliquées dans l'import et la régulation de l'expression des gènes, et avons marqué le transporteur de membrane interne FptX et la protéine régulatrice PchR. Nous n'avons en revanche procédé à aucun marquage de l'export, car les protéines impliquées dans l'export de la PCH ne sont pas encore connues à ce jour. Pour toutes ces protéines de fusion, nous avons essayé en parallèle la fusion en N- et C-terminal et avons retenu uniquement les constructions ayant des phénotypes sauvages pour la croissance, la production de sidérophores et l'import du fer par la PCH.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à caractériser la perméase FptX, membre de la famille des transporteurs à une seule sous-unité. Cette famille de transporteurs est très

peu étudiée et aucune constante d'affinité pour son ligand naturel n'a été déterminée à ce jour. Cette étude nous a permis de comparer les deux systèmes d'acquisition de sidérophores endogènes chez *P. aeruginosa*.

2. Contribution des auteurs

Sur les deux articles présentés ici, ma contribution a été de construire, caractériser et étudier l'ensemble des souches de la voie PCH. J'ai également réalisé les expériences de transport de ^{55}Fe et de fractionnement cellulaire pour l'étude de FptX. F. Hoegy a réalisé l'expérience de mesure d'affinité de FptX pour le fer et C. Reimmann a fourni le plasmide de surexpression de FptX. L. Guillon et V. Gasser ont construit, caractérisé et étudié les souches de la voie PVD.

3. Résultats complémentaires (non publiés)

3.1 Localisation du régulateur PchR

La distribution homogène du régulateur décrite dans l'article ci-dessus à été très difficile à visualiser probablement en raison de la faible quantité de régulateur présente dans la bactérie.

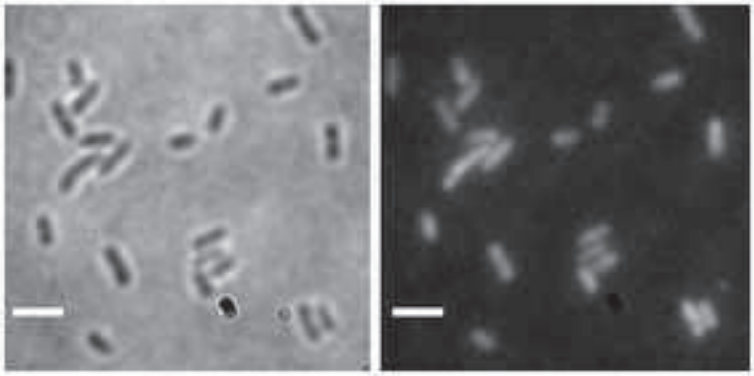


Figure 23 : Caractérisation du régulateur PchR chez *P. aeruginosa*.

Image de microscopie optique à épifluorescence de la souche *mcherrypchR*, à gauche en champ blanc et à droite l'image de fluorescence après 16 h de culture en milieu succinate. L'échelle représente 2 µm.

3.2 Étude du sidérosome

Afin d'étudier plus précisément les interactions entre PchA et PchE et ainsi de mieux comprendre l'assemblage protéique au sein même du sidérosome, nous avons voulu d'une part mesurer une proximité entre ces deux protéines par des mesures de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) et d'autre part identifier tous les constituants du sidérosome de la PCH par immuno-précipitation du complexe protéique.

Pour l'expérience de FRET, nous avons utilisé la souche exprimant en parallèle les protéines de fusion PchA-mCherry et PchE-eYFP (souche Δ*pvdF-pchAmcherry-pchEeyfp*) inoculée dans un milieu pauvre en fer (milieu succinate) afin d'induire l'expression de la voie PCH. Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur cellules entières, avec excitation à la longueur d'onde d'absorption de la protéine eYFP (514 nm) et mesure de l'émission de fluorescence à la longueur d'onde

d'émission de fluorescence de la protéine mCherry (610 nm). Aucun FRET n'a malheureusement pu être mis en évidence (Figure 24), peut être à cause d'une distance trop importante entre ces protéines PchA et PchE dans les cellules et dans le sidérosome ou à cause d'une mauvaise orientation de la protéine eYFP donneuse et de la protéine acceptatrice mCherry.

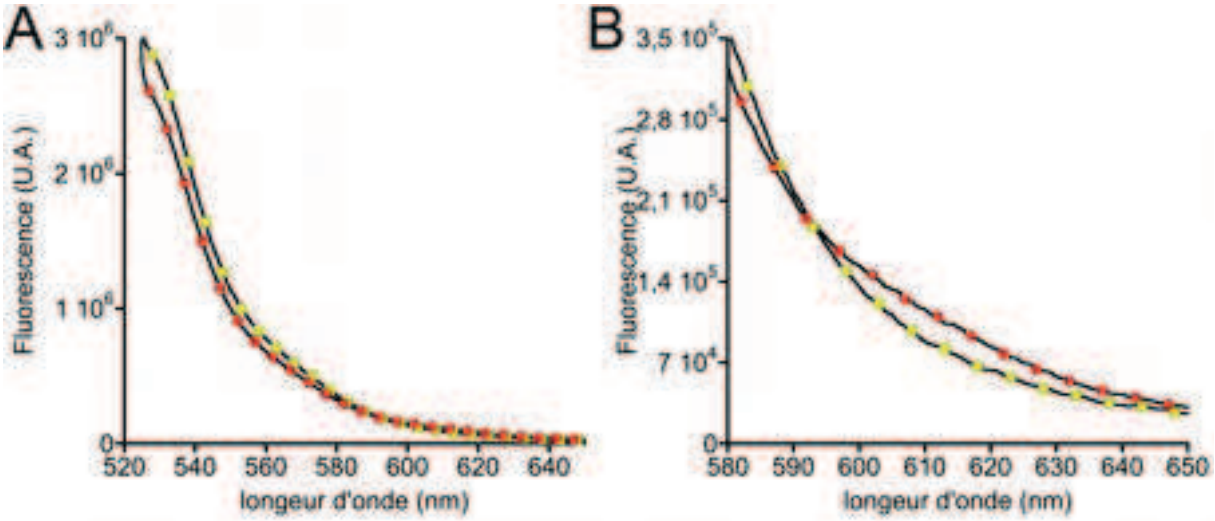


Figure 24 : Mesures de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) entre PchEyfp et PchAmcherry.

(A) Spectre d'émission des souches Δ*pvdF-pchEyfp* (points jaunes) et Δ*pvdF-pchAmcherry-pchEyfp* (points rouges) après excitation du fluorophore donneur (YFP) à 514 nm. (B) Zoom sur la zone d'émission de mcherry (610 nm).

Dans un deuxième temps, nous avons voulu purifier et identifier la composition en protéine du sidérosome de la PCH. Pour cela, nous avons obtenu du laboratoire d'Audrey Lee Lamb de l'université du Kansas, une souche *E. coli* contenant un plasmide de surexpression de PchA ayant une étiquette 6 histidines en C-terminal. Nous avons tout d'abord voulu purifier PchA et ensuite purifier toutes les protéines interagissant avec PchA par immuno-précipitation et ainsi purifier le complexe multi-protéique mais nous ne sommes pas parvenus à purifier PchA (Figure 25). Malheureusement, cette souche entre nos mains n'a jamais exprimé la protéine PchA. Manquant de temps, nous n'avons pas pu construire nous même une souche sur-exprimant PchA avec une étiquette His.

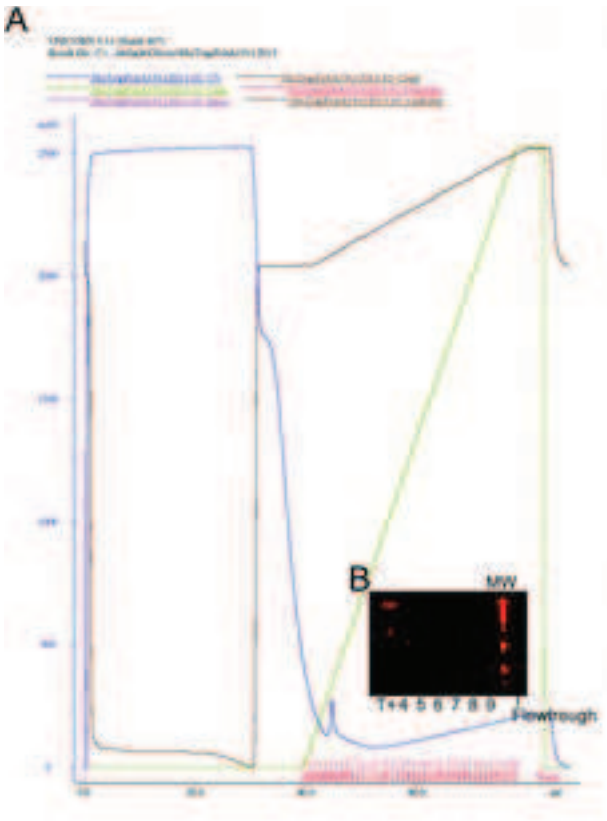


Figure 25 : Purification de PchA.

(A) Profil de purification de PchA avec une étiquette six histidines en C-terminal. La purification s'est faite sur un système ÄCTA purifié avec une élution graduelle à l'imidazole. (B) Western Blot ne révélant ni dans le petit pic de purification, ni dans la partie non retenue (Flowthrough) la présence de PchA-6His. Des anticorps anti-histidines ont été utilisés.

3.3 Étude de distribution des protéines des voies PCH et PVD

Afin d'étudier la localisation des voies PVD et PCH chez *P. aeruginosa* dans une même bactérie, nous avons construit des souches exprimant des protéines de fusion des deux voies. Nous avons ainsi obtenu des souches exprimant les différents « couples de protéines de fusion » : PvdA-GFP et PchA-mCherry (*pvdAgfp-pchAmcherry*) ; PvdA-GFP et PchE-mCherry (*pvdAgfp-pchEmcherry*); PvdA-GFP et PchR-mCherry (*pvdAgfp-mcherrypchR*); PvdA-GFP et FptX-mCherry (*pvdAgfp-fptXmcherry*) ; PvdJ-mCherry et PchE-YFP (*pvdJmcherry-pchEyfp*) ainsi que FpvF-mCherry et FptX-YFP (*fpvFmcherry-fptXyfp*) (Tableau Annexe 1). Toutes ces souches présentent des phénotypes sauvages pour la croissance, la production de sidérophores et le transport du fer. Les souches exprimant des protéines de fusion pour la biosynthèse de la PVD et de la PCH présentent toutes des spots fluorescents aux pôles des bactéries (Figure 26).

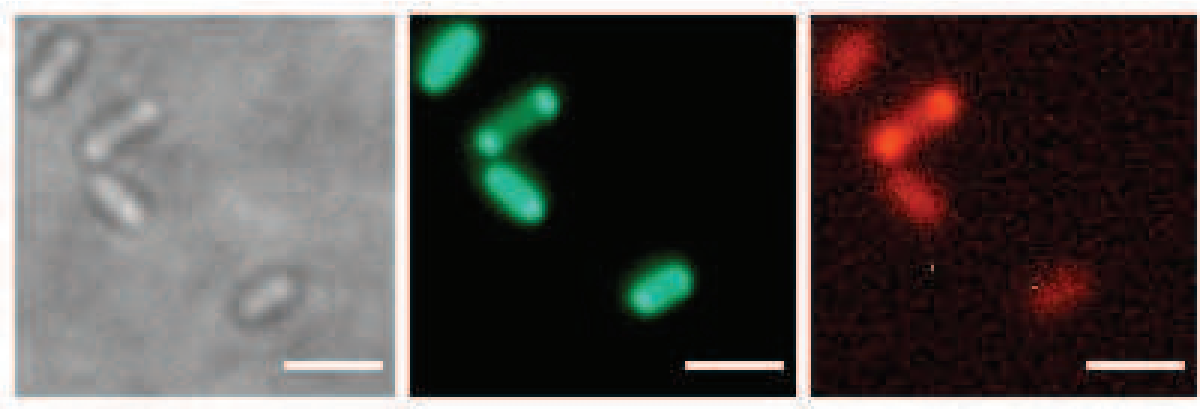


Figure 26 : Image de microscopie à épifluorescence de PvdAyfp et PchAmcherry.

Image de microscopie optique à épifluorescence de la souche *pvdAeyfp-pchAmcherry*. A gauche en champ blanc, au milieu l'image de fluorescence de YFP (PvdA) et à droite l'image de fluorescence mcherry (PchA) après 16 h de culture en milieu succinate. L'échelle représente 2 µm.

3.4 Étude du rôle des protéines codées par les gènes pchH et pchI

Lors de ma thèse, nous nous sommes longtemps interrogés sur l'implication des deux protéines codées par les gènes *pchH* et *pchI* dans la voie PCH et comment identifier leur(s) rôle(s). Pour cela, nous avons essayé d'une part de déléter ces deux gènes individuellement et d'autre part les deux gènes ensemble. Malheureusement, seule la délétion du gène *pchI* a abouti dans le temps que nous avons pu y consacrer.

Lors de la caractérisation de la souche Δ*pchI,* nous avons noté une augmentation de production de PCH d'un facteur trois : une souche sauvage produit environ 35 µM de PCH par unité de DO_{600nm} alors qu'une souche délétée pour *pchI* en produit environ 100 µM par unité de DO_{600nm} (Figure 27). Cette augmentation de production de PCH n'a pas lieu si cette délétion de *pchI* est réalisée dans une souche mutée pour la voie PVD (absence de production de PVD). De plus, nous avons observé que la croissance est affectée en absence de PchI (Figure 27).

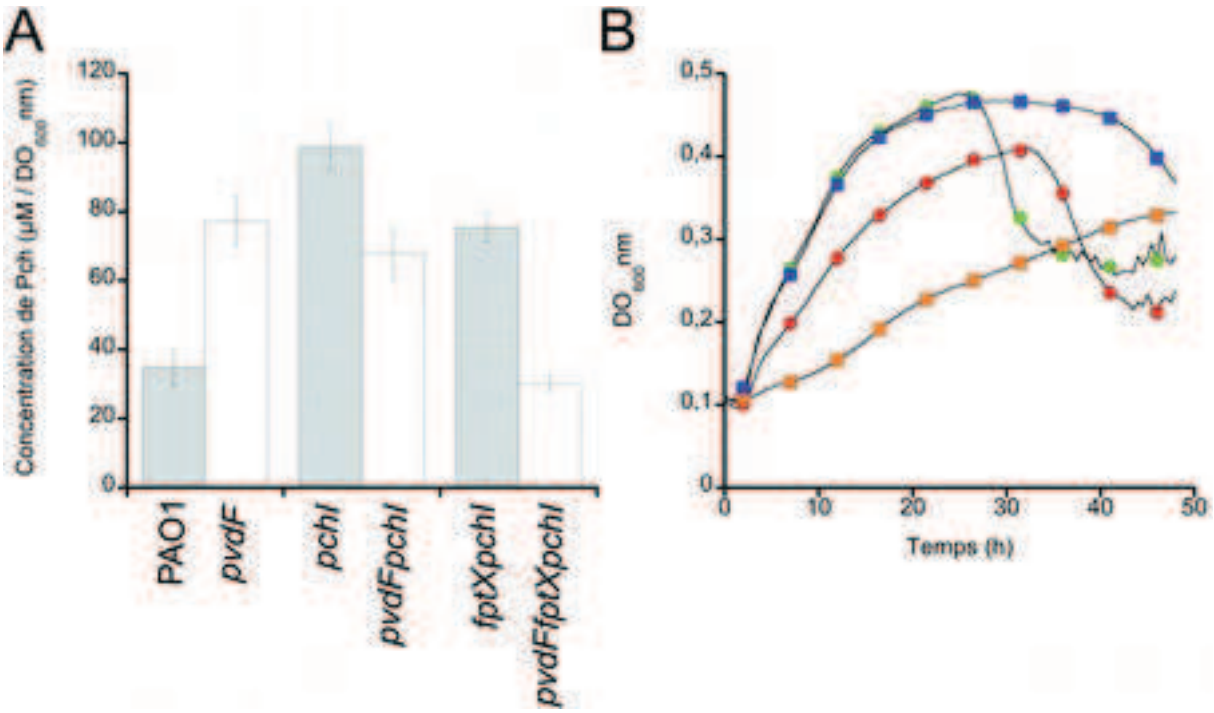
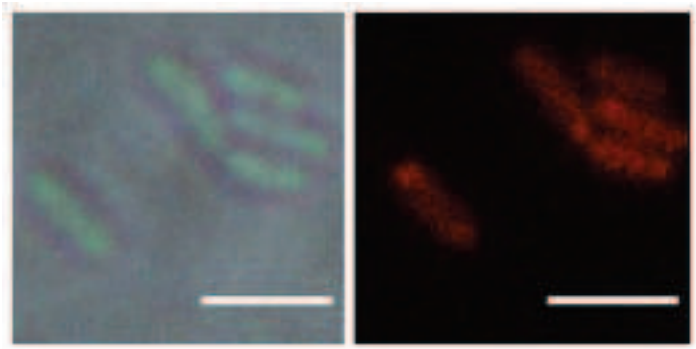


Figure 27 : Caractérisation des souches KO *pchI*.

(A) Production de pyochéline après une culture de 16 h en milieu succinate. Le surnageant est acidifié, puis l'ajout de dichlorométhane permet l'extraction de pyochéline de la phase aqueuse. (B) Suivi de croissance des souches PAO1 (points verts), Δ*pvdF* (carrés bleus), Δ*pchI* (points rouges) et Δ*pvdF*Δ*pchI* (carrés oranges) lors de la croissance bactérienne. Du milieu succinate est ensemencé à DO_{600nm} 0,1 et la croissance est ensuite mesurée au lecteur de microplaque pendant 48 h. Une mesure a été réalisée toutes les 30 min.

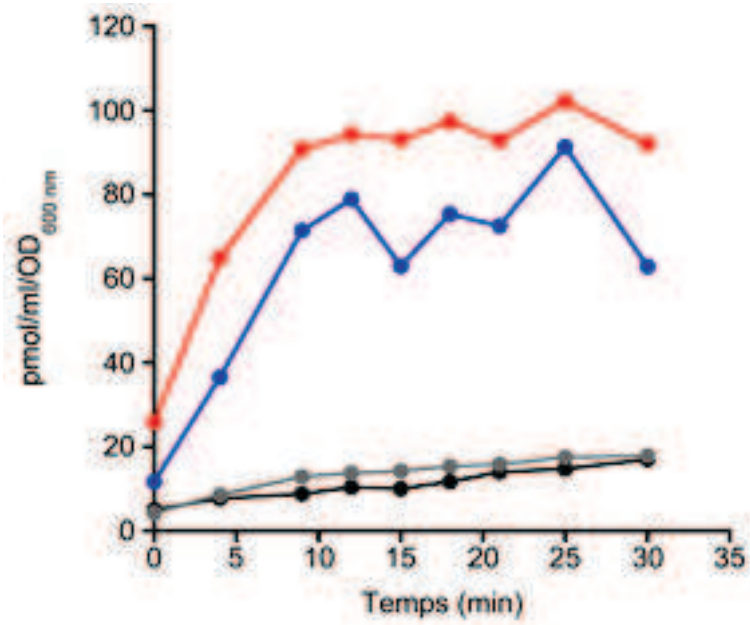
Cette surexpression de PCH nous a fait penser à un rôle dans la régulation dans la voie PCH et nous avons vérifié si PchI jouait un rôle dans la formation et la régulation du sidérosome de la PCH. Pour cela, nous avons délété *pchI* dans certaines souches exprimant les protéines PchA ou PchE de fusions fluorescentes impliquées dans la biosynthèse de la PCH (souches Δ*pvdF-pchAmcherry-*Δ*pchI* e t Δ*pvdF-pchEmcherry-*Δ*pchI*, Tableau Annexe 1). Les souches Δ*pvdF-pchAmcherry-*Δ*pchI* et Δ*pvdF-pchEmcherry-*Δ*pchI* ont été observées au microscope et aucun effet sur l'apparition et la quantité de spots fluorescents n'a été observé (Figure 28).



<u>Figure 28 :</u> Image de microscopie à épifluorescence de la souche *pchAmcherry-ΔpchI*.

Image de microscopie optique à épifluorescence de la souche *pchAmcherry-ΔpchI*. A gauche en champ blanc et à droite l'image de fluorescence mcherry (PchA) après 16 h de culture en milieu succinate. L'échelle représente 2 µm.

Lors des expériences de transport de fer radioactif réalisées pour déterminer l'implication de la perméase FptX dans l'acquisition de la PCH, nous avons pu voir que FptX n'est pas exclusif au transport via la membrane interne et nous nous sommes interrogés sur une éventuelle implication de PchI dans l'incorporation du complexe PCH_2-Fe. Les expériences de transport de fer radioactif montrent clairement que la délétion de *pchI* n'a, ici encore, aucun effet sur l'acquisition de la PCH (Figure 29).



<u>Figure 29 :</u> Transport de fer radioactif en complexe avec la pyochéline dans les souches *ΔpvdFΔpchA* et *ΔpvdFΔpchAΔpchI*.

Les cellules sont préparées comme décrit dans le Chapitre 9 – Matériel et Méthodes puis le transport du complexe PCH_2-Fe est initié par l'addition de ce complexe à 100 nM. Des échantillons (100 µL) sont pris à différents temps, centrifugés, les bactéries sont récupérées et la radioactivité y est mesurée. Les résultats sont exprimés en pmol de PCH_2-^{55}Fe transporté par millilitre de cellule à un DO_{600nm} de 1 : *ΔpvdFΔpchA* (bleu) et *ΔpvdFΔpchAΔpchI* (rouge). L'expérience a été répétée en présence de l'inhibiteur de la force protomotrice CCCP à 200 µM (*ΔpvdFΔpchA* (noir) et *ΔpvdFΔpchAΔpchI* (gris)).

4. Discussion

Dans cette première partie de thèse, nous avons essayé de mieux identifier et de mieux caractériser la fonction des gènes *pchI* et *pchH* se trouvant dans l'opéron *pch* sur le chromosome de *P. aeruginosa.* Concernant PchI, nous avons pu mettre en évidence que cette protéine n'est pas impliquée dans l'import de la PCH (Figure 29) ni dans la formation des spots fluorescents correspondants aux sidérosomes (Figure 28). De plus, nous avons vu que la délétion de cette protéine engendre une large surproduction de la PCH (Figure 27) indiquant un rôle possible de régulation pour cette protéine. De nombreuses questions restent encore à élucider concernant l'implication de PchI et de PchH dans la voie PCH. Est-ce un deuxième système de régulation ? Est-ce un système de régulation entre les voies PVD et PCH ? Est-ce que ces deux protéines PchH et PchI sont impliquées dans l'export de la PCH ? Il est en fait très difficile de démontrer l'implication des ces protéines dans la sécrétion de la PCH, car d'autres systèmes d'efflux, qui sont très nombreux chez *P. aeruginosa*, peuvent prendre le relais. Dans ce contexte, le groupe de C. Reimman a cloné les enzymes de biosynthèse de la PCH chez *E. coli* et a montré que cette bactérie est capable de synthétiser et de sécréter le sidérophore alors qu'aucun système d'efflux de *P. aeruginosa* n'a été cloné en parallèle (Michel *et al.* 2007).

Nous avons également déterminé la constante de dissociation du transporteur de membrane interne FptX pour le complexe PCH_2-Fe : K_d de 0,6 nM ± 0,2 nM. C'est la première affinité déterminée pour une protéine de cette famille vis-à-vis de sa molécule transportée. Cette affinité est du même ordre de grandeur que celle déterminée pour FptA (K_d de 0,5 nM) (Mislin *et al.* 2006). Ces affinités étant similaires, et en considérant que les taux d'expression de ces transporteurs sont identiques chez la bactérie, on peut supposer qu'aucune accumulation périplasmique du complexe PCH_2-Fe n'est possible et que ceux-ci sont directement délivrés au cytoplasme bactérien. Par ailleurs, la délétion de *fptX* chez *P. aeruginosa* entraîne une diminution de 50 % de l'accumulation intracellulaire du complexe PCH_2-^{55}Fe, confirmant l'implication de cette perméase dans l'acquisition du fer par la PCH, et indiquant qu'un autre système d'acquisition (qui n'implique pas PchI) peut prendre le relais. De même pour la voie PVD, l'absence du transporteur de membrane interne FpvCDEF inhibe de 50 % l'accumulation intracellulaire du complexe PVD-fer (Brillet *et al.* 2012). Le transporteur de la voie PVD a la particularité d'importer uniquement le fer et non le complexe PVD-fer, ce complexe se dissociant dans le périplasme avec un mécanisme impliquant une réduction du fer (Figure 14). Pour la voie PVD, il a été suggéré que le transporteur du fer ferreux FeoB pouvait prendre le relais pour l'import du fer vers le cytoplasme. Pour la voie PCH en revanche, qui nécessite un transport du complexe PCH_2-Fe à travers la membrane interne, aucun candidat n'a été identifié. Pour que le fer puisse être pris en charge par le transporteur FeoB dans le cadre de la voie PCH, le métal doit se dissocier du sidérophore dans le périplasme. Ce scénario

implique qu'il existerait une réductase pour la réduction du fer et/ou une estérase pour l'hydrolyse du sidérophore, permettant la dissociation du complexe PCH_2-Fe dans le périplasme de la bactérie. Aucun gène candidat pour ces fonctions n'a pu être identifié dans le génome de *P. aeruginosa*.

Dans cette première partie de thèse, nous avons également construit de très nombreuses souches exprimant des protéines de fusions fluorescentes des voies PCH et PVD. Ces outils nous ont permis d'étudier et de comprendre la distribution et l'organisation cellulaire des protéines de ces deux voies. Ces outils sont également très utiles pour suivre l'expression des protéines impliquées dans la biosynthèse de la PCH (grâce aux protéines de fusion PchAmcherry et PchEmcherry), dans l'import du complexe PCH_2-Fe (FptXmcherry) et la régulation de l'expression des deux opérons *pch* (grâce à mcherryPchR) en temps réel. De plus, étant donné que nous avons choisi une protéine de chaque opéron de *pch* (Figure 17), nous sommes capables d'étudier les différences d'expression et de répression entre ces différents opérons.

L'expression des protéines de la voie PCH est corrélée à la croissance bactérienne. En effet, en milieu carencé en fer, les protéines de biosynthèse et d'import de la PCH sont exprimées dès la phase exponentielle et leur expression est légèrement ralentie en phase stationnaire (Figure 3 B-C de l'article 1). En revanche, le régulateur, qui se trouve tout seul sur un opéron, est exprimé à un niveau basal tout au long de la croissance (Figure 3 B de l'article 1). Enfin, l'expression de toutes les protéines est réprimée de façon dose dépendante après ajout de fer au milieu de culture (Figure 3 D-F de l'article 1). Ce résultat suggère que la protéine régulatrice Fur réprime les quatre opérons de la voie PCH avec la même efficacité.

La localisation et la distribution cellulaires de la perméase FptX, enchâssée dans la membrane cytoplasmique, a également été étudiée avec la protéine de fusion FptXyfp. Nous avons pu voir qu'elle est distribuée de façon homogène dans cette membrane et sur toute la circonférence de la bactérie (Figure 4 A de l'article 1). Cette distribution suggère que l'acquisition du complexe PCH_2-Fe est possible sur l'ensemble de la surface de la membrane interne. Bien que nous n'ayons jamais réussi à marquer le transporteur de membrane externe FptA, il est fort probable qu'il soit également distribué de façon homogène dans la membrane externe sur toute la surface de la bactérie pour détecter et lier tout complexe PCH_2-Fe pouvant venir au contact de la bactérie. La distribution homogène de la perméase FptX signifie que le complexe PCH_2-Fe peut entrer dans le cytoplasme de n'importe quelle région du périplasme. Il n'est donc pas étonnant que le régulateur PchR soit lui aussi distribué de façon homogène à travers tout le cytoplasme de la bactérie. Cette organisation permet au régulateur d'interagir avec le complexe PCH_2-Fe dès son entrée dans le cytoplasme et ensuite avec l'ADN pour la régulation de l'expression des gènes.

Les souches exprimant des protéines de fusion fluorescentes PchAyfp et PchEyfp, nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un sidérosome pour la voie PCH comme nous l'avions montré précédemment pour la voie PVD chez *P. aeruginosa*. Ces sidérosomes qui sont des complexes multi-protéiques contenant toutes les enzymes de biosynthèse d'un sidérophore donné, sont associés à la membrane cytoplasmique. Ce concept a été plus étudié pour la voie PVD (Guillon *et al.* 2012; Guillon *et al.* 2013). Pour la voie PCH, nous avons montré que PchA est partiellement associée à la membrane interne (Figure 5 C de l'article 1) comme l'enzyme PvdA de la voie PVD (Guillon *et al.* 2012). En revanche, nous n'avons pas pu voir cette association pour PchE lors de notre expérience de fractionnement (Figure 5 D de l'article 1), alors qu'en microscopie nous voyons clairement un halo fluorescent (Figure 4 C de l article 1) signifiant une association membranaire. Nous supposons que cette association existe pour PchE, mais qu'elle n'est pas assez stable pour être mesurée dans nos conditions de fractionnement cellulaire. Pour PvdA de la voie PVD, la partie N-terminale, hydrophobe, a été identifiée comme étant responsable de cet ancrage dans la membrane. Pour PchA, une telle séquence n'a pas été identifiée, bien que 10 des 20 premiers résidus en N-terminal soient hydrophobes. De plus, lorsqu'on fusionne la protéine PchA par sa partie N-terminale avec une protéine de type GFP, elle n'est ni fluorescente, ni fonctionnelle (résultats non montrés), ce qui signifie que cette région est importante pour le bon fonctionnement de PchA. Des études *in vitro* plus poussées avec par exemple des délétions de la partie N-terminale de la protéine devront être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

Nous supposons que cette association à la membrane doit être un phénomène général pour toutes les enzymes de biosynthèse de la voie PCH comme cela a été mis en évidence pour la voie PVD. En effet, pour la voie PVD les quatre NRPS (PvdD, PvdI, PvdJ, PvdL) ainsi que l'enzyme PvdA sont partiellement associées à la membrane cytoplasmique et forment des spots fluorescents aux pôles des bactéries (Imperi and Visca 2013). Nous avons également mis en évidence la formation de spots fluorescents aux pôles des bactéries pour les protéines de fusion PchAyfp ou PchAmCherry et PchEyfp ou PchEmCherry. Ces spots ne sont probablement pas dus à de l'agrégation protéique, car des études de redistribution de fluorescence après photo-blanchiement (FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching) réalisées sur les protéines de fusion de la voie PVD montrent que les protéines dans les spots sont dynamiques : après un photo-blanchiement d'un spot de la bactérie, ce spot est reformé dans un intervalle de temps rapide (environ 2 secondes) (Guillon *et al.* 2013). D'autre part, l'ajout de fer à des bactéries ayant des spots fluorescents aux pôles entraîne une diminution rapide de ces spots. L'ensemble de ces résultats tend à démontrer que les spots fluorescents formés ne sont pas dus à l'agrégation de protéines mais doivent avoir une signification biologique. De plus, en absence de PchA, nous avons observé une diminution

significative des spots fluorescents formés par PchEmCherry. Ces résultats suggèrent également pour ces spots une réelle signification biologique et montrent que PchA pourrait être nécessaire à l'association à la membrane de PchE. Inversement, en absence de PchE aucun effet n'est observé sur l'association membranaire et la formation de spots de PchA. PchE pourrait donc être directement ou indirectement (par l'intermédiaire d'une tierce protéine) lié à PchA, elle-même liée à la membrane interne par une liaison plus forte. Ceci n'exclut pourtant pas une interaction où PchE interagirait directement avec la membrane interne associée à une interaction nécessitant PchA pour la stabiliser. Malheureusement, l'interaction entre PchA et PchE n'a pas pu être visualisée, ni par FRET, ni par immunoprécipation (Figure 24 et 25). L'absence de FRET n'exclut pas une proximité entre ces deux protéines. En effet, pour que le FRET soit efficace entre deux partenaires, il faut que les deux fluorophores soient bien orientés et distants de moins de 10 nm. Nous avons essayé de vérifier l'interaction entre PchA et les autres enzymes de biosynthèse de la PCH en purifiant PchA et en essayant ensuite d'identifier les protéines interagissant avec PchA sur une colonne d'affinité. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à purifier PchA, bien que nous ayons utilisé les protocoles de purification de PchA fournis par le laboratoire nous ayant procuré le plasmide de surexpression de PchA (Meneely *et al.* 2013).

Alors que nous n'avons pas pu visualiser directement d'interaction entre les protéines de biosynthèse de la voie PCH, l'ensemble des données obtenues suggère fortement l'existence d'un sidérosome pour la voie PCH, comme pour la voie PVD. Ce sidérosome a pour but de rapprocher les différentes protéines impliquées dans la biosynthèse du sidérophore dans la cellule bactérienne pour ainsi diminuer la diffusion non contrôlée à travers tout le cytoplasme des précurseurs de sidérophores qui pourraient y chélater le fer. Ce type d'organisation a pour conséquence d'augmenter l'efficacité de biosynthèse et ainsi de diminuer probablement le coût énergétique de la production du sidérophore. L'association des sidérosomes à la membrane cytoplasmique suggère que la biosynthèse des sidérophores est couplée à la sécrétion du sidérophore néo-synthétisé. Comme nous l'avons déjà mentionné, des sidérosomes ont été observées pour la voie PVD chez *P. aeruginosa* (Imperi *et al.* 2008; Guillon *et al.* 2012). Des études sur deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'entérobactine chez *E. coli* ont également mis en évidence une association partielle à la membrane cytoplasmique (Hantash and Earhart 2000). Des études utilisant des protéines de fusion fluorescentes chez un champignon (*Aspergillus fumigatus*) ont également montré des spots fluorescents localisés dans les péroxisomes pour les enzymes de la biosynthèse du sidérophore de ce champignon (Grundlinger *et al.* 2013). Tous ces résultats indiquent que les sidérophores seraient synthétisés dans des complexes multiprotéiques de type sidérosomes, et que cette organisation n'est pas restreinte à *P. aeruginosa* mais serait également présente chez d'autres bactéries ainsi que dans d'autres organismes comme les champignons. L'existence de ces

sidérosomes apporte une vision complètement nouvelle de la biosynthèse des sidérophores et peut-être de manière plus générale de la biosynthèse des métabolites secondaires sécrétés par les bactéries.

Chapitre 5

L'étude du métallome de *P. aeruginosa* dans différentes conditions de culture

1. Introduction

En raison de leurs différentes propriétés physico-chimiques et de leur abondance dans les milieux biologiques, les différents métaux du tableau périodique n'ont pas le même intérêt pour les bactéries. Un grand nombre d'études s'est intéressé aux différents mécanismes d'acquisition, de résistance, d'efflux et de régulation de la concentration des métaux dans les bactéries, sans vraiment connaître les concentrations de l'ensemble de ces différents métaux dans les bactéries. Une seule étude s'intéressant à la composition en métaux d'*E. coli* a été réalisée. En effet, Outten et O'Halloran ont mesuré la concentration des différents métaux dans *E. coli* cultivé dans deux conditions différentes (Outten and O'Halloran 2001). Nous avons voulu vérifier si la composition de ce métallome était similaire chez *P. aeruginosa*.

De plus, bien que l'implication des sidérophores dans l'homéostasie du fer ait clairement été mise en évidence, leur(s) rôle(s) dans l'homéostasie des autres métaux a(ont) été très peu vérifié(s). Par contre, il a été mis en évidence que les deux sidérophores, PCH et PVD, sont capables de chélater certains métaux avec des affinités allant jusqu'à $10^{26.9}$ M^{-2} pour le complexe PCH_2-Zn (Braud *et al.* 2009; Brandel *et al.* 2012). Au laboratoire, différentes études avaient fortement suggéré un rôle pour les sidérophores dans la résistance aux métaux toxiques chez *P. aeruginosa*. En revanche, jusqu'à présent aucune étude n'a porté sur l'implication des sidérophores de *P. aeruginosa* dans l'homéostasie du métallome en général. Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à la composition du métallome de *P. aeruginosa* dans différentes conditions de culture et à l'implication des sidérophores dans l'homéostasie du fer et dans l'homéostasie des autres métaux biologiques. Dans une dernière partie, nous avons voulu connaître l'effet d'une surcharge en métal biologique (Co, Ni, Cu Zn) ou en métal toxique (Cd, Pb) sur l'ensemble du métallome chez des souches capables ou non de produire les sidérophores PVD et PCH de *P. aeruginosa*.

2. Contribution des auteurs

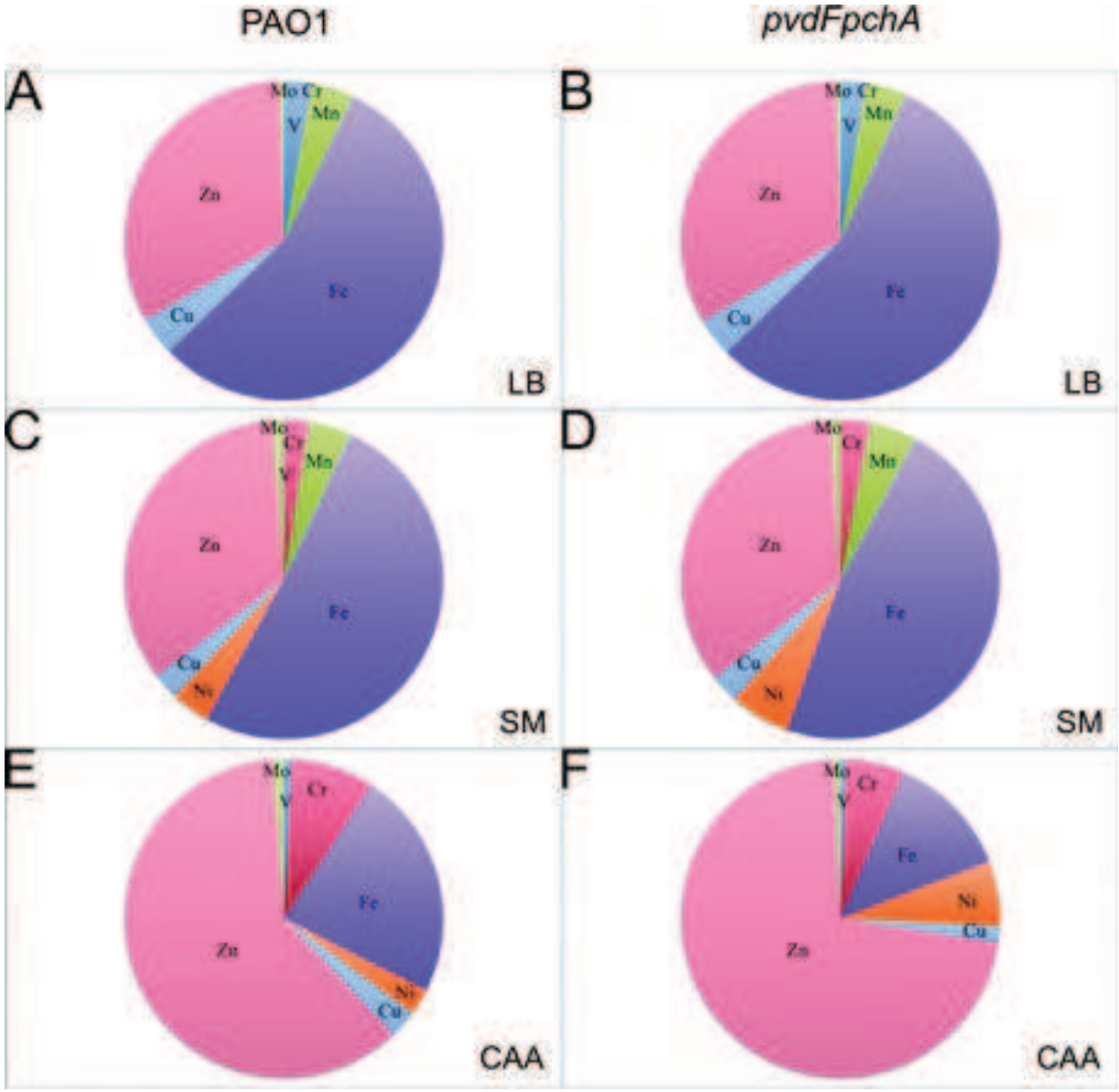
Ma contribution a été de réaliser l'ensemble des expériences de l'article. Les expériences d'ICP ont été réalisées sur la plateforme analytique à Cronenbourg. V. Geoffroy m'a initié à la préparation des bactéries pour les expériences d'ICP.

3. Résultats complémentaires (non publiés)

3.1 Proportion des métaux dans les différentes conditions de culture

Comme indiqué dans l'article N°3 ci-dessus, nous avons quantifié la composition en métaux des bactéries cultivées dans trois conditions différentes ; le métallome variant selon les différentes conditions (Figure 1 de l'article 3). Bien que nous ayons l'impression que les métallomes des cellules de *P. aeruginosa* cultivées dans les deux milieux pauvres en fer soient similaires, la proportion relative des métaux biologiques dans la bactérie est totalement différente (Figure 30). La représentation utilisée dans la Figure 30 montre que les proportions relatives des différents métaux entre le métallome des cellules cultivées en LB et en SM sont proches (bien que les quantités de métaux soient différentes, Figure 1A de l'article 3). En revanche, ces proportions relatives des différents métaux changent beaucoup pour le métallome des cellules cultivées en CAA. Dans ce cas, la faible concentration en fer dans ces cellules est apparemment la raison de cette perturbation (Figure 30). L'absence de production des sidérophores n'influence pas ces proportions relatives de métaux dans les métallomes des trois conditions de culture.

De plus, comme nous en avons discuté dans l'article ci-dessus, selon le milieu dans lequel la bactérie est cultivée, nous pouvons observer une grande différence dans le nombre d'atomes de fer présents par bactérie. Cette différence existe également pour tous les autres métaux et bien qu'elle ne soit pas aussi impressionnante que pour le fer, la différence pour le zinc par exemple représente tout de même 32 000 atomes par bactérie environ entre les bactéries qui ont été cultivées dans le milieu riche LB et celles cultivées dans le milieu CAA (Tableau 3).



<u>Figure 30 :</u> Proportion du métallome de *P. aeruginosa*.

Les proportions de métaux biologiques dans la bactérie cultivée dans différentes conditions de culture (LB, SM et CAA) sont représentées. (A) PAO1 en LB ; (C) PAO1 en SM ; (E) PAO1 en CAA ; (B) Δ*pvdF*Δ*pchA* en LB ; (D) Δ*pvdF*Δ*pchA* en SM et (F) Δ*pvdF*Δ*pchA* en CAA.

	Atomes/CFU max	Milieu	Concentration milieu	Atomes/CFU min	Milieu	Concentration milieu	Différence
Na	2,45E+08	SM	7,29E-02	1,15E+08	CAA	2,03E-02	130209926
Mg	8,57E+07	SM	6,69E-04	2,74E+07	LB	8,21E-05	58297964
K	4,05E+08	SM	8,56E-02	9,05E+07	CAA	1,25E-02	314067460
Ca	1,97E+07	LB	9,85E-05	4,90E+05	SM	2,12E-06	19249544
V	4,05E+04	LB	4,91E-07	2,51E+02	SM	*9,58E-08*	40212
Cr	2,20E+04	CAA	5,77E-08	1,48E+03	LB	8,08E-08	20563
Mn	6,21E+04	LB	1,42E-07	1,50E+04	SM	*1,43E-06*	47088
Fe	8,09E+05	LB	4,34E-06	6,02E+04	CAA	2,15E-08	749283
Ni	1,38E+04	SM	3,75E-08	6,85E+03	CAA	8,58E-08	6928
Cu	5,78E+04	LB	1,52E-07	7,43E+03	CAA	*2,61E-08*	50369
Zn	4,80E+05	LB	1,53E-05	1,58E+05	CAA	5,17E-07	321319
Mo	6,26E+03	LB	7,37E-08	2,82E+03	CAA	8,76E-08	3436

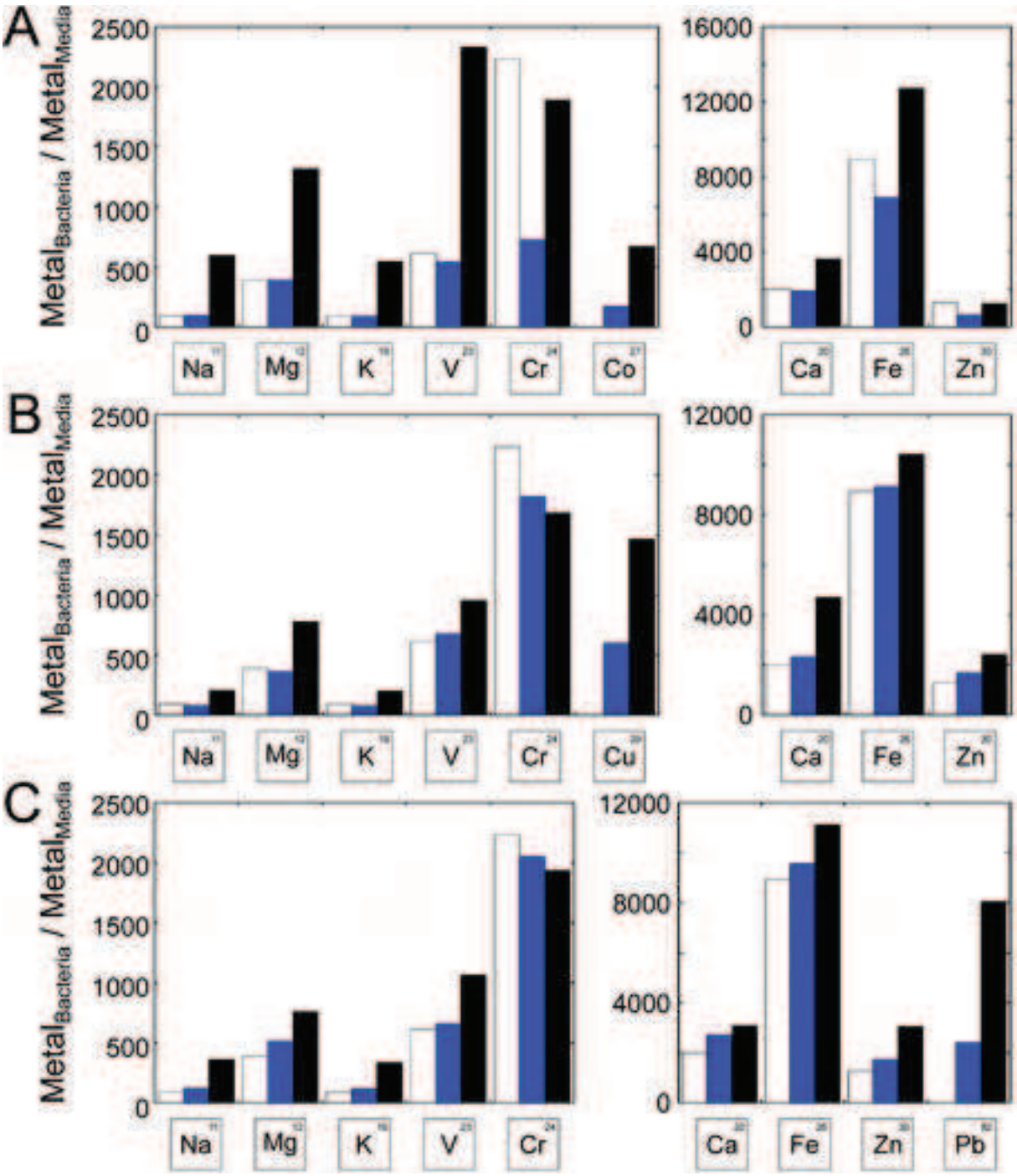
Tableau 3 : Différence de composition en métaux des bactéries cultivés en milieuxLB, SM et CAA de PAO1 (*P. aeruginosa*).

En cas d'incapacité de détecter le métal les limites de détection ont été ajoutées en italique.

3.2 Le métallome de la bactérie en présence d'un excès de métal

Dans l'article, nous avons présenté les perturbations du métallome en présence d'un excès de Ni et de Cd. Bien que moins impressionnantes, nous avons également observé des perturbations du métallome en présence d'un excès de Co, Cu et Zn (Figure 31). Ici encore nous pouvons voir qu'en absence de sidérophores, la bactérie accumule non seulement une plus grande quantité du métal que nous avons ajouté en excès, mais accumule également en plus forte concentration les autres métaux composant le métallome. L'excès de Co modifie les concentrations intracellulaires de Cr, Fe et Zn dans la souche sauvage et ceci est encore accentué davantage pour la souche ne produisant pas de sidérophores. L'excès de Cu ne perturbe pas beaucoup la concentration des différents métaux composant le métallome de la souche PAO1, alors que dans la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* la concentration de la majorité des métaux est modifiée. Enfin, en présence d'un excès de Pb, la bactérie accumule une très grande quantité de ce métal ce qui ne perturbe que légèrement le métallome de PAO1 mais d'une manière plus significative le métallome de la souche ne produisant pas de sidérophores.

L'expérience n'a pas été faite en excès de Fe. Le fer, de part sa solubilité, précipite à faible concentration et il n'a donc pas été possible de réaliser cette expérience.



<u>Figure 31 :</u> Facteurs de concentration du métallome de *P. aeruginosa* en présence d'un excès de métal (Co, Cu et Pb).

Les bactéries ont été cultivées en milieu CAA en présence d'un excès de (A) 5 µM de Co (B) 5 µM de Cu ou (C) 1 µM de Pb et la concentration des métaux a été mesurée par ICP-AES. L'expérience a été réalisée avec PAO1 en absence de métal (barre blanche) et en présence d'un excès de métal (barre bleue) ainsi qu'avec la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* en présence d'un excès de métal (barre noire).

4. Discussion

L'étude du métallome de *P. aeruginosa* nous a permis d'obtenir la composition métallique générale de cette bactérie cultivée dans des conditions de laboratoire. Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence que le métallome de *P. aeruginosa* est similaire à celui d'*E. coli* et par extension nous pouvons penser qu'il est probablement commun à un plus grand ensemble de familles de bactéries. Ainsi le classement des métaux en quatre groupes proposé pour *E. coli* (Outten and O'Halloran 2001; Nies and Silver 2007), a également pu être validé pour *P. aeruginosa*. Les métaux Na, Mg, K et Ca, présents en fortes concentrations dans la bactérie forment le premier groupe et représentent la plus grande partie du métallome de la bactérie. Dans le deuxième groupe, représenté par les éléments traces ou métaux appelés biologiques, nous avons trouvé chez *P. aeruginosa* : le V, le Mn, le Fe, le Ni, le Cu, le Zn et le Mo. Comme pour *E. coli,* le Fe et le Zn constituent la majeure partie des métaux de transition dans la bactérie. En revanche, concernant ce groupe quelques différences avec le métallome d'*E. coli* ont été observées. Dans aucune des trois conditions de culture de *P. aeruginosa*, le Co n'a été détecté à l'intérieur de la bactérie. On peut donc supposer que ce métal n'est pas essentiel pour *P. aeruginosa.* Le V représente environ 3 % des métaux de transition trouvés dans les bactéries cultivées en LB et 1-2 % des métaux de transition lorsque les cultures sont réalisées en SM et CAA, suggérant que ce métal pourrait être utilisé dans le métabolisme de la bactérie. Afin de bien répondre à ces questions, il serait intéressant d'envisager de cultiver la bactérie dans un milieu synthétique carencé uniquement en un seul métal et de voir si l'ajout de ce métal peut induire une augmentation de croissance de la bactérie. Si en carence totale de Co, par exemple, l'ajout de Co n'a pas d'effet sur la croissance, on peut clairement affirmer que le Co n'est pas essentiel pour *P. aeruginosa*. Le troisième groupe, les éléments essentiellement toxiques, est constitué des métaux tels que Co et Cr. Le quatrième groupe proposé par Outten et O'Halloran (Outten and O'Halloran 2001) est constitué de tous les autres métaux qui sont toxiques pour les organismes vivants. Dans notre étude nous n'avons pas cherché à détecter ces métaux chez *P. aeruginosa.*

Nous avons montré également que la concentration et la proportion relative des différents métaux composant le métallome de *P. aeruginosa* varie en fonction du milieu de culture. En effet, bien que la concentration totale en métaux de transition soit différente entre les bactéries cultivées en LB ($1{,}5.10^6$ atomes/CFU) et celles cultivées en SM ($3{,}5.10^5$ atomes/CFU), les proportions relatives de ces différents métaux sont très similaires (par exemple, le Fe représente respectivement 56 et 51 % des métaux de transition pour le LB et le SM). En revanche, la différence pour les bactéries cultivées dans les milieux SM et CAA ne se situe pas au niveau de la concentration totale en métaux de transition (respectivement $3{,}5.10^5$ et $2{,}6.10^5$ atomes/CFU pour les bactéries cultivées

en milieu SM et CAA) mais au niveau des proportions relatives entre les métaux de transition (par exemple, le Fe représente respectivement 51 et 23 % en SM et CAA).

Notre étude a également permis de mettre en évidence une variation très importante des facteurs de concentration (variation entre la concentration intracellulaire (dans *P. aeruginosa*) du métal et la concentration extracellulaire (dans le milieu de culture)). Ces variations sont dépendantes du milieu de culture et du métal. Ce sont les valeurs des facteurs de concentration du fer qui ont été les plus impressionnantes. En effet, pour ce métal, la bactérie semble avoir développé des systèmes d'acquisition qui peuvent fonctionner dans des gammes de concentrations de métal très variées allant de milieux riches en fer à des milieux très carencés. Ces facteurs de concentrations vont bien sûr être proportionnels à l'énergie dépensée par la bactérie pour acquérir ces différents métaux. Nos résultats démontrent clairement que la bactérie dépensera plus d'énergie dans l'acquisition du fer comparé à l'acquisition d'ions comme le Na et le K.

La quantification des métaux présents dans les milieux de culture, nous a également permis de corréler la concentration de fer extracellulaire à la quantité de sidérophores produits par les bactéries. Dans nos conditions de culture, à une concentration de 320 nM en fer (en SM) le sidérophore majoritairement synthétisé par les bactéries est la PCH, alors qu'en plus grande carence en fer (21nM de fer en CAA) la production de PCH reste inchangée et celle de la PVD est fortement activée (Figure 2 dans l'article 3).

Notre étude a montré une très forte différence dans la concentration intracellulaire des différents métaux et en particulier dans le cas du fer pour les bactéries cultivées en milieu LB comparé à celles cultivées en CAA : respectivement 4,2 10^{-3} et 3,6 10^{-4} mol/L de fer pour les milieux LB et CAA. Cette différence est probablement liée à la capacité de stockage des métaux qu'a développé *P. aeruginosa*. Dans le cas du fer, des ferritines ont été identifiées comme responsables du stockage du fer, avec 4 500 atomes de Fe stockés par ferritine (Yao *et al.* 2011; Rui *et al.* 2012). En considérant la différence de concentration intracellulaire en fer entre les bactéries cultivées en milieux LB (8 10^5 Fe/CFU) et CAA (6 10^4 Fe/CFU), 165 ferritines seraient mobilisées pour stocker cette quantité de fer. Dans ce calcul, nous supposons que le fer supplémentaire acquis par les bactéries en milieu riche est stocké à
100 %. Une autre manière de stocker le fer et les autres métaux pour lesquels aucune protéine de stockage n'a été identifiée chez *P. aeruginosa* serait de posséder un plus grand nombre de métalloprotéines et métalloenzymes, liant et utilisant ces métaux. Cette réserve en métalloprotéines pourrait permettre à la bactérie une croissance plus rapide, mais pourrait également être transmise aux cellules filles après division. A mon avis, le stockage des métaux dans les métalloprotéines (autre que les protéines dédiées uniquement au stockage comme la ferritine) représente un plus grand intérêt pour la bactérie, car il s'agit de métalloprotéines déjà prêtes à être utilisées.

Nous avons été surpris de voir que l'absence de sidérophores n'avait qu'un léger effet sur l'homéostasie du métallome en conditions de culture classiques. Même l'effet des sidérophores sur l'homéostasie du fer n'a pas été très impressionnant, montrant que même en absence de production de PVD et PCH, la bactérie arrive à subvenir à ses besoins en fer par un système compensatoire. Ce résultat a été à l'origine d'une étude protéomique décrite dans le prochain chapitre, avec comme objectif d'identifier cette voie d'acquisition du fer. En revanche, nous avons pu confirmer l'implication des sidérophores dans la protection ou la résistance des bactéries en présence d'un excès de métaux dans le milieu de culture. En effet, comme ceci a déjà été suggéré (Braud *et al.* 2010), les sidérophores jouent dans le cadre d'une contamination métallique (métaux biologiques en excès ou métaux purement toxiques) un rôle protecteur en chélatant ces métaux pour éviter ainsi leur diffusion passive dans la bactérie à travers les porines. Il est également intéressant de remarquer que lors de telles contaminations métalliques, le profil du métallome et plus particulièrement la concentration de chaque métal composant le métallome est plus affecté dans une souche incapable de produire des sidérophores que dans une souche sauvage. Les sidérophores auraient donc en plus de leur capacité à amener le fer dans la bactérie, un rôle dans la résistance aux métaux en évitant l'accumulation du métal contaminant et en préservant ainsi la composition et le profil du métallome.

Chapitre 6

L'étude du proétome de *P. aeruginosa* dans différentes conditions de culture

1. Introduction

Dans le chapitre précédent (article 3) nous avons montré que la composition en métaux et l'énergie mis en œuvre par la bactérie pour acquérir ces métaux sont variables selon les conditions de culture. Ceci implique une adaptation de *P. aeruginosa* aux différentes conditions de culture, qui doit se traduire par une expression protéique différente et qui se module selon que le milieu soit carencé en nutriments ou non.

De nombreuses études protéomiques ont déjà été réalisées en comparant les différents taux d'expression des protéines chez les bactéries Gram négatives (entre autres chez *P. aeruginosa*) entre des milieux de cultures riches et carencés en fer (Llamas *et al.* 2008; Hare *et al.* 2012; Hare *et al.* 2012). Mais suite aux résultats obtenus lors de l'étude du métallome de *P. aeruginosa*, nous avons voulu identifier les protéines et en particulier les protéines de transport membranaire exprimées dans nos conditions de culture. De plus, par cette approche nous voulions identifier le système d'acquisition du fer de *P. aeruginosa* qui est capable de compenser l'absence de sidérophores.

L'ensemble des expériences de protéomique a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Dirk Bumann au Biozentrum à Bâle.

2. Résultats

2.1 Le protéome de P. aeruginosa dans différentes conditions de culture

Parallèlement à l'étude du métallome, nous nous sommes intéressés à la composition protéique des bactéries cultivées dans les conditions utilisées pour l'étude métallomique et nous avons plus particulièrement essayé d'identifier le système d'acquisition du fer mis en jeu en absence de production des sidérophores PVD et PCH. En effet, suite aux résultats obtenus lors de l'étude du métallome, nous avons pu voir qu'en absence de production de sidérophores, les bactéries arrivent à maintenir leur concentration intracellulaire en fer à un niveau quasiment équivalent à celle observée dans des cellules productrices de sidérophores. Nous avons donc supposé qu'un autre système d'acquisition du fer devait prendre le relais. Cette étude protéomique a été réalisée en collaboration avec le laboratoire dirigé par Dirk Bumann au Bionzentrum à Bâle. Les bactéries ont été cultivées dans les trois milieux de culture utilisés pour l'étude métallomique et récoltées par centrifugation en fin de phase exponentielle comme pour l'analyse métallomique. L'ensemble des données est joint en annexe (Tableau Annexe 6).

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines impliquées dans la voie PCH (Tableau 4) et PVD (Tableau 5) dans la souche sauvage PAO1 et la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* ne produisant pas ces deux sidérophores. Nous pouvons voir que pour la souche sauvage PAO1, ces deux voies ne sont pas actives en LB. En revanche, en conditions pauvres en fer, SM (milieu succinate) et CAA, les protéines des deux voies, PCH et PVD, sont exprimées.

			PAO1			**Δ*pvdF*Δ*pchA***		
Pyochéline			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
fptX	PA4218	*15599414*	0	1	1	0	1	1
fptC	PA4219	*15599415*	0	0	0	0	0	0
fptB	PA4220	*15599416*	0	2	0	0	1	1
fptA	PA4221	*15599417*	3	22	24	0	16	25
pch H	PA4222	*15599418*	0	5	7	0	3	7
pchI	PA4223	*15599419*	0	6	5	0	6	6
pch G	PA4224	*15599420*	0	6	6	0	5	5
pchF	PA4225	*15599421*	2	15	22	0	10	27
pchE	PA4226	*15599422*	1	19	27	0	17	32
pchR	PA4227	*15599423*	0	1	1	0	1	1
pch D	PA4228	*15599424*	1	5	7	0	5	11
pch C	PA4229	*15599425*	0	0	0	0	0	3
pchB	PA4230	*15599426*	5	5	2	0	4	4
pchA	PA4231	*15599427*	1	3	2	0	0	0

Tableau 4 : Expression des protéines de la voie PCH chez PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* en milieux LB, SM et CAA (*P. aeruginosa*).

Les bactéries sont cultivées en LB, SM ou CAA et prélevées en fin de phase exponentielle. Des analyses protéomiques utilisant la méthode « Shotgun » permettent la détection d'une grande partie des protéines bactériennes. La première colonne correspond au nom du gène. La deuxième colonne représente le numéro du gène chez PAO1 et la troisième le numéro *gi* de la protéine. Les valeurs représentent le nombre de spectres identifiés de chaque protéine.

			PAO1			***ΔpvdFΔpchA***		
Pyoverdine			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
pvdQ	PA2385	*15597581*	0	9	9	0	7	8
pvdA	PA2386	*15597582*	0	16	15	0	16	19
fpvI	PA2387	*15597583*	0	1	0	0	1	0
fpvR	PA2388	*15597584*						
pvdR	PA2389	*15597585*	0	5	10	0	5	6
pvdT	PA2390	*15597586*	0	3	5	0	5	5
opm Q	PA2391	*15597587*	0	3	6	0	4	4
pvdP	PA2392	*15597588*	0	7	5	0	5	3
pvdM	PA2393	*15597589*	1	8	9	0	8	9
pvdN	PA2394	*15597590*	0	7	6	0	4	5
pvdO	PA2395	*15597591*	0	1	2	0	2	2
pvdF	PA2396	*15597592*	0	2	2	0	0	0
pvdE	PA2397	*15597593*	0	7	6	0	6	5
fpvA	PA2398	*15597594*	1	21	18	0	21	17
pvdD	PA2399	*15597595*	0	19	22	0	16	18
pvdJ	PA2400	*110227056*	0	26	24	0	22	22
pvdI	PA2402	*15597598*	0	46	58	0	43	50
fpvG	PA2403	*15597599*	0	1	1	0	1	1
fpvH	PA2404	*15597600*	0	0	0	0	0	0
fpvJ	PA2405	*15597601*	0	0	0	0	0	1
fpvK	PA2406	*15597602*	0	0	1	0	1	1
fpvC	PA2407	*15597603*	1	4	2	0	3	2
fpvD	PA2408	*15597604*	0	0	0	0	0	0
fpvE	PA2409	*15597605*						
fpvF	PA2410	*15597606*	1	2	4	0	3	3
	PA2411	*15597607*	0	3	2	0	3	2
	PA2412	*15597608*						
pvdH	PA2413	*15597609*	0	17	17	0	15	19
pvdL	PA2424	*15597620*	0	49	64	0	46	50
pvdG	PA2425	*15597621*						
pvdS	PA2426	*15597622*	0	0	0	0	1	0
fpvB	PA4168	*15599363*	0	5	5	0	4	5

Tableau 5 : Expression des protéines de la voie PVD chez PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* en milieux LB, SM et CAA (*P. aeruginosa*).

La première colonne correspond au nom du gène. La deuxième colonne représente le numéro du gène chez PAO1 et la troisième le numéro *gi* de la protéine. En rouge sont représentées les protéines qui n'ont pas été détectées avec cette approche. Les valeurs représentent le nombre de spectres identifiés de chaque protéine.

Afin d'identifier le système d'acquisition du fer mis en jeu par les mutants de *P. aeruginosa* incapables de produire les sidérophores PVD et PCH et cultivés en conditions carencées en fer (milieu SM et CAA), nous nous sommes intéressés à tous les autres systèmes d'acquisition du fer

connus chez cette bactérie (voir pages 54-61 dans l'introduction bibliographique) et à leurs niveaux d'expression dans ces conditions de culture (Tableau 6). Nous avons vu que la voie du citrate n'est exprimée dans aucune des conditions de culture testées. Pour la souche PAO1, cultivée en LB, la bactérie utilise principalement le système d'acquisition du fer ferreux et probablement la perméase HitB, étant donné que la protéine de liaison périplasmique HitA est exprimée. En conditions pauvres en fer, PAO1 utilise principalement les deux sidérophores endogènes PCH et PVD, mais exprime tout de même un certain nombre d'autres protéines telles les systèmes d'acquisition d'hème, de fer *via* l'entérobactine et *via* d'autres sidérophores exogènes, bien que nous n'avions introduit ni hème ni entérobactine dans notre milieu de culture. Pour la souche Δ*pvdF*Δ*pchA,* l'expression d'aucune voie d'acquisition du fer n'est spécialement induite et nous n'avons donc malheureusement pas pu identifier le système qui permet l'acquisition du fer en l'absence de sidérophores.

			PAO1			**Δ*pvdF*Δ*pchA***		
Citrate			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
	PA3899	*15599094*						
fecR	PA3900	*15599095*	0	0	0	0	0	0
fecA	PA3901	*15599096*	0	0	0	0	0	0
Fe2+								
feoC	PA4357	*15599553*						
feoB	PA4358	*15599554*	3	0	0	0	0	0
feoA	PA4359	*15599555*						
Hème								
	PA4705	*15599899*						
	PA4706	*15599900*	0	0	0	0	0	0
	PA4707	*15599901*	0	0	0	0	0	0
phuT	PA4708	*15599902*	0	7	8	0	7	8
phuS	PA4709	*15599903*	0	3	4	0	2	4
phuR	PA4710	*15599904*	0	12	13	0	18	15
	PA3404	*15598600*	0	0	0	0	0	0
hasE	PA3405	*15598601*						
hasD	PA3406	*15598602*						
hasAp	PA3407	*15598603*						
hasR	PA3408	*15598604*	0	2	5	0	3	4
Entérobactine								
pirA	PA0931	*15596128*	0	7	5	0	5	6
pfeR	PA2686	*15597882*	0	0	0	0	0	0
pfeS	PA2687	*15597883*	0	0	1	0	2	1
pfeA	PA2688	*15597884*	0	0	1	0	1	3
	PA2689	*15597885*	0	0	0	0	0	0
	PA2690	*15597886*						
	PA2691	*15597887*	0	0	2	0	0	3
fepC	PA4158	*15599353*	0	0	0	0	0	0
fepB	PA4159	*15599354*	0	2	1	0	1	1
fepD	PA4160	*15599355*						
fepG	PA4161	*15599356*						
Ferrioxamine								
foxA	PA2466	*15597662*	0	1	0	0	1	2

foxI	PA2467	*15597663*	0	0	1	0	0	1
foxR	PA2468	*15597664*						
Ferrichrome								
fiuA	PA0470	*15595667*	0	0	0	0	0	1
	PA0471	*15595668*	0	0	2	0	0	0
fiuI	PA0472	*15595669*	0	0	0	0	0	0
Autres Fe								
hitA	PA4687	*15599882*	7	4	5	4	5	4
hitB	PA4688	*15599883*						
	PA5216	*15600409*						
	PA5217	*15600410*	0	1	2	0	2	1
	PA5218	*15600411*						
Ferritine								
bcp	PA1008	*15596205*	0	3	2	0	2	2
bfp	PA3530	*15598726*						
bfrB	PA3531	*15598727*	1	1	1	1	1	1
ftnA	PA4235	*15599431*	1	1	1	1	2	3
	PA4880	*15600073*	3	0	0	2	0	0
Aerobactine/ Rhizobactine 1021/ Schizokinen								
chtA	PA4675	*15599870*	1	2	3	0	3	3
Vibriobactine								
fvbA	PA4156	*15599351*	0	1	4	0	0	2
Mycobactine								
femA	PA1910	*15597106*	0	0	0	0	1	0
femR	PA1911	*15597107*						
femI	PA1912	*15597108*						
Régulation								
fur	PA4764	*15599958*	1	1	3	1	1	3

Tableau 6 : Expression des protéines impliquées dans l'acquisition du fer chez PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* en milieux LB, SM et CAA (*P. aeruginosa*).

La première colonne correspond au nom du gène. La deuxième colonne représente le numéro du gène chez PAO1 et la troisième le numéro *gi* de la protéine. En rouge sont représentées les protéines qui n'ont pas été détectées avec cette approche. Les valeurs représentent le nombre de spectres identifiés de chaque protéine.

Dans le cadre de cette étude protéomique, nous avons également voulu caractériser la composition protéomique de la membrane externe. Les protéines de membrane externe ont une structure en feuillet β et sont relativement bien détectées dans des études protéomiques. L'import dans la bactérie de tous les métaux biologiques impliquent des transporteurs de membranes externes : des TBDTs pour le fer et des porines pour les autres métaux. Nous avons cherché à connaître le niveau d'expression de toutes les porines identifiées chez *P. aeruginosa* ainsi que de tous les TBDTs identifiés (Tableau 7). Nous pouvons voir que cette composition en transporteurs de la membrane externe varie significativement selon le milieu de culture. En effet, en conditions riches en fer (LB), les porines représentent plus de 90 % des protéines de transport de la membrane externe. En LB, les bactéries expriment principalement des porines, permettant d'acquérir les nutriments et les porines les plus exprimées sont OprF (61 %), OprQ (11 %) et OprD (9 %) alors

que les TBDTs FpvA et FptA représentent seulement 1 et 3 % respectivement des protéines totales de la membrane externe. En conditions pauvres en fer, la bactérie a besoin de concentrer activement ce précieux métal qu'est le fer, et met ainsi en jeu différents transporteurs TBDTs. Ces derniers représentent environ 50 % des protéines totales de la membrane externe lorsque *P. aeruginosa* PAO1 est cultivé en milieux SM et en CAA (Figure 32). Bien que la quantité de porines présentes dans les membranes externes ne soit pas réduite drastiquement dans des conditions de cultures en milieux SM et CAA, les TBDTs sont largement surexprimés comparé aux conditions de culture en LB. La quantité de transporteurs protéiques présents dans la membrane externe est donc largement augmentée en conditions carencées en fer. Les TBDTs majoritaires sont FptA (14 % des protéines totales de la membrane externe) pour l'acquisition de la PCH ainsi que FpvA (13 %) et FpvB (3 %) pour l'acquisition de la Pvd. Bien qu'aucune molécule d'hème n'ait été ajoutée aux deux milieux pauvres en fer, la bactérie exprime les transporteurs d'hème PhuR (8 %) et HasR (1 %). Le transporteur de l'entérobactine PirA (4 %) est également surexprimé dans ces deux conditions. Ces proportions de TBDTs dans la membrane externe varient très peu entre la souche sauvage PAO1 et le mutant Δ*pvdF*Δ*pchA* incapable de produire la PVD et la PCH. Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, cette absence de différence dans le protéome de la membrane externe de ces deux souches ne nous a pas permis d'identifier la voie d'acquisition du fer utilisée par le mutant Δ*pvdF*Δ*pchA* cultivé en milieu carencé en fer.

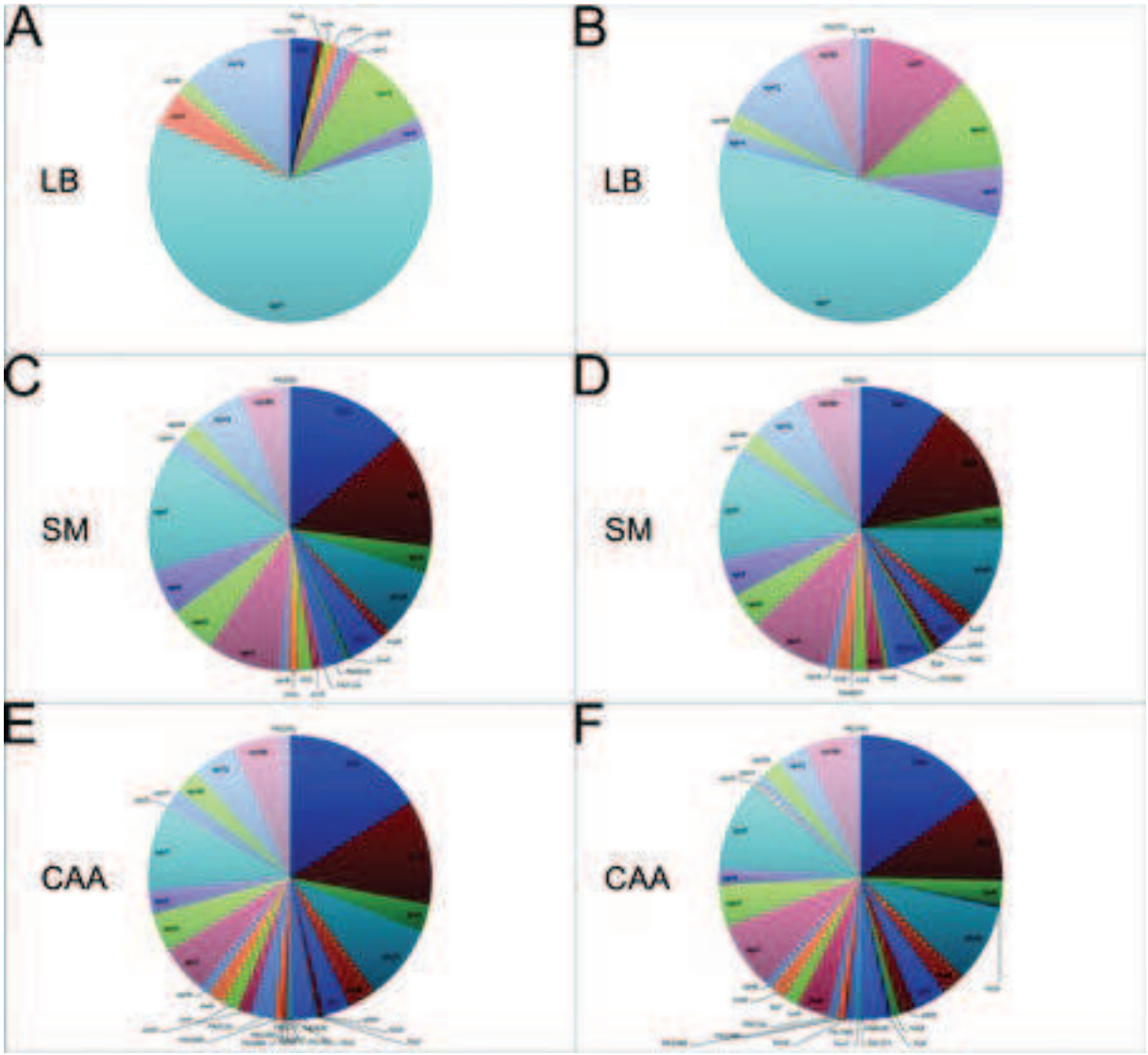


Figure 32 : Composition de la membrane externe en protéines de transport et en porines chez *P. aeruginosa* en milieux LB, SM et CAA.

Composition protéique de (A) PAO1 en LB ; (B) Δ*pvdF*Δ*pchA* en LB ; (C) PAO1 en SM ; (D) Δ*pvdF*Δ*pchA* en SM ; (E) PAO1 en CAA et (F) Δ*pvdF*Δ*pchA* en CAA.

Nous nous sommes également intéressés à l'expression des systèmes d'acquisition des autres métaux dans les trois conditions de culture, toujours en comparant l'expression dans la souche sauvage PAO1 et la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* ne produisant pas de sidérophores. Ces transporteurs comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique sont essentiellement localisés dans la membrane interne. En raison de la difficulté de détecter les protéines de membrane interne avec la méthode utilisée, l'expression d'une partie des transporteurs de membrane interne n'a pas pu être quantifiée. Néanmoins, nous avons pu voir que les bactéries cultivées en milieu LB expriment une quantité plus importante de transporteurs MtgA et MgtE (impliqués dans l'acquisition du magnésium) que celles cultivées en milieu SM ou CAA, ceci s'expliquant par la différence de concentration en Mg dans ces milieux. (LB : 82µM ; SM : 670µM ; CAA : 1mM)

De plus, dans la souche Δ*pvdF*Δ*pchA*, nous avons pu observer une légère surexpression de la porine OprC.

			PAO1			Δ*pvdF*Δ*pchA*		
Autres métaux			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
Porines								
oprC	PA3790	*15598985*	2	14	8	10	16	13
oprQ	PA2760	*15597956*	12	10	8	9	10	6
Transporteur de membrane interne								
corA	PA5268	*15600461*	0	0	0	2	0	0
hmtA	PA2435	*15597631*						
mgtA	PA4825	*15600018*	13	5	7	19	6	7
mgtE	PA0913	*15596110*	4	1	0	0	1	1
modA	PA1863	*15597060*	0	0	0	0	0	0
modB	PA1862	*15597059*						
modC	PA1861	*15597058*						
mod D	PA1860	*15597057*	2	1	0	2	1	0
znuA	PA5498	*15600691*	0	1	0	0	1	0
znuB	PA5501	*15600694*						
znuC	PA5500	*15600693*						
Régulateur								
zur	PA5499	*15600692*	0	2	1	0	2	1

Tableau 7 : Expression des protéines impliquées dans l'acquisition des métaux chez PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* en LB, SM et CAA.

La première colonne correspond au nom du gène. La deuxième colonne représente le numéro du gène chez PAO1 et la troisième le numéro *gi* de la protéine. En rouge sont représentées les protéines qui n'ont pas été détectées avec cette approche. Les valeurs représentent le nombre de spectres identifiés de chaque protéine.

2.2 L'activation de l'expression des voies PVD et PCH dans la souche ΔpvdFΔpchA

Lors de cette étude protéomique, nous avons observé que les protéines de la voie PVD et PCH sont exprimées dans la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* en conditions de culture carencées en fer. En effet, bien que les deux voies aient des systèmes de régulation différents, elles nécessitent toutes les deux d'après la littérature, la présence de leur sidérophore respectif pour induire leur expression (Michel *et al.* 2005; Llamas *et al.* 2014). La voie PVD est régulée par les facteurs sigma/anti-sigma FpvR/PvdS-FpvI. L'expression est activée après liaison à la surface de la bactérie du sidérophore PVD en complexe avec le fer ferrique sur le transporteur de membrane externe FpvA. En théorie, dans une souche ne produisant pas de PVD comme Δ*pvdF*Δ*pchA*, on ne s'attend donc à aucune expression des protéines de la voie PVD. Pour la voie PCH, ici encore c'est bien la liaison au niveau du cytoplasme bactérien entre le sidérophore PCH en complexe avec le fer avec le régulateur cytoplasmique PchR qui induit l'expression des gènes de la voie PCH.

Pour déterminer si l'expression des protéines de la voie PCH en absence de production de PCH et en milieu carencé en fer est due à une induction par le régulateur PchR seul (non lié au complexe PCH_2-Fe) ou par un autre système d'induction, nous avons réalisé une deuxième série de tests protéomiques sur une souche mutée pour le régulateur PchR (Δ*pvdF*Δ*pchA*Δ*pchR*) (Tableau 8). Cette expérience nous a permis de montrer que les protéines de la voie PCH sont exprimées en l'absence de sidérophore mais pas en l'absence du régulateur PchR. L'induction en carence de fer est donc bien due à une activation *via* PchR qui ne nécessite pas de sidérophore pour induire l'expression de la voie.

			CAA		
Pyochéline			**PAO1**	**ΔpvdFΔpchA**	**ΔpvdFΔpchAΔpchR**
fptX	PA4218	*15599414*	1	1	0
fptC	PA4219	*15599415*	0	0	0
fptB	PA4220	*15599416*	0	1	0
fptA	PA4221	*15599417*	24	25	3
pchH	PA4222	*15599418*	7	7	0
pchI	PA4223	*15599419*	5	6	0
pchG	PA4224	*15599420*	6	5	0
pchF	PA4225	*15599421*	22	27	0

pchE	PA4226	*15599422*	27	32	1
pchR	PA4227	*15599423*	1	1	0
pchD	PA4228	*15599424*	7	11	0
pchC	PA4229	*15599425*	0	3	0
pchB	PA4230	*15599426*	2	4	2
pchA	PA4231	*15599427*	2	0	0

Tableau 8 : Expression des protéines de la voie PCH chez PAO1, Δ*pvdF*Δ*pchA* et Δ*pvdF*Δ*pchA*Δ*pchR* en milieu CAA.

La première colonne correspond au nom du gène. La deuxième colonne représente le numéro du gène chez PAO1 et la troisième le numéro *gi* de la protéine. En rouge sont représentées les protéines qui n'ont pas été détectées avec cette approche. Les valeurs représentent le nombre de spectres identifiés de chaque protéine.

Pour répondre à cette même question, nous avons aussi utilisé certaines des souches exprimant des protéines de fusion fluorescentes construites dans le chapitre précédent. Le marquage fluorescent sur l'enzyme de biosynthèse PchE nous a servi de rapporteur d'expression des protéines de la voie PCH. Nous avons comparé la variation de fluorescence correspondant à PchEmcherry dans une souche délétée pour *pchA* et donc incapable de produire la PCH, en présence et en absence d'un ajout de PCH purifiée au milieu de culture. Nous avons aussi suivi cette variation de fluorescence dans un mutant délété pour le gène *pchR*. En milieu SM, la délétion de *pchA* a pour effet de réduire la fluorescence de PchEmcherry indiquant une diminution d'expression de cette enzyme (Figure 33). En ajoutant 100 µM de PCH à cette culture, nous rétablissons la fluorescence de PchEmcherry en induisant l'expression des gènes de biosynthèse. En revanche, l'ajout de 100 µM de PCH à la culture de la souche délétée pour les gènes du régulateur *pchR* et de l'enzyme de biosynthèse *pchA*, n'a induit aucune expression de PchEmcherry (Figure 33). Dans le milieu CAA (milieu encore plus carencé en fer), la délétion de *pchA* n'entraîne pas une diminution totale de l'expression de PchE et l'ajout de 100 µM de PCH n'a pas d'effet sur l'expression de PchEmcherry (Figure 33). Dans ces conditions, PchEmcherry est constitutionnellement exprimée, même en absence de PCH. En revanche, la délétion du gène codant pour le régulateur *pchR* a pour effet d'inhiber totalement l'expression de PchEmcherry signifiant d'une part que c'est bien PchR qui est à l'origine de l'induction de l'expression de PchEmcherry et d'autre part que PchR est capable d'induire l'expression des gènes de biosynthèse de la voie PCH même en absence de PCH dans des conditions très carencées en fer (Figure 33).

Les deux approches nous ont permis de mettre en avant qu'en absence de PCH les protéines de la voie PCH ne sont pas autant exprimées qu'en la présence du sidérophore. De plus, l'ajout de

PCH exogène au milieu de culture rétablit l'expression sauvage. En revanche, dans des conditions de « grande carence » en fer (milieu CAA), les protéines de la voie PCH sont exprimées même en l'absence du sidérophore et cette induction est due à une activation de la transcription de l'opéron *pch* par PchR seul et non en interaction avec le complexe PCH_2-Fe .

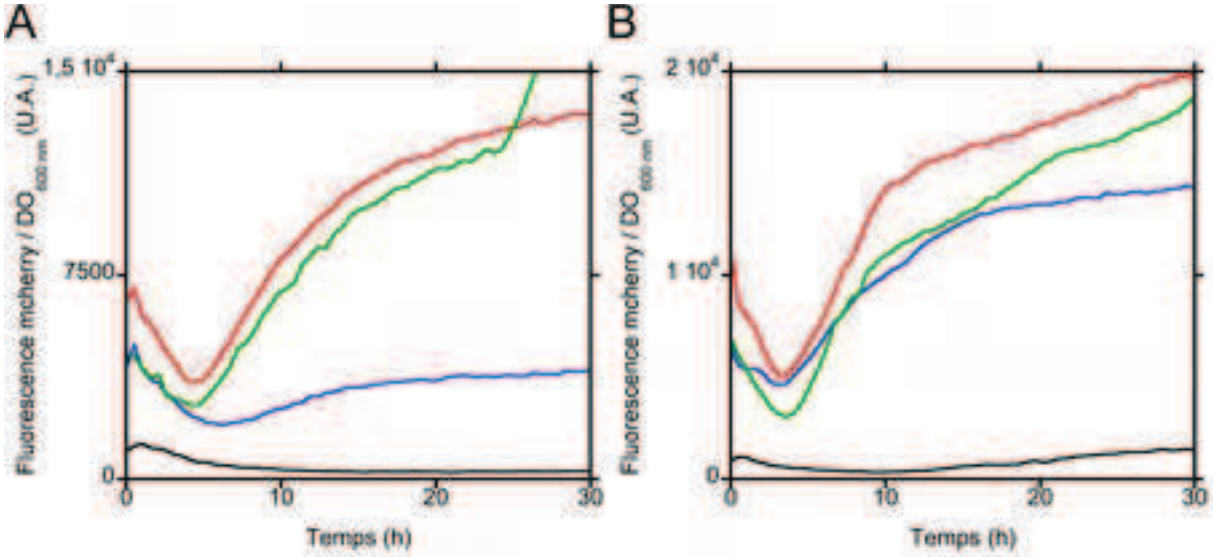


Figure 33 : Induction des protéines de biosynthèse de la PCH par PchR.

La fluorescence de PchEmcherry a été mesurée et rapportée sur la croissance ($DO_{600\ nm}$). Les souches Δ*pvdF-pchEmcherry* (rouge), Δ*pvdF*Δ*pchA-pchEmcherry* (bleu), Δ*pvdF*Δ*pchA-pchEmcherry* en présence de 100 µM de PCH (vert) et Δ*pvdF*Δ*pchA*Δ*pchR-pchEmcherry* en présence de 100 µM de PCH (noir) ont été suivies en milieu SM (A) et CAA (B).

3. Discussion

L'approche protéomique nous a aisément permis d'étudier la composition en protéines des membranes externes dans les trois milieux de culture. Comme attendu, en milieu LB, les bactéries expriment principalement des porines. En effet, dans ces conditions riches en nutriments, la simple diffusion des métaux à travers les porines est suffisante pour acquérir les ressources essentielles pour la croissance bactérienne. Ces porines sont OprF, OprQ et OprD, principalement impliquées dans l'acquisition de nutriments tels que le mannose et d'autres sucres (Figure 32 A-B).

En milieu carencé en fer, la bactérie a besoin d'exprimer des transporteurs actifs de membrane externe de type TBDTs afin de subvenir à ses besoins en fer. En milieu SM et CAA nous avons identifié la présence des transporteurs FptA, FpvA, FpvB, PhuR, HasR, PirA (Figure 32 C-F). La présence dans les membranes externes de PAO1 des transporteurs spécifiques de l'hème (HasR et PhuR) et de l'entérobactine (PirA) a été très surprenante, car ces composés (hème et entérobactine) sont absents dans les milieux de culture. En effet, d'après l'état des connaissances actuelles de la régulation de l'expression de ce type de protéines (Llamas *et al.* 2014), l'expression de ces transporteurs ne devrait être activée que si les molécules qu'ils transportent sont présentes dans l'environnement de la bactérie. Plusieurs hypothèses expliquant ces surexpressions sont possibles. Est-ce que les bactéries produisent ces transporteurs dans des milieux très carencés en fer par manque crucial de fer et un peu en « désespoir de cause » ? Est-ce que les bactéries expriment ces transporteurs en comptant sur la production de sidérophores par d'autres espèces de bactéries pouvant se trouver dans leur environnement ? Est-ce que ces transporteurs sont capables de transporter des composés ayant des structures chimiques proches de l'hème, de l'entérobactine, de la PCH ou de la PVD, non identifiés mais produits par *P. aeruginosa* ou présents dans les milieux de culture ? La dernière hypothèse pourrait expliquer que les bactéries expriment spécifiquement ces transporteurs et non pas tous les transporteurs TBDTs dédiés à l'acquisition du fer.

L'étude du protéome des protéines de membrane interne a été moins aisée à cause de la faible détection de ces protéines par les techniques de protéomique. L'étude des transporteurs de métaux n'a donc pas pu être complète. La seule observation que nous ayons faite est la surexpression des transporteurs de Mg (OprC, MgtA et MgtE) lorsque la concentration de Mg diminue dans le milieu.

Finalement, le résultat de l'étude protéomique le plus surprenant a été l'expression des protéines des *loci* des voies PVD et PCH dans la souche Δ*pvdF*Δ*pchA* incapable de produire ces deux sidérophores. En effet, en absence de production de PCH et en conditions de cultures très carencées en fer, les protéines de la voie PCH (Tableau 4) sont exprimées au même niveau que dans

la souche sauvage PAO1. Bien que les données actuelles de la littérature mentionnent que le régulateur cytoplasmique PchR a besoin de lier le complexe PCH_2-Fe pour induire l'expression des gènes (Lin *et al.* 2013), dans nos condition expérimentales, PchR en absence de PCH semble être capable d'induire l'expression des gènes de la voie PCH. Ces résultats suggèrent une régulation à trois niveaux de la voie PCH. A une concentration de fer élevée (4,3 µM de fer en LB), la voie PCH n'est pas exprimée, car réprimée très certainement par la protéine régulatrice Fur. A une concentration moyenne (320 nM de fer en SM – une concentration en fer 13 fois inférieure à celle du LB), il y a induction de l'expression de la voie uniquement si le sidérophore PCH est présent, par liaison de PCH_2-Fe au régulateur PchR et le complexe formé se lie ensuite à son promoteur sur l'ADN. A une concentration très faible en fer (21 nM de fer en CAA, 16 fois inférieure à celle en SM et 200 fois à celle en LB), l'induction de la voie PCH peut se faire même en l'absence du complexe PCH_2-Fe. L'étude protéomique suggère le même type de régulation pour la voie PVD, alors que les systèmes protéiques impliqués (facteurs sigma et anti sigma) sont très différents. Ce type de régulation est surprenant, car il semble évident que pour la bactérie il n'y ait aucun intérêt à exprimer ces protéines vu que le sidérophore n'est pas présent et ne pourra pas amener le fer vers le cytoplasme de la bactérie. Pourquoi la bactérie exprime-t-elle un système qui n'est à priori pas fonctionnel, alors qu'elle a le moyen de détecter l'absence de PCH et ainsi mesurer l'efficacité ou l'inefficacité de ce système ? Ici encore plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Est-ce que la bactérie produit les enzymes de biosynthèse de la PCH en espérant qu'un des précurseurs du sidérophore puisse remplacer la PCH ? Est-ce que la bactérie, pour acquérir le fer en conditions très carencées, exprime l'ensemble de son arsenal d'acquisition du fer, c'est-à-dire les différentes voies d'acquisition du fer présentes dans son génome ? Ceci serait un peu une dernière stratégie utilisée en « désespoir de cause » et impliquant toutes les stratégies pouvant être utilisées par la bactérie. Comment se fait cette régulation au niveau de PchR ? Est-ce que le régulateur PchR peut être activé par une autre molécule ou par le fer ? On pourrait imaginer que le régulateur ait un site de liaison pour le complexe PCH_2-Fe et un autre pour le fer seul. Le régulateur pourrait ainsi avoir trois conformations :

- En milieu riche en fer, le fer se liant sur le régulateur ferait passer ce dernier sous une conformation inactive ce qui induit la répression de la production de PCH. Cette répression de la voie PCH par PchR s'ajouterait à la répression par Fur.
- En milieu très fortement carencé en fer, PchR n'est plus chargé en fer et devient actif pour la régulation de la transcription des gènes de la voie PCH. Dans ces conditions, même si la PCH n'est pas présente, la voie PCH est activée. C'est ce qui a été observé par l'étude protéomique pour les bactéries cultivées en milieu CAA.

- En milieu moyennement carencé en fer (milieu SM dans nos expériences), PchR serait chargé en fer donc inactif, mais la présence de faibles quantités de PCH va induire une auto-activation de la transcription de la voie PCH par liaison de PCH_2-Fe à PchR.

Ce scénario reste une hypothèse et des études supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer ou l'infirmer. Il serait par exemple intéressant de purifier PchR et d'étudier ses interactions avec la PCH, le complexe PCH_2-Fe, le fer seul et éventuellement d'autres métaux.

Chapitre 7

Implication de la pyochéline et de la pyoverdine dans l'import des métaux

1. Introduction

P. aeruginosa a besoin d'un grand nombre de métaux différents pour sa croissance et sa survie. En effet, l'étude du métallome de *P. aeruginosa* nous a révélé que cette bactérie, comme *E. coli*, accumule les éléments biologiques tels que le Fe, le Zn, le Ni, le Cu et le Mo. L'acquisition du fer a largement été étudiée chez cette bactérie, mais l'acquisition des autres métaux reste encore assez méconnue et bien que certains systèmes d'acquisition des métaux aient été identifiés (Figure 5), il est fortement probable que *P. aeruginosa* en possède d'autres.

L'étude de la voie PCH était jusque là restreinte à l'étude de la biosynthèse et de l'import du complexe PCH_2-Fe. Bien que certains travaux aient suggéré que la PCH n'est pas seulement impliquée dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa*, son rôle exact dans le mode de vie de cette bactérie n'a jamais pu être clairement identifié. En effet, le laboratoire a mis en évidence que la PCH peut non seulement chélater d'autres métaux comme le Zn, le Cu par exemple mais que certains complexes sont également transportés dans la bactérie (Braud *et al.* 2009; Brandel *et al.* 2012). De plus, une autre étude, également effectuée au laboratoire, a pu montrer que la PVD peut aussi chélater un grand nombre d'autres métaux que le fer et que certains de ces complexes sont également transportés au moins jusque dans le périplasme (Braud *et al.* 2009; Braud *et al.* 2010). En revanche, nous n'avons pas pu montrer à ce jour, si ces transports avaient bien une signification biologique où s'ils étaient le résultat de transports accidentels d'autres métaux par les sidérophores PCH et PVD.

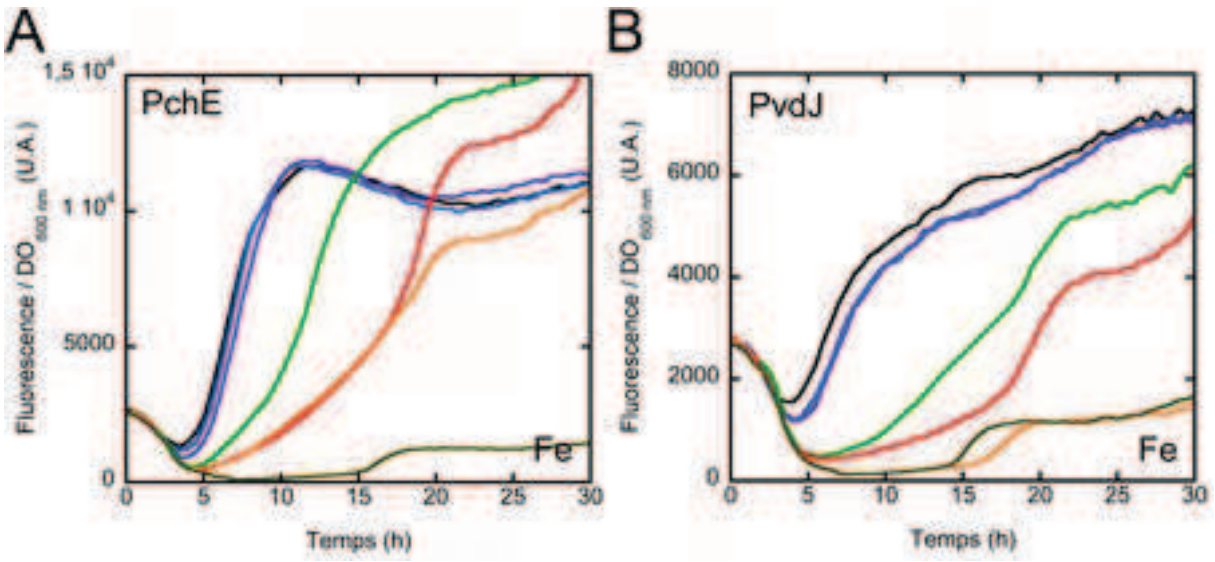
Un des objectifs majeurs de cette thèse a été d'apporter des éléments de réponse quant à l'implication de la voie PCH dans l'homéostasie d'autres métaux que le fer chez *P. aeruginosa*.

Afin d'étudier l'implication de la PCH et de la PVD dans l'homéostasie d'autres métaux que le fer, nous avons décidé dans un premier temps d'utiliser les souches exprimant les protéines de fusion fluorescentes construites pour la première partie de cette thèse. Pour des raisons d'intensité de signal de fluorescence les protéines de fusions avec les deux NRPS, PchE-mCherry pour la voie PCH et PvdJ-mCherry pour la voie PVD, ont été utilisées pour cette étude. Nous avons choisi d'utiliser un marquage avec la protéine fluorescente mCherry, car les spectres d'émission de fluorescence des proteines YFP et GFP sont trop proches du spectre d'émission de fluorescence de la PVD. Ce marquage des enzymes de biosynthèse de la voie PCH et de la voie PVD permet de suivre directement l'expression de ces gènes et donc très certainement de l'ensemble des enzymes de biosynthèse des sidérophores PVD et PCH; cette méthode nous permet ainsi de suivre la régulation de l'expression de ces protéines. De plus, nous avons suivi par ICP-AES l'accumulation de différents métaux dans les cellules de *P. aeruginosa via* les voies PCH et PVD. Enfin, nous avons tenté d'identifier une interaction possible entre les complexes PCH_2-métaux et le régulateur de la voie PCH, PchR.

2. Résultats

2.1 La régulation de l'expression des voies PCH et PVD par les métaux

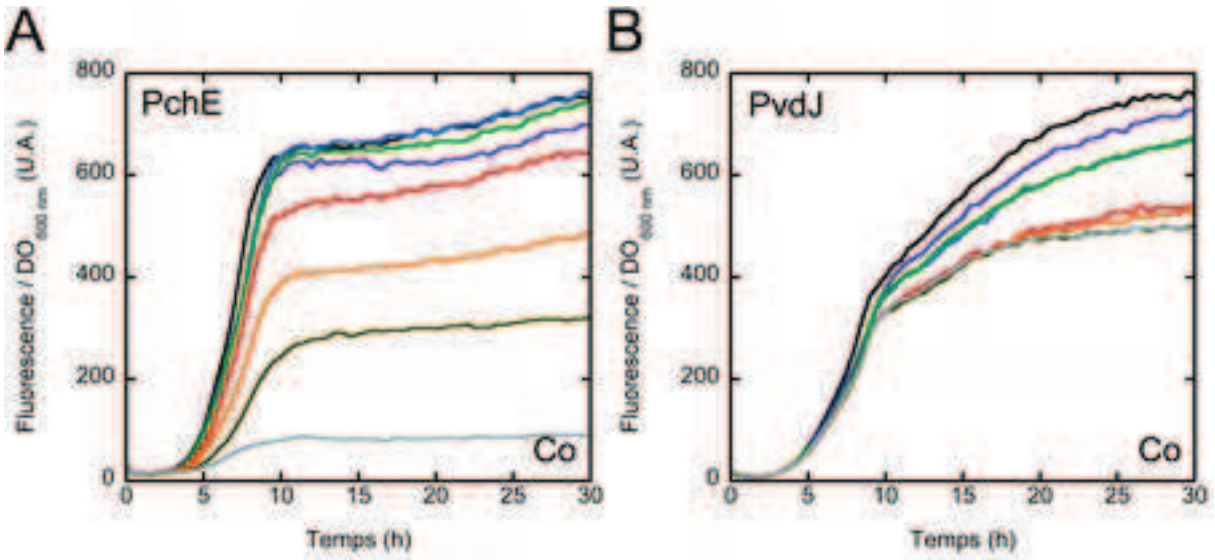
Dans un premier temps, nous avons utilisé les souches *pchEmcherry* et *pvdJmcherry* afin d'identifier quels métaux pourraient réguler l'expression des gènes de biosynthèse des voies PCH et PVD. Ces deux souches produisent les sidérophores PVD et PCH dans les mêmes proportions que la souche sauvage PAO1 (Cunrath *et al.* 2014; Gasser *et al.* 2015). Pour cela, nous avons ajouté en début de culture en milieu CAA des concentrations croissantes de métaux (Figure 41). L'expérience avec des concentrations croissantes en fer nous a servi de témoin positif afin de valider notre approche (Figure 34). Nous pouvons voir que l'expression de PchEmcherry et PvdJmcherry et par conséquent des deux voies PCH et PVD sont réprimées lorsque la concentration en fer augmente dans le milieu et ceci de façon dose-dépendante. Pour la voie PCH, nous observons qu'à une concentration de 100 µM de $FeCl_3$, l'expression de l'enzyme de biosynthèse est totalement réprimée. Pour la voie PVD, cette répression est totale à une concentration de 50 µM de $FeCl_3$. Nous avons représenté le rapport entre la fluorescence mesurée et la croissance bactérienne pour éviter le biais de l'induction de croissance par le fer. En effet, l'ajout de fer au milieu a pour conséquence d'induire fortement la croissance bactérienne.



<u>Figure 34 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en fer présente dans le milieu

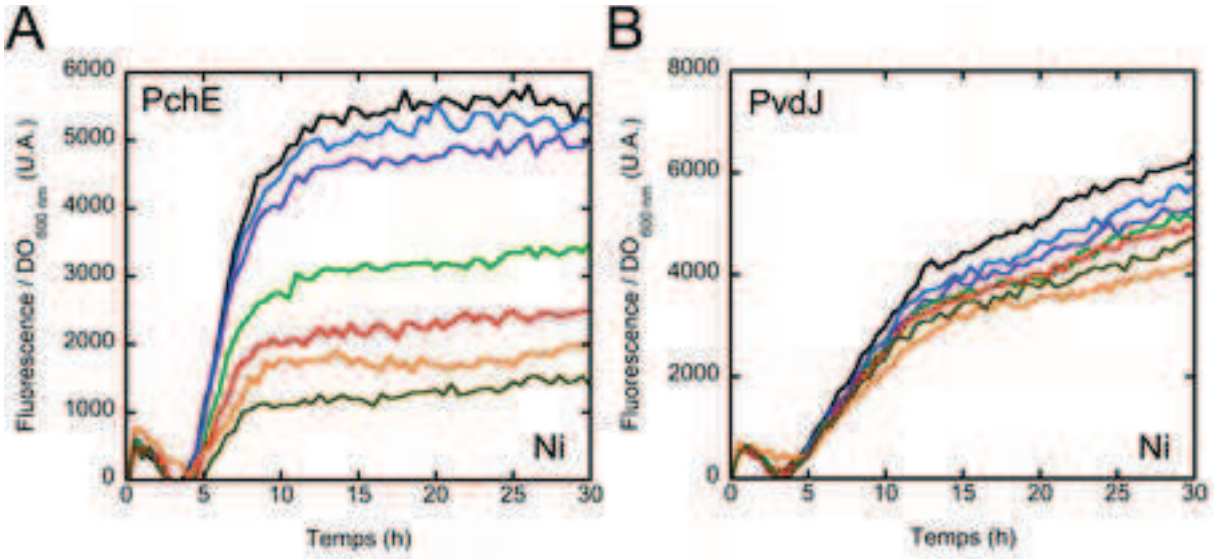
La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $FeCl_3$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $FeCl_3$; Violet – 500 nM de $FeCl_3$; Bleu – 1 µM de $FeCl_3$; Vert – 5 µM de $FeCl_3$; Rouge – 10 µM de $FeCl_3$; Orange – 50 µM de $FeCl_3$ et Brun – 100 µM de $FeCl_3$.

L'expérience a été répétée avec le Co, le Ni, le Cu et le Zn. Nous avons pu voir que le Co réprime de façon dose-dépendante l'expression de l'enzyme PchE. A une concentration de 10 µM, l'expression de PchEmcherry est presque totalement réprimée (environ 10 % d'expression). En revanche, l'expression de PvdJmcherry n'est réprimée qu'à 65 % comparé à celle sans ajout de Co (Figure 35). Pour le Ni, ici encore la voie PCH est réprimée à 25 % pour une concentration de 100 µM alors que la voie PVD ne l'est qu'à 73 % (Figure 36). Concernant le Cu, aucun effet sur la voie PVD n'a été observé, alors que la voie PCH est réprimée à environ 65 % pour une concentration de 100 µM (Figure 37). Enfin, le Zn n'a aucun effet sur la voie PVD mais influe sur l'expression de l'enzyme PchEmcherry. A une concentration de 500 nM de Zn, l'expression de la voie de biosynthèse est légèrement augmentée (115 %), à une concentration de Zn variant entre 1 µM et 5 µM aucun effet n'a été observé, alors que pour toutes les concentrations testées au dessus de 5 µM de Zn, la voie PCH est réprimée à environ 55 % (Figure 38).



<u>Figure 35 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en cobalt présente dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $CoCl_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $CoCl_2$; Violet – 10 nM de $CoCl_2$; Bleu – 50 nM de $CoCl_2$; Vert – 100 nM de $CoCl_2$; Rouge – 500 nM de $CoCl_2$; Orange – 1 µM de $CoCl_2$; Brun – 5 µM de $CoCl_2$ et Gris – 10 µM de $CoCl_2$.



<u>Figure 36 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en nickel présente dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $NiCl_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $NiCl_2$; Violet – 500 nM de $NiCl_2$; Bleu – 1 µM de $NiCl_2$; Vert – 5 µM de $NiCl_2$; Rouge – 10 µM de $NiCl_2$; Orange – 50 µM de $NiCl_2$ et Brun – 100 µM de $NiCl_2$.

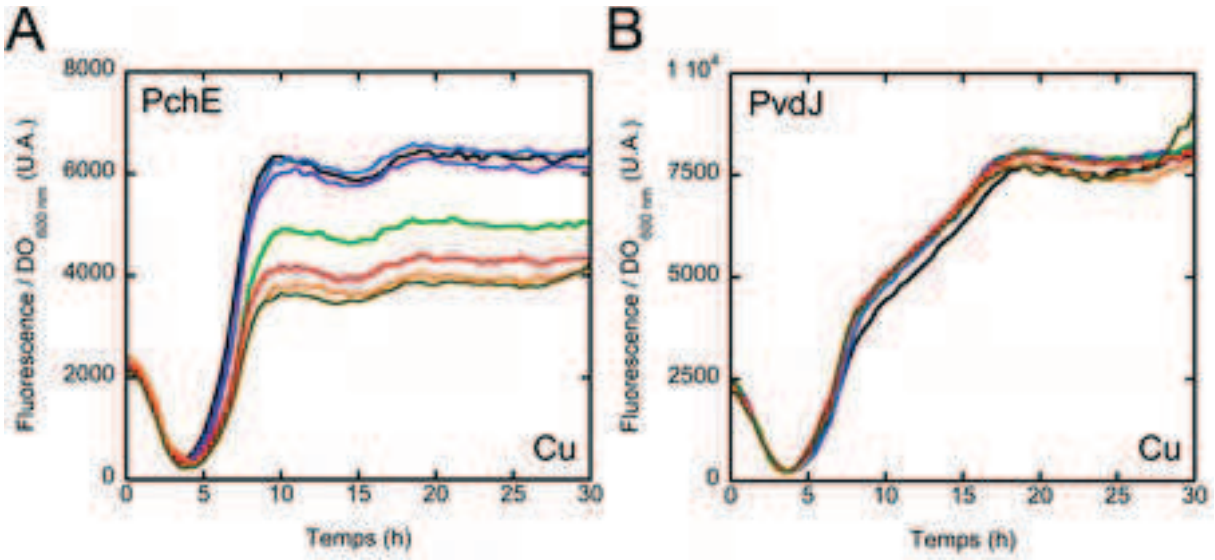


Figure 37 : Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en cuivre présente dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $CuCl_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $CuCl_2$; Violet – 500 nM de $CuCl_2$; Bleu – 1 µM de $CuCl_2$; Vert – 5 µM de $CuCl_2$; Rouge – 10 µM de $CuCl_2$; Orange – 50 µM de $CuCl_2$ et Brun – 100 µM de $CuCl_2$.

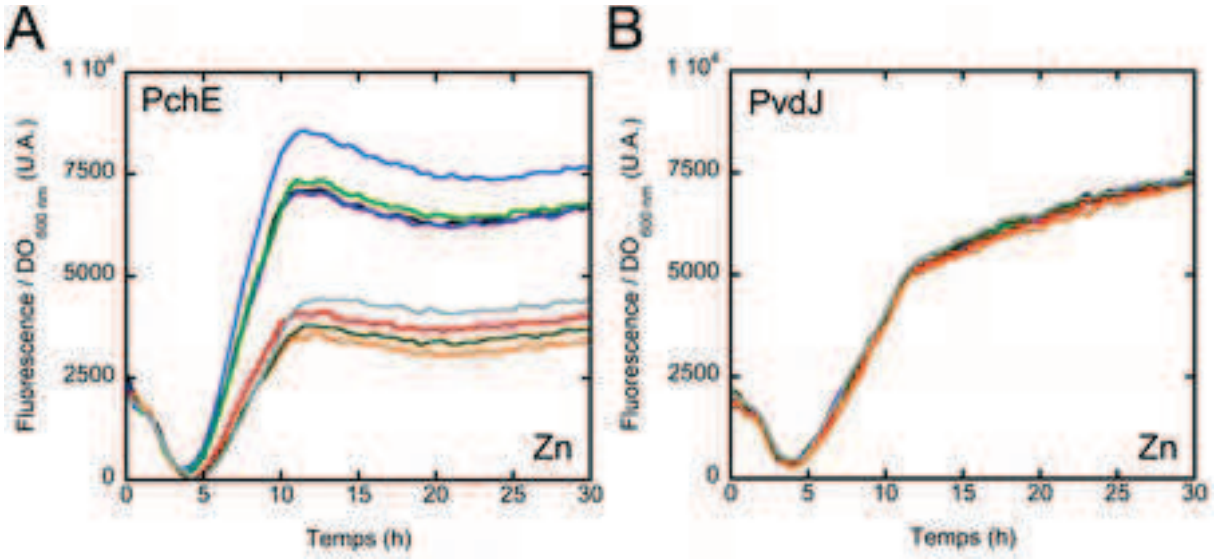
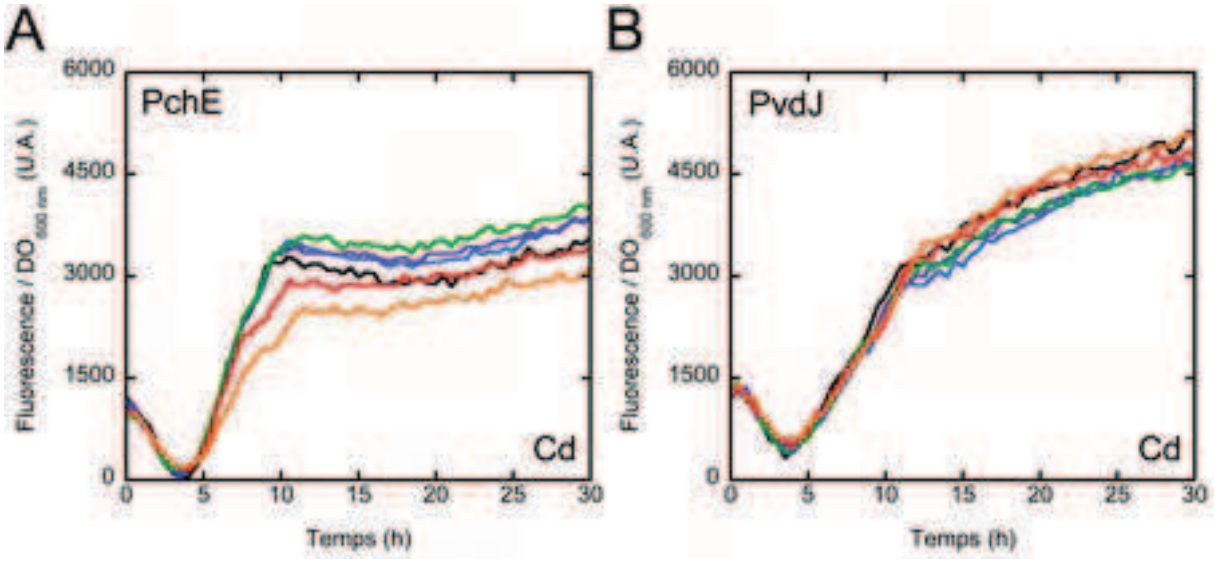


Figure 38 : Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en zinc présente dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $ZnCl_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $CuCl_2$; Violet – 500 nM de $ZnCl_2$; Bleu – 1 µM de $ZnCl_2$; Vert – 5 µM de $ZnCl_2$; Rouge – 10 µM de $ZnCl_2$; Orange – 50 µM de $ZnCl_2$; Brun – 100 µM de $ZnCl_2$ et Gris – 100 µM de $ZnCl_2$.

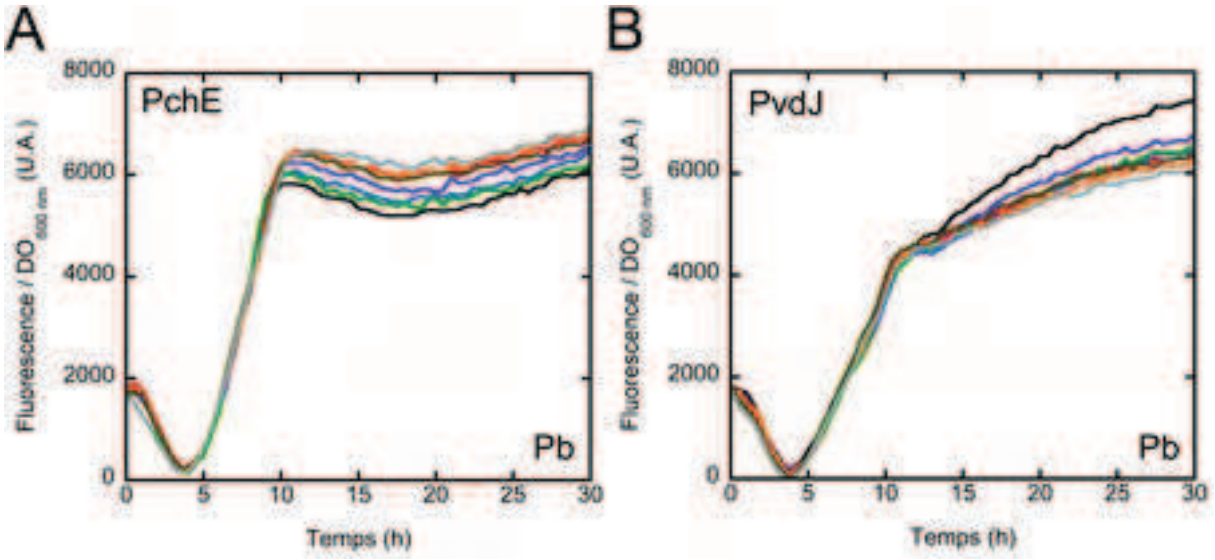
Après avoir étudié l'effet des éléments traces sur les voies PVD et PCH, nous avons voulu savoir si certains éléments toxiques pouvaient également avoir un effet sur l'expression des gènes de la biosynthèse des voies PCH et PVD. Pour cela, nous avons réalisé la même étude avec les métaux Cd et Pb. Concernant le Cd, aucun effet n'a été observé pour la voie PVD. Pour la voie

PCH, nous avons noté une très faible augmentation de l'expression de PchEmcherry (108 %) pour des concentrations comprises entre 500 nM et 5 µM et une légère répression à 87 % pour 50 µM de Cd a été observée (Figure 39). Le Cd devenant toxique à partir de 100 µM dans nos conditions, nous n'avons donc pas pu étudier l'effet du Cd au delà de cette concentration. L'ajout de Pb a pour conséquence une faible augmentation (112 %) de l'expression de la voie PCH et une faible diminution (85 %) de la voie PVD (Figure 40). Etant donné que dans nos conditions le Pb précipite au delà de 500 µM, aucune mesure n'a donc été faite au dessus de cette concentration.



<u>Figure 39 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en cadmium présente dans le milieu.

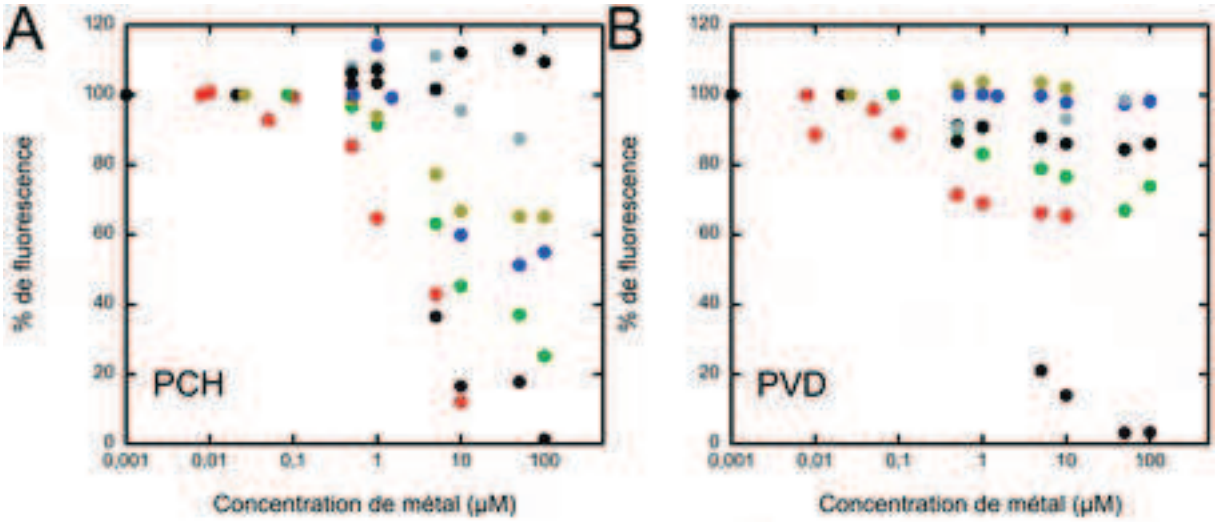
La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $Cd(NO_3)_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $Cd(NO_3)_2$; Violet – 500 nM de $Cd(NO_3)_2$; Bleu – 1 µM de $Cd(NO_3)_2$; Vert – 5 µM de $Cd(NO_3)_2$; Rouge – 10 µM de $Cd(NO_3)_2$ et Orange – 50 µM de $Cd(NO_3)_2$.



<u>Figure 40 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en plomb présente dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* a été suivie à 610 nm au lecteur de plaque 96 puis Tecan Infinite et rapportée à la croissance bactérienne ($DO_{600\ nm}$). Des concentrations croissantes de $Pb(NO_3)_2$ ont été ajoutées en début de croissance. Noir – milieu CAA sans ajout de $Pb(NO_3)_2$; Violet – 500 nM de $Pb(NO_3)_2$; Bleu – 1 µM de $Pb(NO_3)_2$; Vert – 5 µM de $Pb(NO_3)_2$; Rouge – 10 µM de $Pb(NO_3)_2$; Orange – 50 µM de $Pb(NO_3)_2$; Brun – 100 µM de $Pb(NO_3)_2$ et Gris – 500 µM de $Pb(NO_3)_2$.

Pour résumer, cette approche nous a permis de mettre en avant une nette différence de régulation de l'expression des enzymes de biosynthèse entre les voies PCH et PVD en fonction des métaux. Pour la voie PCH, les métaux que l'on a testé peuvent être classés en trois groupes. Le Fe, le Co et le Ni ont pour effet de réprimer totalement l'expression PchEmcherry et donc probablement la production de la PCH de façon dose-dépendante. Le Cu et le Zn répriment l'expression de PchEmcherry d'environ 50 % alors que le Cd et Pb n'ont pas d'effet de répression (Figure 41 A). Pour la voie PVD, seul le fer réprime totalement l'expression de PvdJmcherry et donc probablement la production de PVD. Le Co, le Ni et le Pb ont pour effet une répression de 20 à 30 % de l'expression de PvdJmcherry alors que le Cu, le Zn et le Cd n'ont aucun effet (Figure 41 B).



<u>Figure 41 :</u> Expression de PchEmcherry et PvdJmcherry en fonction de la concentration en métaux présents dans le milieu.

La fluorescence (mCherry) des souches (A) *pchEmcherry* et (B) *pvdJmcherry* en présence de métaux a été rapportée sur la fluorescence en milieu CAA (considéré comme 100 % de fluorescence). Brun – $FeCl_3$; Rouge – $CoCl_2$; Vert – $NiCl_2$; Bleu – $ZnCl_2$; Jaune – $CuCl_2$; Gris – $Cd(NO_3)_2$ et Noir – $Pb(NO_3)_2$.

2.2 Le transport de métaux par la PCH et la PVD

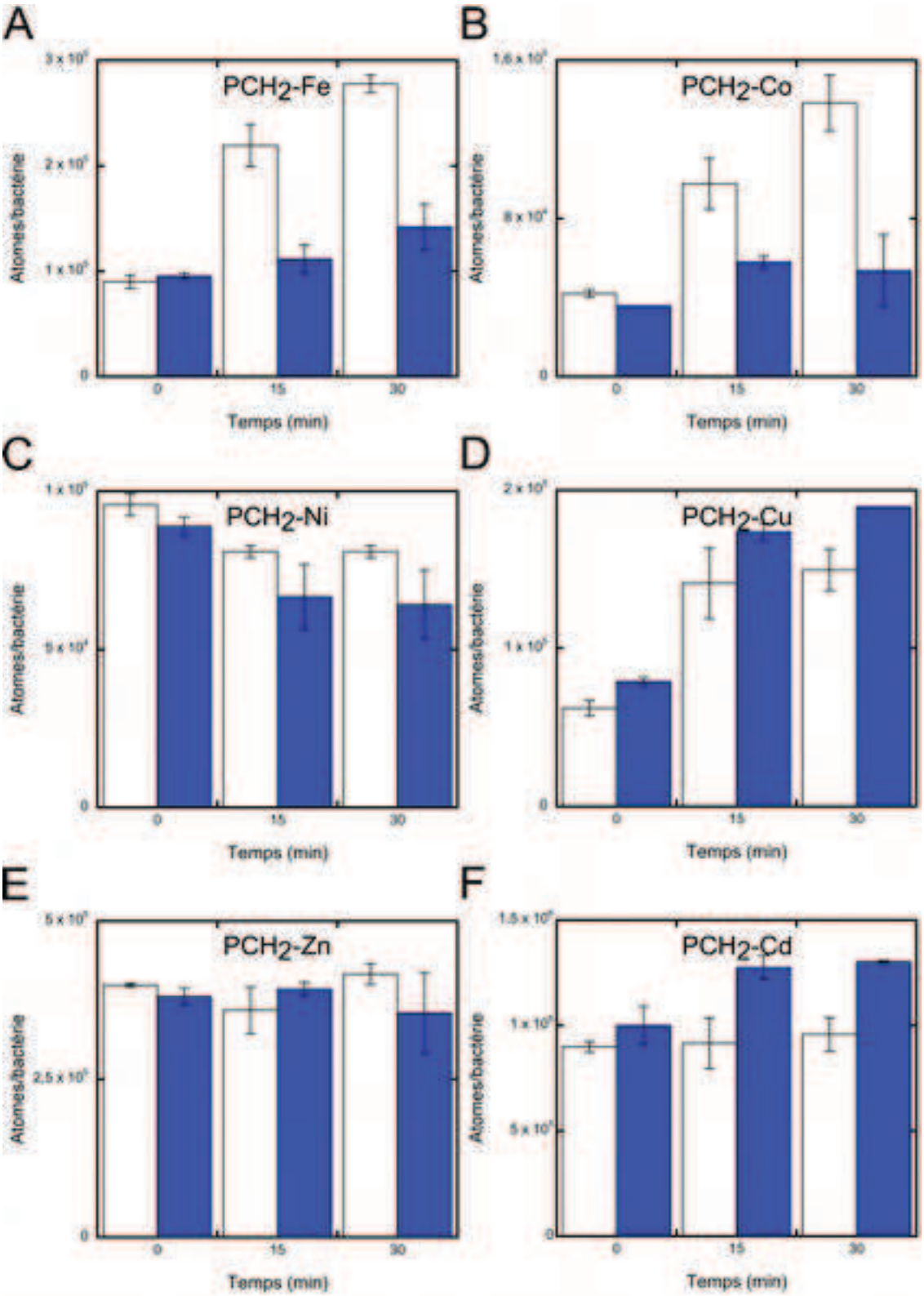
Afin de quantifier le transport des complexes PVD-métaux et PCH_2-métaux, nous avons décidé de réaliser des expériences de transport suivies par ICP-AES (Figure 42 et 43). Bien que les expériences de transport du fer radioactif se fassent de façon courante au laboratoire, nous n'avons pas accès à d'autres sources de métaux radioactifs.

Pour le fer radioactif, nous utilisons en général une concentration finale de fer de 100 nM à 500 nM. Les sidérophores ont été pré-incubés avec les métaux dans les proportions suivantes : 4 µM de métal et 4 µM de PVD ou 8 µM de PCH ; et le mélange ajouté à la suspension bactérienne au temps t0. Nous avons utilisé deux souches X et Y pour cette étude : les deux ne produisent ni la PCH ni la PVD et l'une d'entre elles est également mutée pour le gène *fptA* codant pour le transporteur de membrane externe du complexe PCH_2-Fe.

Nous avons observé qu'en plus du Fe, la PCH transporte le Co de façon spécifique (Figure 42 B). En effet, les complexes PCH_2-Fe et PCH_2-Co sont transportés à l'intérieur de la bactérie lorsque le transporteur FptA est exprimé mais pas en son absence. Il serait intéressant de répéter cette expérience en ajoutant un contrôle supplémentaire : les deux souches incubées en présence du Co mais en absence du sidérophore.

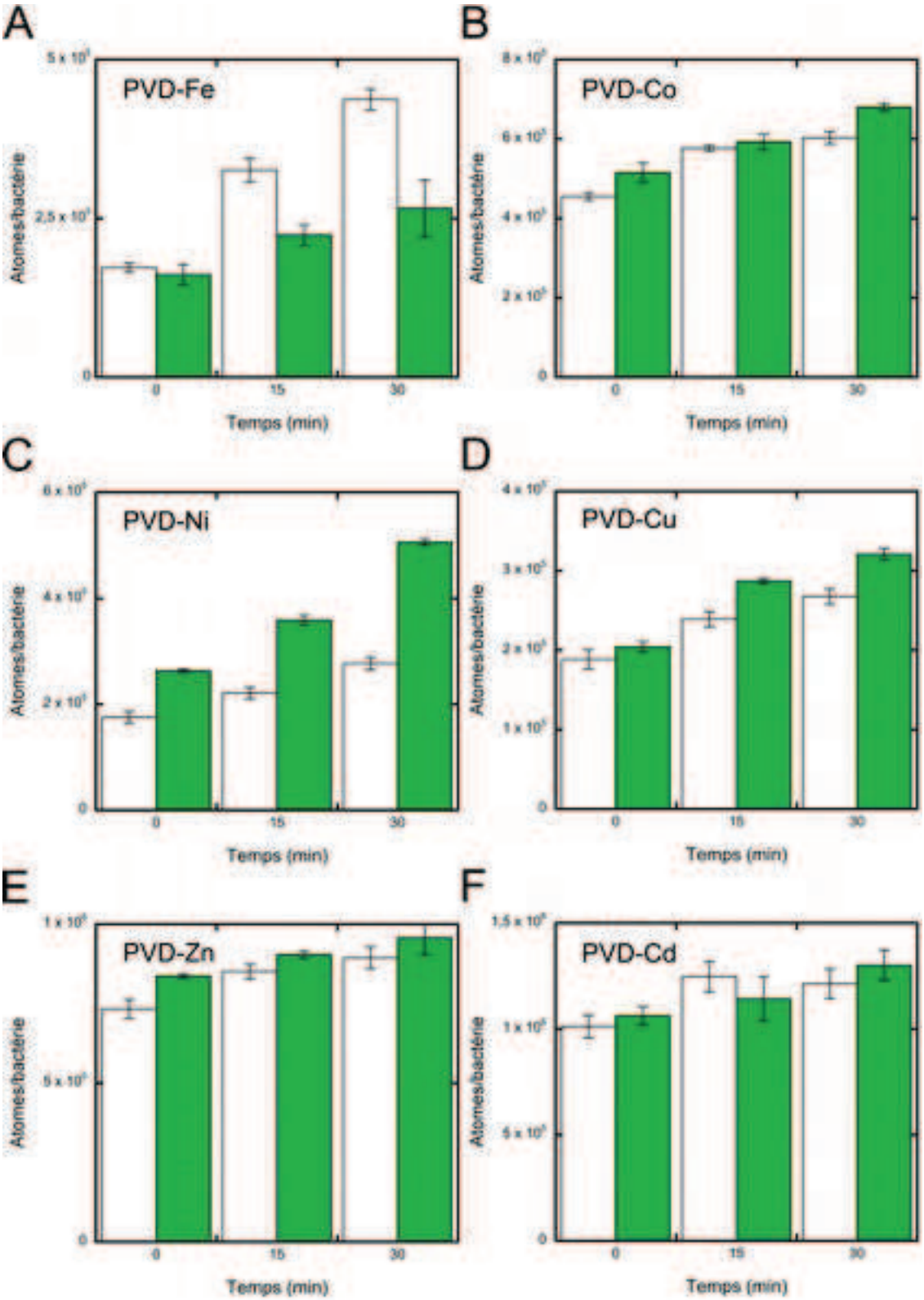
Aucun transport du Ni, du Cu, du Cd et du Zn par la PCH n'a pu être observé dans nos conditions. Pendant les 30 minutes de mesure, aucun transport du Ni et du Zn n'a pu être observé, alors que pour le Cu, nous avons noté une accumulation de ce dernier dans la bactérie par un mécanisme ne dépendant pas de la voie PCH. Pour le Cd, nous observons un transport à l'intérieur de la bactérie dans la souche n'exprimant pas le transporteur FptA (Figure 41).

Concernant la PVD, nous avons uniquement observé un transport du fer via les transporteurs FpvA ou FpvB. Pour le Co, le Cu, le Zn et le Cd un faible transport non PVD dépendant a été observé. Pour le Ni, nous avons noté un transport à l'intérieur de la bactérie en absence des transporteurs FpvA et FpvB (Figure 42).



<u>Figure 42 :</u> Transport des métaux Fe, Co, Ni, Cu, Zn et Cd en complexe avec la PCH dans les cellules de *P. aeruginosa*.

Des cultures à DO 1 des souches Δ*pvdF*Δ*pchA* (blanc) et Δ*pvdF*Δ*pchA*Δ*fptA* (bleu) en CAA ont été incubées en présence de complexe PCH_2-métal à une concentration de 8 µM de PCH et 4 µM de métal. Les culots bactériens ont été lavés à H_2O ultra pure et les quantités de métaux ont été mesurées par ICP-AES. Les métaux utilisés sont (A) $FeCl_3$; (B) $CoCl_2$; (C) $NiCl_2$; (D) $CuCl_2$; (E) $ZnCl_2$ et (F) $Cd(NO_3)_2$.

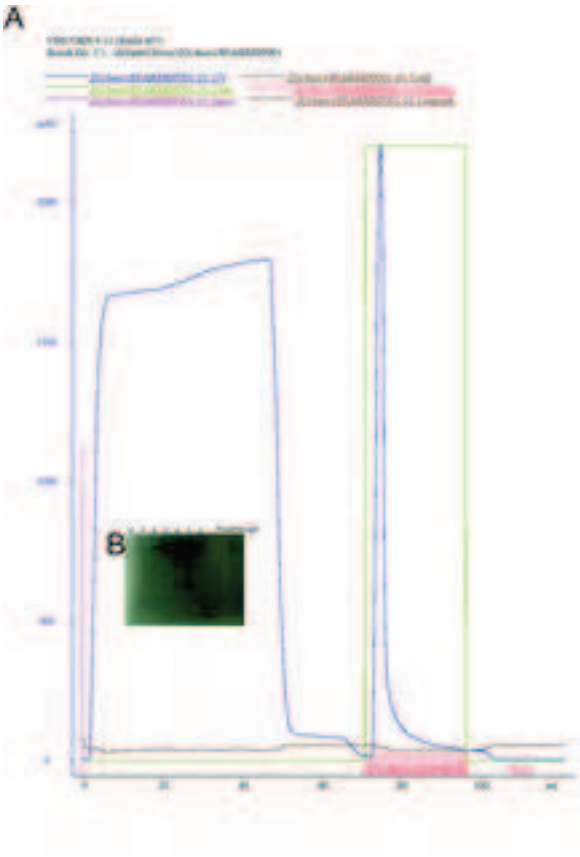


<u>Figure 43 :</u> Transport des métaux Fe, Co, Ni, Cu, Zn et Cd en complexe avec la PVD dans les cellules de *P. aeruginosa*.

Des cultures à DO 1 des souches Δ*pvdF*Δ*pchA* (blanc) et Δ*pvdF*Δ*pchA*Δ*fpvA*Δ*fpvB* (vert) en CAA ont été incubées en présence de complexe PVD-métal à une concentration de 4 µM de PVD et 4 µM de métal. Les culots bactériens ont été lavés à H_2O ultra pure et les quantités de métaux ont été mesurées par ICP-AES. Les métaux utilisés sont (A) $FeCl_3$; (B) $CoCl_2$; (C) $NiCl_2$; (D) $CuCl_2$; (E) $ZnCl_2$ et (F) $Cd(NO_3)_2$.

2.3 Interaction entre PchR et PCH-métal

Afin d'identifier une interaction possible entre le régulateur PchR de la voie PCH et les complexes PCH_2-métaux nous avons décidé de purifier PchR et d'essayer de mesurer une interaction possible par fluorescence. En effet, le laboratoire de C. Reimmann a pu mettre en évidence l'interaction entre le complexe PCH_2-Fe et le régulateur PchR par une approche de FRET basée sur la fluorescence de la PCH (Lin *et al.* 2013). Nous comptions utiliser cette même approche pour mesurer les interactions possibles entre PchR et les complexes PCH_2-métaux. Le laboratoire de C. Reimmann, nous a donc fait parvenir le plasmide de surexpression pME9275 contenant le gène *pchR* marqué par la protéine MBP en N-terminal. Après la purification du régulateur (Figure 44), nous avons tenté de mesurer l'interaction entre le régulateur PchR et le complexe PCH_2-Fe en utilisant le protocole publié par ce laboratoire, mais nous n'avons malheureusement pas réussi à reproduire ces résultats. Une autre approche pour mesurer une éventuelle interaction devra être utilisée.



<u>Figure 44 :</u> Purification de MBP-PchR.

(A) Profil de purification de PchR avec une étiquette MBP en N-terminal. La purification s'est faite sur un système ÄCTA purifié avec une élution en une étape avec du maltose. (B) Bleu de coomassie révélant la présence d'une protéine majoritaire (MBP-PchR) dans les fractions 2 à 8. La purification n'a pas pu éliminer toutes les impuretés.

3. Discussion

L'étude de la régulation par les métaux des voies de biosynthèse de la PCH et de la PVD nous a permis de mettre en évidence une nette différence de régulation entre les deux voies.

Pour le fer, l'expression de PchEmcherry et PvdJmcherry et par conséquent les deux voies PVD et PCH sont réprimées par la présence en fer, mais la voie PVD est réprimée totalement à une concentration plus faible de ce métal que la PCH. Ce résultat indique à nouveau qu'à des concentrations de fer plus restreintes, la bactérie met plutôt en jeu la voie PVD que la voie PCH. Dans nos conditions expérimentales, les deux voies d'acquisition transportent les complexes PVD-^{55}Fe et PCH_2-^{55}Fe avec une efficacité similaire.

L'expression de PchEmcherry et par conséquent celle des protéines de biosynthèse de la voie PCH est régulée par la présence de Co, de Ni, de Cu et de Zn (Figure 41). Bien que Cu et Zn ne répriment pas totalement l'expression des enzymes de biosynthèse de la PCH, tous ces métaux ont un effet sur cette voie. De plus pour le Co, nous avons pu mesurer un transport actif *via* la voie d'acquisition de la PCH (Figure 42). Bien que nous n'ayons pas pu mesurer de transport de Ni, de Cu et de Zn par la voie PCH et les conditions de transport (temps et concentrations) étant probablement différentes pour chaque métal, il est tout de même possible que la PCH puisse incorporer ces métaux dans la bactérie. Des expériences de transport à des concentrations de métaux plus élevées devraient être effectuées en ayant au préalable cultivé les bactéries sur un milieu carencé pour le métal étudié. Ces résultats laissent donc à penser que la PCH est bien impliquée dans l'acquisition d'autres métaux que le fer. Enfin, nous avons pu remarquer une augmentation d'acquisition du Cd en absence de FptA. Ce résultat troublant pourrait éventuellement être dû à une surexpression d'un système d'acquisition non spécifique (porine par exemple) induisant l'accumulation de Cd.

L'expression de PvdJmcherry et par conséquent des enzymes de biosynthèse de la voie PVD n'est régulée que par le fer. Bien que le Co, le Ni et le Pb induisent une très légère répression (Figure 41 B), ces résultats suggèreraient que la PVD serait impliquée uniquement dans l'acquisition du fer. Ici encore, lors des expériences de transport PVD-métal, nous avons pu observer une accumulation de Ni en absence des transporteurs FpvA et FpvB. Comme pour le Cd en absence de FptA, une surexpression d'une protéine d'acquisition non spécifique pourrait peut-être expliquer ce phénomène.

Pour tous les métaux, nous pouvons analyser les résultats obtenus selon deux points de vue. On peut ainsi parler de répression des voies PCH et PVD en fonction de concentrations croissantes des métaux d'une part ou d'activation des voies PCH et PVD en fonction de concentrations décroissantes de métaux d'autre part. Pour le fer, nous savons que ces deux voies sont induites en carence de fer par la présence du complexe sidérophore-Fe (régulation positive par PchR, pour la

voie PCH et par FpvR/FpvI/PvdS pour la voie PVD) et réprimées par la présence d'une surcharge en fer dans la bactérie *via* la protéine Fur. Pour les autres métaux, aucune donnée n'est disponible pour expliquer les phénomènes observés. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'il s'agisse d'une activation des voies PVD et PCH en réponse à une carence pour le métal testé, d'une répression de ces voies par la présence d'une surcharge du métal étudié dans la bactérie ou comme pour le fer, une combinaison des deux (activation et répression). Pour savoir s'il s'agit d'une activation, nous pourrions imaginer de cultiver les souches *pchEmcherry* et *pvdJmcherry* dans un milieu carencé pour le métal étudié. Ainsi, si l'expression des voies ne dépend que des concentrations en métaux dans le milieu extracellulaire et qu'une ou les deux voies (PCH et PVD) sont impliquées dans l'acquisition de ce métal, nous devrions voir une surexpression de ces voies. Si nous n'observons pas d'induction de voies d'acquisition, il s'agira probablement seulement d'une répression des voies par une protéine régulatrice cytoplasmique. Seule la protéine Fur a été identifiée comme pouvant réprimer les voies PCH et PVD. Pour pouvoir identifier la protéine ou éventuellement un petit ARN impliqué dans cette répression, des expériences de mutagénèse pourront être réalisées.

Dans notre étude, nous nous sommes uniquement intéressés à l'expression des enzymes de biosynthèse des deux voies, PVD et PCH. Cette même étude devrait être effectuée sur les protéines impliquées dans l'acquisition des sidérophores (FptXmcherry pour la voie PCH et FpvFmcherry pour la voie PVD), dans la régulation (mcherryPchR pour la voie PCH et PvdSyfp pour la voie PVD) et l'excrétion pour la voie PVD (PvdRmcherry/ PvdTmcherry/ OpmQmcherry). Ces études pourraient ainsi nous permettre de mieux comprendre la régulation de ces voies par les métaux autres que le fer. De plus, l'étude *in vitro* des régulateurs PchR et PvdS et leurs interactions possibles avec les différents complexes PCH-métal et PVD-métal ou avec les métaux seuls, devraient amener des informations essentielles sur la régulation des voies PCH et PVD par les métaux. Ces interactions pourront être visualisées par spectrométrie de masse en conditions natives mais cette approche nécessite une grande pureté protéique, ou par micocalorimétrie. Par ailleurs, l'étude de l'interaction entre les complexes PchR-PCH_2-métal ou PvdS-PVD-metal et l'ADN (PchR-box et PvdS-box) pourrait aussi être envisagé.

Chapitre 8

Le rôle des sidérophores PCH et PVD dans l'infection de *Drosophila melanogaster*

1. Introduction

Les sidérophores PVD et PCH jouent un rôle important dans la virulence de *P. aeruginosa* lors de l'infection. En effet, des études de crachats de patients infectés par *P. aeruginosa* ont montré que les bactéries produisaient de la PCH (Hare *et al.* 2012). De plus, en combinaison avec la pyocyanine, une phénazine, le complexe PCH_2-Fe serait cytotoxique pour les cellules eucaryotes en formant des radicaux libres endommageant les cellules eucaryotiques (Britigan *et al.* 1997). La PVD joue elle aussi un rôle important dans l'infection. Sa forte affinité pour le fer lui permet d'entrer en compétition avec les protéines de stockage du fer de l'hôte. De plus, la PVD induit l'expression de l'exotoxine A et de la protéase PrpL (Lamont *et al.* 2002; Cornelis 2010; Imperi *et al.* 2013).

Pour étudier le rôle des sidérophores PVD et PCH dans les différents stades de l'infection et évaluer la virulence de la bactérie en absence d'un des deux sidérophores, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'infection *Drosophila melanogaster*. Ces *Drosophilae* possèdent deux systèmes immunitaires (la cascade de signalisation Toll et IMD), tous deux impliqués dans la réponse immunitaire contre *P. aeruginosa* (Horng and Medzhitov 2001). En collaboration avec S. Haller du laboratoire de D. Ferandon, nous avons essayé de connaître l'importance de la PCH et de la PVD dans l'infection.

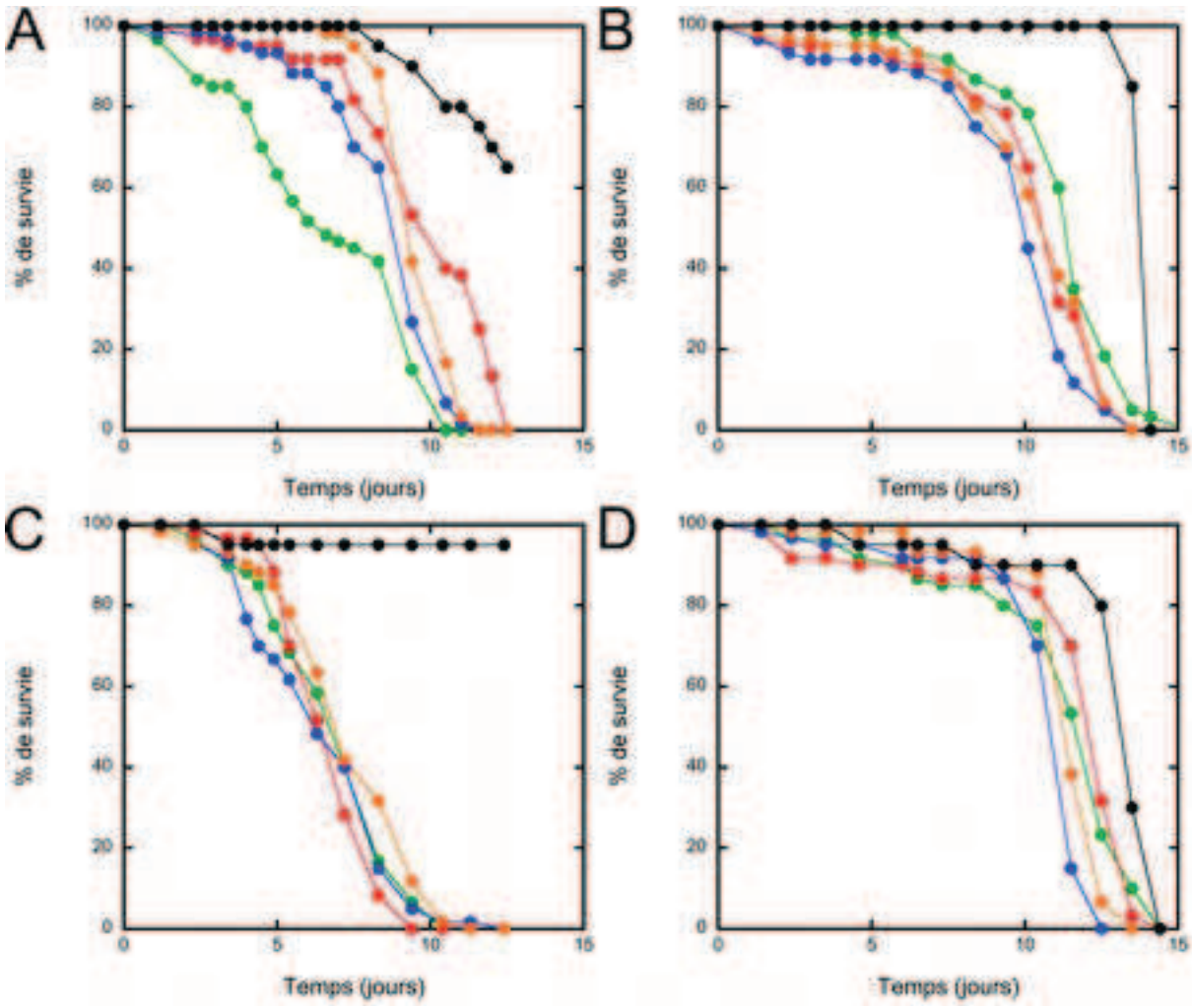
2. Résultats

2.1 Implication de la PCH et PVD dans l'infection de Drosophila melanogaster

Dans un premier temps, nous avons voulu valider notre modèle d'infection en vérifiant l'implication des sidérophores dans la virulence de *P. aeruginosa*. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs expériences de survie de *Drosophilae* infectées par *P. aeruginosa* PAO1, Δ*pvdF* (une souche déficiente pour la production de PVD), Δ*pchA* (une souche déficiente pour le production de PCH) et Δ*pvdF*Δ*pchA* (une souche ne produisant ni PVD ni PCH). Nous avons mené ces expériences d'infection dans deux lignées de *Drosophilae*, A5001 des mouches sauvages (Figure 45) et MyD88 des mouches ne possédant plus le système immunitaire Toll (Figure 46). Afin d'assurer une plus grande homogénéité, seules les mouches femelles ont été utilisées pour réaliser les expériences.

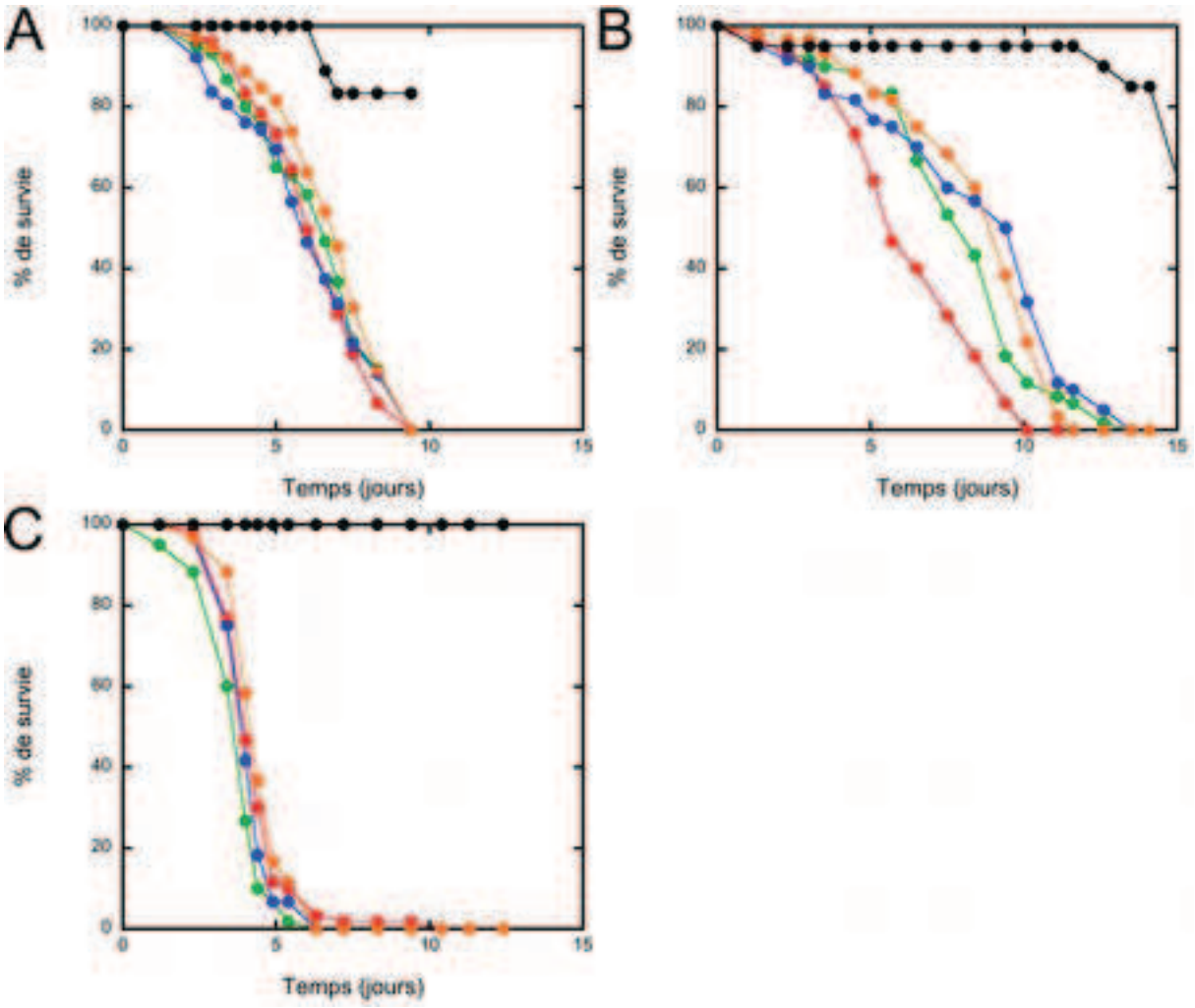
L'infection par voie orale n'a malheureusement pas pu nous permettre de conclure à une implication des sidérophores dans la virulence. La grande variabilité entre les trois séries d'infections en LB (Figure 45 A-C) n'a pas permis de conclure ; le LT50 (lifetime 50 % : moment où 50 % de la population totale des mouches est encore présente) des mouches A5001 infectées par PAO1 a été de 6, 11 et 7 jours et celle des mouches infectées par Δ*pvdF*Δ*pchA* de 9, 10 et 7 jours, le LT50 des mouches MyD88 infectées par PAO1 et par Δ*pvdF*Δ*pchA* ont été de 6, 8 et 4 jours et de 6, 9 et 4 jours respectivement.

Nous avons ensuite tenté de visualiser l'activation des voies PCH et PVD lors de l'infection. Nous avons procédé à une infection septique des mouches A5001 et MyD88 par la souche *pvdAyfp-pchAmcherry* exprimant les protéines de fusion PvdA-YFP et PchA-mCherry. Ensuite, nous avons prélevé les hémolymphes des mouches et y avons observé la présence de bactéries ainsi que le signal fluorescent des protéines marquées (Schéma Figure 47). Nous avons ainsi pu observer l'activation des deux voies lors de l'infection (Figure 47). Lors d'une acquisition d'image d'hémolymphe de MyD88 nous avons détecté la présence de bactéries dans un hémocyte de Drosophile. Ces bactéries semblent surexprimer la voie PCH (Figure 47 B). En effet, le signal de fluorescence PchA-mCherry est nettement plus intense dans les bactéries à l'intérieur des hémocytes que dans celle présentes à l'extérieur. Pour la voie PVD, seul un faible signal fluorescent de la protéine de fusion PvdA-YFP a été observé dans les hémolymphes.



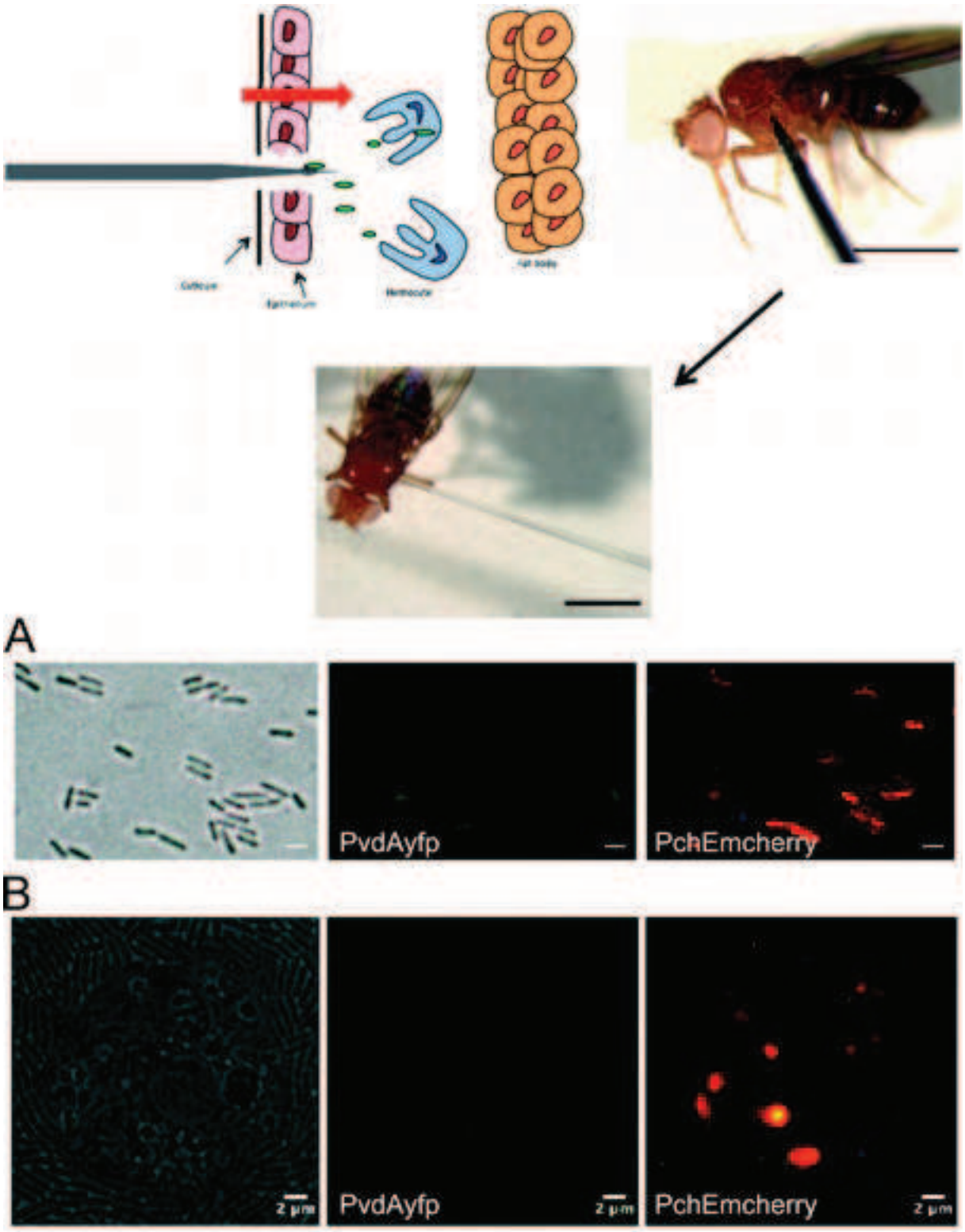
<u>Figure 45 :</u> Suivi de survie de *Drosophila melanogaster* A5001 infectée par *P. aeruginosa*.

Les mouches sont infectées par voie orale *via* une solution de sucrose contenant les souches de *P. aeruginosa* (Vert – PAO1 ; Rouge – Δ*pvdF* ; Bleu – Δ*pchA*; Orange – Δ*pvdF*Δ*pchA* et Noir – sucrose). 20 mouches par tube sont stockées à 25°C. Les mouches vivantes sont comptées toutes les 12 h jusqu'à la mort de la dernière. Chaque courbe représente la moyenne de 60 mouches. (A), (B) et (C) sont des infections réalisées avec *P. aeruginosa* cultivé en LB. (D) est une infection réalisée avec *P. aeruginosa* cultivé en SM.



<u>Figure 46 :</u> Suivi de survie de *Drosophila melanogaster* MyD88 infectée par *P. aeruginosa*.

Les mouches sont infectées par voie orale *via* une solution de sucrose contenant les souches de *P. aeruginosa* (Vert – PAO1 ; Rouge – Δ*pvdF* ; Bleu – Δ*pchA*; Orange – Δ*pvdF*Δ*pchA* et Noir – sucrose). 20 mouches par tube sont stockées à 25°C. Les mouches vivantes sont comptées toutes les 12 h jusqu'à la mort de la dernière. Chaque courbe représente la moyenne de 60 mouches. (A), (B) et (C) sont des infections réalisées avec *P. aeruginosa* cultivé en LB.



<u>Figure 47 :</u> Image de fluorescence de *pvdAyfp-pchAmcherry* (*P. aeruginosa)* après infection septique de *Drosophila melanogaster* A5001 et MyD88.

Les mouches sont infectées par voie septique *via* une aiguille en tungstène contenant la souche de *P. aeruginosa pvdAyfp-pchAmcherry*. Les hémolymphes de (A) A5001 et (B) MyD88 de 30 mouches sont prélevées et observées au microscope optique à épifluorecence. L'échelle représente 2 µm.

3. Discussion

Les expériences d'infection septique de *Drosophilae* nous ont permis de confirmer que les voies PCH et PVD sont toutes les deux actives lors de l'infection. Etant donné que nous ne pouvons pas comparer l'intensité de fluorescence entre YFP et mCherry (parce qu'elle dépend de l'environnement de la protéine fluorescente et de la quantité de protéines), nous ne pouvons donc pas en quantifier l'expression et ne pouvons pas comparer l'expression des voies PCH et PVD par cette approche. En revanche, nous pouvons affirmer que ces deux voies sont actives et que la voie PCH semble être plus active dans les bactéries présentes dans les hémocytes que celles présentes dans l'hémolymphe, mais ceci reste à confirmer. Comme un très grand nombre de mouches est nécessaire pour réaliser des images de microscopie, le modèle d'infection de la drosophile ne s'est pas montré le plus adapté pour étudier notre système biologique. De plus, bien que nous n'ayons pas pu voir d'effet significatif concernant la survie des mouches, il est tout de même fortement probable que les voies PVD et PCH soient impliquées dans la virulence de la bactérie et qu'elles contribuent à la lutte pour le fer entre le pathogène et l'hôte.

Afin de mieux étudier les effets des deux sidérophores lors de l'infection, un autre modèle d'étude sera probablement plus adapté. Pour s'approcher au mieux des conditions d'infections humaines, l'étude d'infection de cellules humaines de poumons en culture pourrait être envisagée. Pour étudier la virulence des deux sidérophores, des infections de cellules avec des souches de *P. aeruginosa* productrices ou non de sidérophores, suivi d'une analyse de survie des cellules par cytométrie en flux pourront être réalisées. De plus, afin d'étudier le phénomène d'expression de la voie PCH à l'intérieur des cellules eucaryotiques, des infections par des bactéries exprimant des protéines de fusion pour les voies de biosynthèse de la PCH ou la PVD par exemple, pourront être réalisées. Des acquisitions d'images par microscopie confocale permettront peut-être d'obtenir une meilleure visualisation de ce phénomène. Cette approche a également l'avantage de pouvoir avoir accès à un très grand nombre de cellules. Enfin, l'activation des deux voies lors des différents stades de l'infection pourra être étudiée par des mesures de fluorescence en fonction du temps en lecteur de plaque 6 puits. Ici encore, les souches portant un marquage fluorescent pourront servir à étudier la biosynthèse, la sécrétion, l'acquisition et la régulation des deux voies. Une étude avec ce type d'infection est actuellement réalisée par Beata Basta au laboratoire.

Conclusion et Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse a permis d'approfondir nos connaissances dans le domaine de l'homéostasie des métaux et du fer chez *P. aeruginosa*.

L'étude de la localisation des protéines de la voie PCH nous a permis de suggérer l'existence d'un sidérosome pour la biosynthèse de la PCH chez *P. aeruginosa*. Par analogie avec la voie PVD, ce sidérosome devrait contenir toutes les protéines nécessaires à la biosynthèse de la PCH. Ce type d'organisation évite la diffusion des précurseurs de la PCH à travers tout le cytoplasme. Les sidérosomes de la biosynthèse de la PCH et de la PVD sont les seuls sidérosomes identifiés à ce jour. Afin de mieux comprendre ce complexe multiprotéique, il serait intéressant d'étudier la composition exacte du sidérosome. Des expériences d'immunoprécipitation pourraient permettre d'identifier les différents partenaires. Ce type d'approche pourra peut être servir à connaître la stoechiométrie de ce complexe et à connaître les interactions entre les protéines du sidérosome. Ces sidérosomes sont probablement très difficiles à purifier par manque de stabilité, mais on peut imaginer les stabiliser *in vivo* par des pontages chimiques, pour ensuite les purifier et les étudier par microscopie électronique. Il serait aussi intéressant de vérifier l'existence de sidérosomes pour la biosynthèse d'autres sidérophores chez d'autres espèces bactériennes.

Concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans l'import des complexes PCH_2-Fe dans les cellules de *P. aeruginosa* de nombreuses questions subsistent. Nous avons confirmé l'implication de FptX dans l'import de PCH_2-Fe à travers la membrane interne de la bactérie et avons déterminé pour la première fois son affinité pour PCH_2-Fe. Que devient ensuite le complexe PCH_2-Fe, comment le fer se dissocie du chélateur, sont des questions qui subsistent encore. En effet, rien n'est connu à ce jour du mécanisme et des protéines impliquées dans la dissociation du fer de la PCH. De même, les protéines et les mécanismes impliqués dans la sécrétion de la PCH nouvellement synthétisée restent encore méconnus. De plus, quatre des 17 gènes de la voie PCH codent pour des protéines dont on ne connait pas encore la fonction (*pchHI* et *fptBC*). Les délétions des ces gènes n'ayant pas permis d'identifier leurs fonctions, des approches plus complexes devront être utilisées afin d'étudier leurs rôles.

En revanche, une régulation de la voie PCH par différents métaux a pu être mise en évidence pour la première fois durant cette thèse. La répression ou l'activation de la voie PCH par certains métaux biologiques est très intrigante et nécessite encore des travaux expérimentaux pour mieux comprendre ce phénomène. En effet, l'étude *in vitro* du régulateur PchR et de sa capacité à lier des complexes PCH_2-métal et l'étude de la régulation de l'expression des transporteurs FptX et FptA pourront apporter quelques éléments de réponse. De plus, l'identification d'un répresseur impliqué dans cette régulation pourrait être mis en évidence par délétion des répresseurs connus chez *P.*

aeruginosa, tel que Fur, Zur et d'autres. Enfin, il serait également intéressant d'étudier cette régulation par les métaux dans le biofilm.

Nous avons également montré que la voie PCH serait impliquée dans le transport du cobalt. Il serait intéressant de continuer à vérifier si d'autres métaux seraient transportés par cette voie et si ces transports ont une réelle signification biologique et sont essentiels à la croissance de *P. aeruginosa.*

L'étude du métallome et du protéome de *P. aeruginosa* dans les trois différentes conditions de culture nous a apporté un grand nombre d'informations. Nous avons pu pour la première fois identifier tous les métaux biologiques présents dans les bactéries de *P. aeruginosa* et nous avons aussi pu faire un parallèle entre ce métallome et l'expression des protéines de transport dans les différentes conditions de culture testés. Nous avons pu montrer que les concentrations et les proportions des métaux dans la bactérie peuvent changer selon le milieu de culture. Ces données ouvrent la voie sur un grand nombre de projets de recherche potentiels. L'étude du métallome a permis d'identifier une nette variation concernant la concentration intracellulaire des différents métaux selon le milieu de culture. Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes de stockage de ces métaux chez *P. aeruginosa*. La compensation de l'absence de sidérophores par un autre système d'acquisition du fer a pu être observée lors de ce travail, mais les protéines impliquées dans ce phénomène, n'ont pas pu être identifiées. Cet aspect pourrait être étudié par délétion successive de tous les systèmes d'acquisition du fer connus chez *P. aeruginosa*.

Enfin, l'étude du métallome dans d'autres conditions de culture de laboratoire, par exemple lors de l'infection ou encore avec des bactéries cultivées en biofilm pourrait être envisagée, afin de mieux comprendre l'homéostasie des métaux dans les différentes conditions que rencontre *P. aeruginosa*.

L'étude de l'implication des sidérophores lors de l'infection, n'a malheureusement pas pu aboutir lors de cette thèse, mais a permis d'ouvrir des pistes de recherches à venir. En effet, nous n'avons pas pu clairement identifier un effet des sidérophores PCH et PVD dans la survie des drosophiles, mais les résultats préliminaires obtenus lors de ce travail ont permis de mettre en place un nouveau sujet de recherche. Au laboratoire nous travaillons en ce moment sur un modèle d'infection de cellules humaines de poumons et essayons d'identifier le rôle et l'importance des voies PCH et PVD dans l'infection.

Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre les téchniques non publiées sont présentées et le protocole expérimental est détaillé.

1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches *P. aeruginosa* (Tableau Annexes 1) sont cultivées pendant 16 h en LB (20 g/L Lysogeny Broth [Difco]) à 37°C sous agitation. Ensuite la culture est lavée deux fois avec deux volumes de SM (7,46 g/L K_2HPO_4, $3H_2O$ (174,18 g/mol) [Merck : 105104] ; 3 g/L KH_2PO_4 (136,09 g/mol) [Carlo Erba : 361507] ; 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ (132,14 g/mol) [Merck : 101217] ; 0,2 g/L $MgSO_4$, $7H_2O$ (248,48 g/mol) [Merck : 105886] ; 4 g/L succinic acid (118,09 g/mol) [Sigma Aldrich : S3674] ; 3,1 g/L NaOH (39,997 g/mol)) ou de CAA (5 g/L Casamino Acids [BD : 223050] ; 1,46 g/L KH_2PO_4 (136,09 g/mol) [Carlo Erba : 361507] ; 0,25 g/L $MgSO_4$, $7H_2O$ (248,48 g/mol) [Merck : 105886]). La culture est réensemencée dans deux volumes de CAA ou de SM pendant 20 h à 30°C sous agitation. Cette préculture permet ensuite d'ensemencer du milieu frais (CAA ou SM) à DO 0,1 puis cultivé à 30°C pendant 24h sous agitation. Enfin la DO est mesuré et le surnageant ou le culot bactérien est utilisé pour des analyses détaillées plus bas.

2. Extraction de pyochéline d'un surnageant de culture de *P. aeruginosa*

Objectif : Quantifier la pyochéline dans un surnageant de *P. aeruginosa* et la purifier (faible purté)

50 mL d'un surnageant d'une culture de *P. aeruginosa* cultivé en SM ou CAA comme décrit plus haut, sont acidifiés pendant dix minutes avec de l'acide citrique pour atteindre un pH entre trois et quatre. La pyochéline est extraite deux fois pendant dix minutes avec 25 mL de dichlorométhane. La phase organique est séparée puis évaporée. L'extrait est solubilisé dans 2 mL de méthanol et la pyochéline est dosée par mesure de son pic d'absorbance à 320 nm.

Remarque: En cas de stockage de la pyochéline, conserver à sec à -20°C et utiliser dans les deux semaines.

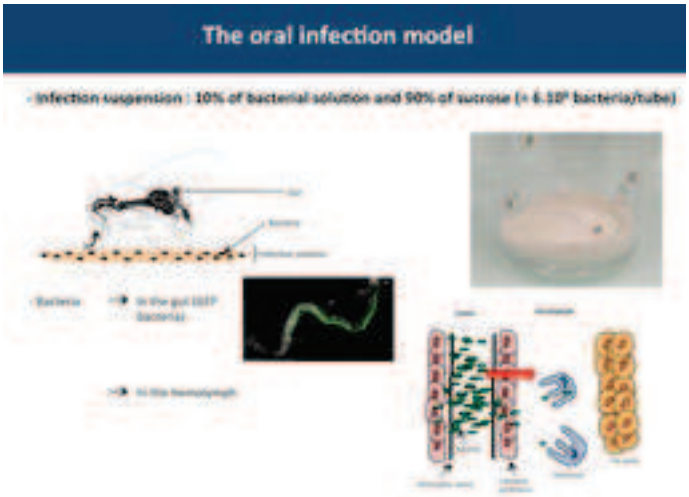
3. Infection orale de *Drosophila* par *P. aeruginosa*

(Protocole de Samantha HALLER – IBMC)

Objectif : Infecter des *Drosophilae* par voie orale avec *P. aeruginosa* et mesurer la survie des mouches.

Deux jours avant l'infection les *Drosophiles* sont triées et les femelles sont séparées et mises dans des tubes contenant que du sucrose (50mM) comme nutriments. Les souches *P. aeruginosa* sont cultivées pendant 16 h en milieu LB à 37°C sous agitation. Le jour de l'infection, deux filtres absorbants sont inoculés avec une solution de sucrose à 50 mM contenant la suspension bactérienne à DO 0,25. Des tubes de 20 *Drosophiles* sont placé à 25°C avec une humidité contrôlée.

Remarques : Les expériences ont été réalisées en collaboration avec l'IBMC (équipe Dominique Férandon).



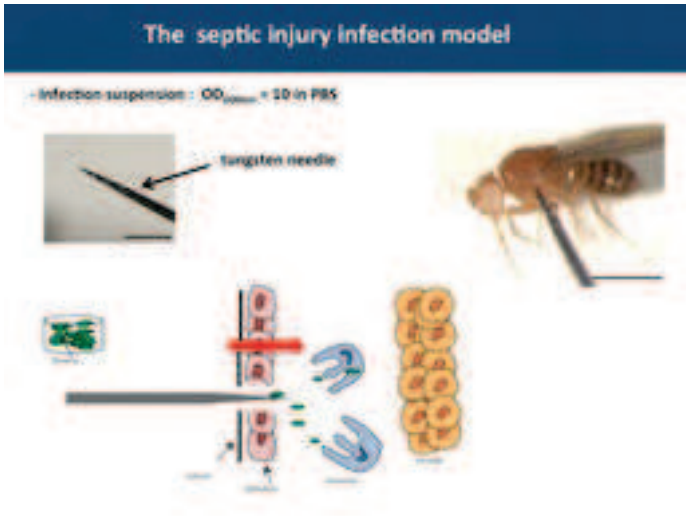
4. Infection septique de *Drosophila* par *P. aeruginosa*

(Protocole de Samantha HALLER – IBMC)

Objectif : Infecter des *Drosophilae* par piqûre avec *P. aeruginosa* et mesurer la survie des mouches.

Les souches *P. aeruginosa* sont cultivées pendant 16 h en milieu LB à 37°C sous agitation. Le jour de l'infection, une aiguille stérile en tungsten est plongée dans une suspension bactérienne (PBS 1x) à DO 10 puis les femelles sont piquées en dessous de l'aile. Les Drosophiles sont placé à 25°C avec une humidité contrôlée.

Remarques : Les expériences ont été réalisées en collaboration avec l'IBMC (équipe Dominique Férandon).



5. Préparation d'échantillons pour mesure d'ICP

Objectif : Quantifier les métaux contenus dans les bactéries.

Le culot d'une culture de *P. aeruginosa* cultivé en SM ou CAA comme décrit plus haut est lavé une fois à l'eau ultra pure puis séché pendant 48 h à 55°C. Le culot est ensuite dissout dans de l'acide nitrique à 70% pendant 48 h puis dilué avec de l'eau ultra pure afin d'atteindre une concentration d'acide à 1%. La suspention est filtré avec un filtre à 0,22 µm. Les suspentions sont analysé par ICP-AES.

Remarque: Les mesures ont été réalisées sur la plateforme d'ICP à Cronenbourg par Pascale RONOT.

6. Microscopie électronique

Objectif : Observer les bactéries au microscope électronique.

Le culot d'une culture de *P. aeruginosa* cultivé en SM ou CAA comme décrit plus haut est lavé une fois au tampon TRIS à pH 8 puis un fois au tampon Caco 0,1 M. Ensiutue le culot est repris dans un petit volume de fixateur (Caco 0,1 M ; 2,5 % paraformaldéhyde ; 2,5 % Gluta). Une suspention est déposé sur une lamelle en verre puis séchée à 55°C pendant 15 min. L'échantillon est enuite métallisé au paladium et observé au microscope électronique.

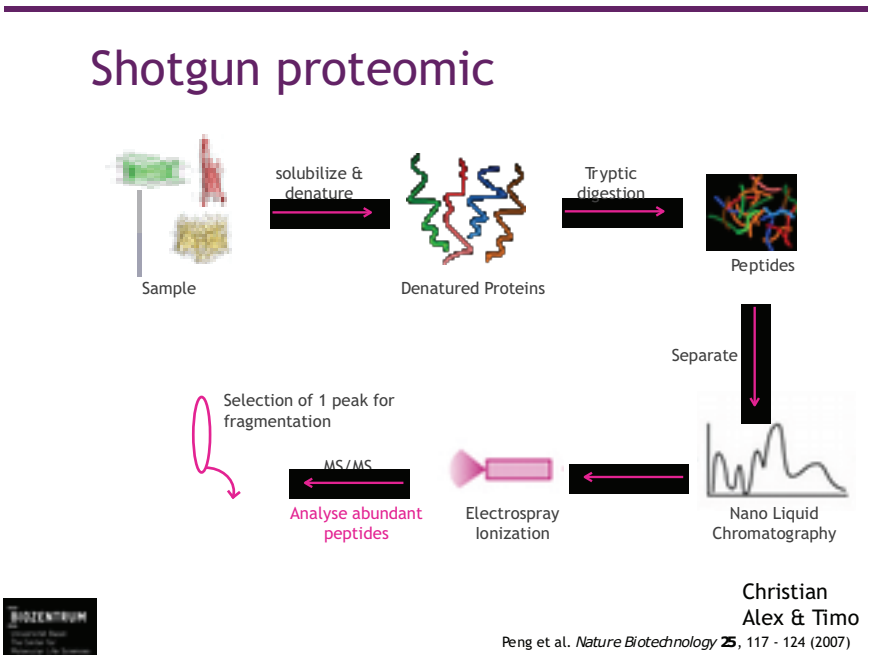
Remarque: Les expériences sont réalisées sur la plateforme d'imagerie de l'IGBMC.

7. Etude du protéome de *P. aeruginosa*

Objectif : Mesurer le protéome de *P. aeruginosa* cultivé dans différentes conditions de culture.

Le culot d'une culture de *P. aeruginosa* cultivé en SM ou CAA comme décrit plus haut est lavé une fois à l'eau ultra pure puis envoyé rapidement à la plateforme de protéomique au Biozentrum.
8µl d'urea (8M) et 2µl de RapidGest (1%) sont ajouté au culot et incubé pendant 10 secondes. L'échantillon est soniqué pendant 1-2min puis incubé à température ambiante pendant 1.0 minutes à 1000 tours par minute. L'échantillon est centrifugé pendant 2 min à 4°C à 14.000 tours par minutes. 5µl d'urea (8M) sont ajouté à l'échantillon puis le pH est ajusté à 8,5. 0,5µl de TCEP à 0,2M (pour une concentration finale de 5mM) sont ajouté à l'échantillon et incubé pendant une heure à 37°C. 0,5µl d'iodocetamide (pour une concentration finale de 10mM) sont ajouté à l'échantillon et incubé pendant 30 minutes à 25°C. Enfin 0,5µl N-acétyl-cystéine (poiur une concentrtation finale de 12,5mM) sont ajouté et incubé pendant 10 minutes dans le noir. Afin de procéder à la trypsinolyse, de la Lys-C, 0,1M d'ammonium bicarbonate et 1µl de trypsin sont utilisés. L'échantillon est ensuite purifié est analysé par spéctrométrie de masse.

Remarque: La préparation de l'échantillon et les mesures ont été réalisées sur la plateforme du Biozentrum à Bâle en collaboration avec l'équipe de Dirk Bumann.



8. Transport des métaux par la PCH ou PVD (détection d'ICP-AES)

Objectif : Mesurer l'acquisition des métaux par les voies d'import de la PCH ou PVD (par détection en ICP-AES).

Les sidérophores (PVD purté HPLC ; PCH synthétique) sont incubés à une concentration de 4 mM de PVD (1 : 1) ou 8 mM de PCH (2 : 1) avec les métaux ($Cd(NO_3)_2$; $CoCl_2$; $CuCl_2$; $NiCl_2$; $FeCl_3$; $ZnCl_2$) à une concentration de 4 mM pendant 15 min à température ambiante. Les complexes sidérophores-métaux sont ensuite ajoutés à une culture bactérienne pour une concentration finale de 4 µM de métal. Les bactéries sont récupérées à trois temps donnés (0 min, 15 min et 30 min) puis le culot est lavé une fois à l'eau ultra pure et les culot sont ensuite préparé pour l'analyse en ICP-AES comme décrit plus haut.

Remarque: Les mesures ont été réalisées sur la plateforme d'ICP à Cronenbourg par Pascale RONOT.

Annexes

Plasmide	
Nom	**Description**
pOC1	pME3088mcherryPchA
pOC2	pME3088PchAmcherry
pOC3	pME3088PchEmcherry
pOC4	pME3088mcherryPchR
pOC5	pME3088FptXmcherry
pOC6	pME3088ΔPchA
pOC7	pME3088ΔPchE
pOC8	pME3088ΔPchR
pOC9	pME3088ΔFptX
pOC10	pME3088ΔPchI
pOC11	pME3088PchEyfp
pOC12	pME3088FptXyfp
pOC13	pME3088PchAyfp
pOC14	pME3088yfpPchR

Tableau Annexe 2 : Plasmides construits et utilisés lors de cette thèse

Porines		métaux pris en charge		
oprC	PA3790	Cu		
oprQ	PA2760	Fe	Mg	
Transporter de membrane interne				
corA	PA5268	Mg	Ni	Co
hmtA	PA2435	Cu	Zn	
mgtA	PA4825	Mg		
mgtE	PA0913	Mg	Mn	
modA	PA1863	Mo		
modB	PA1862	Mo		
modC	PA1861	Mo		
modD	PA1860	Mo		
znuA	PA5498	Zn		
znuB	PA5501	Zn		
znuC	PA5500	Zn		
Régulateur				
zur	PA5499	Zn		

Tableau Annexe 3 : Noms de protéines impliquées dans l'homéostasie des métaux et leurs numéros de gène chez *P. aeruginosa* PAO1

Pyoverdine	Pyochéline

pvdQ	PA2385	*pvdI*	PA2402
pvdA	PA2386	*fpvG*	PA2403
fpvI	PA2387	*fpvH*	PA2404
fpvR	PA2388	*fpvJ*	PA2405
pvdR	PA2389	*fpvK*	PA2406
pvdT	PA2390	*fpvC*	PA2407
opmQ	PA2391	*fpvD*	PA2408
pvdP	PA2392	*fpvE*	PA2409
pvdM	PA2393	*fpvF*	PA2410
pvdN	PA2394		PA2411
pvdO	PA2395		PA2412
pvdF	PA2396	*pvdH*	PA2413
pvdE	PA2397	*pvdL*	PA2424
fpvA	PA2398	*pvdG*	PA2425
pvdD	PA2399	*pvdS*	PA2426
pvdJ	PA2400	*fpvB*	PA4168

fptX	PA4218
fptC	PA4219
fptB	PA4220
fptA	PA4221
pchH	PA4222
pchI	PA4223
pchG	PA4224
pchF	PA4225
pchE	PA4226
pchR	PA4227
pchD	PA4228
pchC	PA4229
pchB	PA4230
pchA	PA4231

Tableau Annexe 4 : Noms de protéines des voies Pvd et Pch et leurs numéros de gène chez *P. aeruginosa* PAO1

Hème	
phuW	PA4705
phuV	PA4706
phuU	PA4707
phuT	PA4708
phuS	PA4709
phuR	PA4710
hasE	PA3405
hasD	PA3406
hasAp	PA3407
hasR	PA3408
hasS	PA3409
hasI	PA3410
Fe2+	
feoC	PA4357
feoB	PA4358
feoA	PA4359
Citrate	
fecI	PA3899
fecR	PA3900
fecA	PA3901

Enterobactin	
pirA	PA0931
pfeR	PA2686
pfeS	PA2687
pfeA	PA2688
fepC	PA4158
fepB	PA4159
fepD	PA4160
fepG	PA4161
Aerobactine/ Rhizobactine 1021/ Schizokinen	
chtA	PA4675
Vibriobactine	
fvbA	PA4156
Ferrioxamine	
foxA	PA2466
foxI	PA2467
foxR	PA2468
Fe3+	
hitA	PA4687
hitB	PA4688

Ferrichrome	
fiuA	PA0470
fiuR	PA0471
fiuI	PA0472
Mycobactine	
femA	PA1910
femR	PA1911
femI	PA1912
Ferritin	
bfrB	PA3531
ftnA	PA4235
bfd	PA3530
Régulation	
fur	PA4764
Complexe Ton-B	
tonB1	PA5531
tonB2	PA0197
tonB3	PA0406
exbB1	PA0198
exbB2	PA0693
exbD1	PA0199
exbD2	PA0694
Autres	
	PA5216
	PA5217
	PA5218

Tableau Annexe 5 : Noms de protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et leurs numéros de gène chez *P. aeruginosa* PAO1

			PAO1	Δ*pvdF*Δ*pchA*				
Pyochéline	LB	SM	CAA	LB	SM	CAA		
fptX	PA4218	*15599414*	0	1	1	0	1	1
fptC	PA4219	*15599415*	0	0	0	0	0	0
fptB	PA4220	*15599416*	0	2	0	0	1	1
fptA	PA4221	*15599417*	3	22	24	0	16	25
pchH	PA4222	*15599418*	0	5	7	0	3	7
pchI	PA4223	*15599419*	0	6	5	0	6	6
pchG	PA4224	*15599420*	0	6	6	0	5	5
pchF	PA4225	*15599421*	2	15	22	0	10	27
pchE	PA4226	*15599422*	1	19	27	0	17	32
pchR	PA4227	*15599423*	0	1	1	0	1	1
pchD	PA4228	*15599424*	1	5	7	0	5	11
pchC	PA4229	*15599425*	0	0	0	0	0	3
pchB	PA4230	*15599426*	5	5	2	0	4	4
pchA	PA4231	*15599427*	1	3	2	0	0	0
Pyoverdine	LB	SM	CAA	LB	SM	CAA		
pvdQ	PA2385	*15597581*	0	9	9	0	7	8
pvdA	PA2386	*15597582*	0	16	15	0	16	19
fpvI	PA2387	*15597583*	0	1	0	0	1	0
fpvR	PA2388	*15597584*						
pvdR	PA2389	*15597585*	0	5	10	0	5	6
pvdT	PA2390	*15597586*	0	3	5	0	5	5
opmQ	PA2391	*15597587*	0	3	6	0	4	4
pvdP	PA2392	*15597588*	0	7	5	0	5	3
pvdM	PA2393	*15597589*	1	8	9	0	8	9
pvdN	PA2394	*15597590*	0	7	6	0	4	5
pvdO	PA2395	*15597591*	0	1	2	0	2	2
pvdF	PA2396	*15597592*	0	2	2	0	0	0
pvdE	PA239	*15597*	0	7	6	0	6	5

	7	*593*						
fpvA	PA2398	*15597594*	1	21	18	0	21	17
pvdD	PA2399	*15597595*	0	19	22	0	16	18
pvdJ	PA2400	*110227056*	0	26	24	0	22	22
pvdI	PA2402	*15597598*	0	46	58	0	43	50
fpvG	PA2403	*15597599*	0	1	1	0	1	1
fpvH	PA2404	*15597600*	0	0	0	0	0	0
fpvJ	PA2405	*15597601*	0	0	0	0	0	1
fpvK	PA2406	*15597602*	0	0	1	0	1	1
fpvC	PA2407	*15597603*	1	4	2	0	3	2
fpvD	PA2408	*15597604*	0	0	0	0	0	0
fpvE	PA2409	*15597605*						
fpvF	PA2410	*15597606*	1	2	4	0	3	3
	PA2411	*15597607*	0	3	2	0	3	2
	PA2412	*15597608*						
pvdH	PA2413	*15597609*	0	17	17	0	15	19
pvdL	PA2424	*15597620*	0	49	64	0	46	50
pvdG	PA2425	*15597621*						
pvdS	PA2426	*15597622*	0	0	0	0	1	0
fpvB	PA4168	*15599363*	0	5	5	0	4	5
Citrate			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
	PA3899	*15599094*						
fecR	PA3900	*15599095*	0	0	0	0	0	0
fecA	PA3901	*15599096*	0	0	0	0	0	0
Fe2+								
feoC	PA4357	*15599553*						
feoB	PA4358	*15599554*	3	0	0	0	0	0
feoA	PA4359	*15599555*						
Hème								
	PA4705	*15599899*						
	PA4706	*15599900*	0	0	0	0	0	0
	PA4707	*15599901*	0	0	0	0	0	0
phuT	PA4708	*15599902*	0	7	8	0	7	8
phuS	PA4709	*15599903*	0	3	4	0	2	4
phuR	PA4710	*15599904*	0	12	13	0	18	15
	PA3404	*15598600*	0	0	0	0	0	0
hasE	PA3405	*15598601*						
hasD	PA3406	*15598602*						
hasAp	PA3407	*15598603*						
hasR	PA3408	*15598604*	0	2	5	0	3	4

Enterobactin								
pirA	PA0931	*15596128*	0	7	5	0	5	6
pfeR	PA2686	*15597882*	0	0	0	0	0	0
pfeS	PA2687	*15597883*	0	0	1	0	2	1
pfeA	PA2688	*15597884*	0	0	1	0	1	3
	PA2689	*15597885*	0	0	0	0	0	0
	PA2690	*15597886*						
	PA2691	*15597887*	0	0	2	0	0	3
fepC	PA4158	*15599353*	0	0	0	0	0	0
fepB	PA4159	*15599354*	0	2	1	0	1	1
fepD	PA4160	*15599355*						
fepG	PA4161	*15599356*						
Ferrioxamine								
foxA	PA2466	*15597662*	0	1	0	0	1	2
foxI	PA2467	*15597663*	0	0	1	0	0	1
foxR	PA2468	*15597664*						
Ferrichrome								
fiuA	PA0470	*15595667*	0	0	0	0	0	1
	PA0471	*15595668*	0	0	2	0	0	0
fiuI	PA0472	*15595669*	0	0	0	0	0	0
other Fe								
hitA	PA4687	*15599882*	7	4	5	4	5	4
hitB	PA4688	*15599883*						
	PA5216	*15600409*						
	PA5217	*15600410*	0	1	2	0	2	1
	PA5218	*15600411*						
Ferritin								
bcp	PA1008	*15596205*	0	3	2	0	2	2
bfp	PA3530	*15598726*						
bfrB	PA3531	*15598727*	1	1	1	1	1	1
ftnA	PA4235	*15599431*	1	1	1	1	2	3
	PA4880	*15600073*	3	0	0	2	0	0
Aerobactine/ Rhizobactine 1021/ Schizokinen								
chtA	PA4675	*15599870*	1	2	3	0	3	3
Vibriobactine								
fvbA	PA4156	*15599351*	0	1	4	0	0	2
Mycobactine								
femA	PA1910	*15597106*	0	0	0	0	1	0
femR	PA1911	*15597107*						
femI	PA1912	*15597108*						
Régulation								
fur	PA4764	*15599958*	1	1	3	1	1	3

			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
Porines								
oprC	PA3790	*15598985*	2	14	8	10	16	13
oprQ	PA2760	*15597956*	12	10	8	9	10	6
Transporteurs de méta								

ux								
corA	PA5268	*15600461*	0	0	0	2	0	0
hmtA	PA2435	*15597631*						
mgtA	PA4825	*15600018*	13	5	7	19	6	7
mgtE	PA0913	*15596110*	4	1	0	0	1	1
modA	PA1863	*15597060*	0	0	0	0	0	0
modB	PA1862	*15597059*						
modC	PA1861	*15597058*						
modD	PA1860	*15597057*	2	1	0	2	1	0
znuA	PA5498	*15600691*	0	1	0	0	1	0
znuB	PA5501	*15600694*						
znuC	PA5500	*15600693*						
Régulateur								
zur	PA5499	*15600692*	0	2	1	0	2	1

Protéine de membrane externe			LB	SM	CAA	LB	SM	CAA
fptA	PA4221	*15599417*	3	22	24		16	25
fpvA	PA2398	*15597594*	1	21	18		21	17
fpvB	PA4168	*15599363*		5	5		4	5
fecA	PA3901	*15599096*						0
phuR	PA4710	*15599904*		12	13		18	15
hasR	PA3408	*15598604*		2	5		3	4
pirA	PA0931	*15596128*		7	5		5	6
pfeA	PA2688	*15597884*			1		1	3
foxA	PA2466	*15597662*		1	0		1	2
fiuA	PA0470	*15595667*			0		0	1
	PA0151	*15595349*						
	PA0192	*15595390*						
	PA0434	*15595631*		4	4		6	4
vreA	PA0674	*15595871*						
	PA0781	*15595978*						
	PA1271	*15596468*			0			0
hxuC	PA1302	*15596499*			0			1
pfuA	PA1322	*15596519*						
	PA1365	*15596562*			0		2	1
	PA1613	*15596810*			0			
femA	PA1910	*15597106*			0		1	0
cirA	PA1922	*15597118*						
	PA2057	*15597253*						
	PA2070	*15597266*						
	PA2089	*15597285*			0			
	PA2289	*15597485*			1			1
optO	PA2335	*15597531*						
	PA2590	*15597786*						

	PA2911	*15598107*						
	PA3268	*15598464*			1			1
	PA4156	*15599351*		1	4			2
piuA	PA4514	*15599710*		2	2		4	6
iutA	PA4675	*15599870*	1	2	3		3	3
	PA4837	*15600030*					0	
optI	PA4897	*15600090*						0
chtA	PA4675	*15599870*	1	2	3		3	3
oprB	PA3186	*15598382*	1	1	2	1	2	2
oprC	PA3790	*15598985*	2	14	8	10	16	13
oprD	PA0958	*15596155*	10	9	7	9	7	8
oprE	PA0291	*15595488*	2	8	4	5	7	3
oprF	PA1777	*15596974*	64	23	15	44	20	17
oprG	PA4067	*15599262*	4		0			0
oprH	PA1178	*15596375*		3	3	2	2	2
oprJ	PA4597	*15599793*						
oprM	PA0427	*15595624*	2	3	4	2	4	4
oprN	PA2495	*15597691*						
oprO	PA3280	*15598476*						
oprP	PA3279	*15598475*						
oprQ	PA2760	*15597956*	12	10	8	9	10	6
opr86	PA3648	*15598844*		8	8	5	10	9
opdT	PA2505	*15597701*						
	PA2291	*15597487*	1	1	2	1	2	2

Tableau Annexe 6 : Protéome de *P. aeruginosa* PAO1 et Δ*pvdF*Δ*pchA* dans les conditions de croissance LB, SM et CAA.

Communications scientifiques

Publications

V. Gasser, L. Guillon, **O. Cunrath** and I. J. Schalk (2014). "Cellular organization of siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa : evidence for siderosomes." Journal of Inorganic Biochemistry. *accepted*

O. Cunrath, V. Gasser, F. Hoegy, C. Reimmann, L. Guillon and I. J. Schalk (2014). "A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa." Environ Microbiol.

R. Jiang, A. Taly, D. Lemoine, A. Martz, **O. Cunrath** and T. Grutter (2012). "Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels." EMBO J **31**(9): 2134-2143.

Communication orale

Cunrath O., Guillon L., Schalk I. J., Cell biology investigation of the pyochelin pathway implicated in the iron transport in Pseudomonas aeruginosa, Séminaire de microbiologie de Strasbourg, Strasbourg. Avril 2013

Cunrath O., Guillon L., Schalk I. J.,Localisation cellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la pyochéline chez Pseu*domonas aeruginosa*, GDR Pseudomonas, Loulans. Septembre 2013

Communications par affiche

Cunrath O., Guillon L., Schalk I.J., Cell biology investigation of the pyochelin pathway in *Pseudomonas aeruginosa*, International IMBG meeting, Autrans. Septembre 2012

Cunrath O., Guillon L., Schalk I.J., High cellular oragnization of the pyochelin siderophore biosynthesis pathway, Pseudomonas, Lausanne. Septembre 2013

Cunrath O., Guillon L. Hoegy F., Gasser V., Schalk I. J. A cell biology view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*, Séminaire de microbiologie de Strasbourg, Illkirch. Avril 2014

Cunrath O., Guillon L. Hoegy F., Gasser V., Schalk I. J. A cell biology view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*, Journée de Campus d'Illkirch, Illkirch. Avril 2014

Bibliographie

Ackerley, D. F., *et al.* (2003). "Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **185**(9): 2848-2855.

Adams, H., *et al.* (2006). "Interaction of TonB with the outer membrane receptor FpvA of Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **188**(16): 5752-5761.

Albrecht-Gary, A. M., *et al.* (1994). "Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of Pseudomonas aeruginosa." Inorg Chem **33**(6391-6402).

Alibaud, L., *et al.* (2008). "Pseudomonas aeruginosa virulence genes identified in a Dictyostelium host model." Cell Microbiol **10**(3): 729-740.

Allesen-Holm, M., *et al.* (2006). "A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms." Mol Microbiol **59**(4): 1114-1128.

Andersen, C. B., *et al.* (2012). "Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex." Nature **489**(7416): 456-459.

Andrews, S. C., *et al.* (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-237.

Apidianakis, Y. and L. G. Rahme (2009). "Drosophila melanogaster as a model host for studying Pseudomonas aeruginosa infection." Nat Protoc **4**(9): 1285-1294.

Arhin, A. and C. Boucher (2010). "The outer membrane protein OprQ and adherence of Pseudomonas aeruginosa to human fibronectin." Microbiology **156**(Pt 5): 1415-1423.

Artym, J. (2010). "[The role of lactoferrin in the iron metabolism. Part II. Antimicrobial and antiinflammatory effect of lactoferrin by chelation of iron]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **64**: 604-616.

Bagg, A. and J. B. Neilands (1987). "Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli." Biochemistry **26**(17): 5471-5477.

Bailey, S. W. (1980). "Summery of the recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals." American Mineralogist **65**: 1-7.

Banin, E., *et al.* (2008). "The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-Pseudomonas therapeutic agent." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16761-16766.

Barbier, M., *et al.* (2014). "From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of Pseudomonas aeruginosa from 22 degrees C to 37 degrees C." PLoS One **9**(2): e89941.

Barker, K. D., *et al.* (2012). "Metabolic flux of extracellular heme uptake in Pseudomonas aeruginosa is driven by the iron-regulated heme oxygenase (HemO)." J Biol Chem **287**(22): 18342-18350.

Baysse, C., *et al.* (2000). "Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **146 (Pt 10)**: 2425-2434.

Behrends, V., *et al.* (2013). "Metabolic adaptations of Pseudomonas aeruginosa during cystic fibrosis chronic lung infections." Environ Microbiol **15**(2): 398-408.

Bhakta, M. N. and A. Wilks (2006). "The mechanism of heme transfer from the cytoplasmic heme binding protein PhuS to the delta-regioselective heme oxygenase of Pseudomonas aeruginosa." Biochemistry **45**(38): 11642-11649.

Biville, F., *et al.* (2004). "Haemophore-mediated signalling in Serratia marcescens: a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition." Mol Microbiol **53**(4): 1267-1277.

Bockheim, J. G. and A. N. Gennadiyev (2000). "The role of soil-forming processes in the definition of taxa in Soil Taxonomy and the World Soil Referebce Base." Geoderma **95**: 53-72.

Bokhove, M., *et al.* (2010). "The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 686-691.

Borlee, B. R., *et al.* (2010). "Pseudomonas aeruginosa uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix." Mol Microbiol **75**(4): 827-842.

Brandel, J., *et al.* (2012). "Pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes." Dalton Trans **41**(9): 2820-2834.

Braud, A., *et al.* (2010). "Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in Pseudomonas aeruginosa and increases bacterial metal tolerance." Environ Microbiol Rep **2**(3): 419-425.

Braud, A., *et al.* (2009). "The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity." J Bacteriol **191**(11): 3517-3525.

Braud, A., *et al.* (2009). "New insights into the metal specificity of the Pseudomonas aeruginosa pyoverdine-iron uptake pathway." Environ Microbiol **11**(5): 1079-1091.

Braun, V. (1997). "Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface." Arch Microbiol **167**(6): 325-331.

Braymer, J. J. and D. P. Giedroc (2014). "Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens." Curr Opin Chem Biol **19**: 59-66.

Brickman, T. J. and M. A. McIntosh (1992). "Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from Escherichia coli. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex." J Biol Chem **267**(17): 12350-12355.

Brillet, K., *et al.* (2007). "A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif." Structure **15**(11): 1383-1391.

Brillet, K., *et al.* (2011). "Pyochelin enantiomers and their outer-membrane siderophore transporters in fluorescent pseudomonads: structural bases for unique enantiospecific recognition." J Am Chem Soc **133**(41): 16503-16509.
Brillet, K., *et al.* (2012). "An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa." ACS Chem Biol **7**(12): 2036-2045.
Britigan, B. E., *et al.* (1997). "Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the Pseudomonas aeruginosa siderophore pyochelin." Infect Immun **65**(3): 1071-1076.
Byrd, M. S., *et al.* (2009). "Genetic and biochemical analyses of the Pseudomonas aeruginosa Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production." Mol Microbiol **73**(4): 622-638.
Carrondo, M. A. (2003). "Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint." EMBO J **22**(9): 1959-1968.
Cartron, M. L., *et al.* (2006). "Feo--transport of ferrous iron into bacteria." Biometals **19**(2): 143-157.
Chakraborty, R., *et al.* (2007). "Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of Escherichia coli." Biometals **20**(3-4): 263-274.
Chaturvedi, K. S., *et al.* (2012). "The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection." Nat Chem Biol **8**(8): 731-736.
Chua, S. L., *et al.* (2014). "Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles." Nat Commun **5**: 4462.
Cianciotto, N. P. (2007). "Iron acquisition by Legionella pneumophila." Biometals **20**(3-4): 323-331.
Clatworthy, A. E., *et al.* (2009). "Pseudomonas aeruginosa infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants." Infect Immun **77**(4): 1293-1303.
Clement, E., *et al.* (2004). "The binding mechanism of pyoverdin with the outer membrane receptor FpvA in Pseudomonas aeruginosa is dependent on its iron-loaded status." Biochemistry **43**(24): 7954-7965.
Cobessi, D., *et al.* (2005). "The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from Pseudomonas aeruginosa at 3.6 angstroms resolution." J Mol Biol **347**(1): 121-134.
Cobessi, D., *et al.* (2005). "Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from Pseudomonas aeruginosa." J Mol Biol **352**(4): 893-904.
Coffey, B. M., *et al.* (2014). "MgtE is a dual-function protein in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **160**(Pt 6): 1200-1213.
Cohen-Solal, A., *et al.* (2014). "Iron deficiency: an emerging therapeutic target in heart failure." Heart.
Colvin, K. M., *et al.* (2011). "The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of Pseudomonas aeruginosa." PLoS Pathog **7**(1): e1001264.
Conway, T. M. and S. G. John (2014). "Quantification of dissolved iron sources to the North Atlantic Ocean." Nature **511**(7508): 212-215.
Cornelis, P. (2010). "Iron uptake and metabolism in pseudomonads." Appl Microbiol Biotechnol **86**(6): 1637-1645.
Cornelis, P. and J. Bodilis (2009). "A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads." Environ Microbiol Rep **1**(4): 256-262.
Cornelis, P. and J. Dingemans (2013). "Pseudomonas aeruginosa adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections." Front Cell Infect Microbiol **3**: 75.
Cornelis, P., *et al.* (1989). "Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among Pseudomonas aeruginosa strains." Infect Immun **57**(11): 3491-3497.
Cornelis, P., *et al.* (2009). "Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa." Biometals **22**(1): 15-22.

Cornelis, P., *et al.* (2011). "Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria." Metallomics **3**(6): 540-549.
Cox, C. D., *et al.* (1981). "Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4256-4260.
Cuiv, P. O., *et al.* (2004). "Identification of rhtX and fptX, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by Sinorhizobium meliloti and pyochelin by Pseudomonas aeruginosa, respectively." J Bacteriol **186**(10): 2996-3005.
Cuiv, P. O., *et al.* (2006). "Identification and characterization of an iron-regulated gene, chtA, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **152**(Pt 4): 945-954.
Cuiv, P. O., *et al.* (2007). "FoxB of Pseudomonas aeruginosa functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane." J Bacteriol **189**(1): 284-287.
Cunrath, O., *et al.* (2014). "A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa." Environ Microbiol.
Cvetkovic, A., *et al.* (2010). "Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized." Nature **466**(7307): 779-782.
Davies, K. J., *et al.* (1989). "The effect of oxygen on denitrification in Paracoccus denitrificans and Pseudomonas aeruginosa." J Gen Microbiol **135**(9): 2445-2451.
de Amorim, G. C., *et al.* (2013). "The structure of HasB reveals a new class of TonB protein fold." PLoS One **8**(3): e58964.
Dean, C. R., *et al.* (1996). "PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **178**(18): 5361-5369.
Dean, C. R. and K. Poole (1993). "Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **175**(2): 317-324.
Dean, C. R. and K. Poole (1993). "Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of Pseudomonas aeruginosa: involvement of a two-component regulatory system." Mol Microbiol **8**(6): 1095-1103.
Drake, E. J. and A. M. Gulick (2011). "Structural characterization and high-throughput screening of inhibitors of PvdQ, an NTN hydrolase involved in pyoverdine synthesis." ACS Chem Biol **6**(11): 1277-1286.
Drakesmith, H. and A. Prentice (2008). "Viral infection and iron metabolism." Nat Rev Microbiol **6**(7): 541-552.
Duchesne, R., *et al.* (2013). "A proteomic approach of SigX function in Pseudomonas aeruginosa outer membrane composition." J Proteomics **94**: 451-459.
Dupont, C. L., *et al.* (2006). "Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17822-17827.
Dworkin, J. (2009). "Cellular polarity in prokaryotic organisms." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(6): a003368.
Ecker, D. J., *et al.* (1982). "Role of two siderophores in Ustilago sphaerogena. Regulation of biosynthesis and uptake mechanisms." Biochim Biophys Acta **720**(3): 242-249.
Elias, S., *et al.* (2011). "FvbA is required for vibriobactin utilization in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **157**(Pt 7): 2172-2180.
Ellison, M. L., *et al.* (2013). "The transcriptional regulator Np20 is the zinc uptake regulator in Pseudomonas aeruginosa." PLoS One **8**(9): e75389.
Eschbach, M., *et al.* (2004). "Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa via pyruvate fermentation." J Bacteriol **186**(14): 4596-4604.
Farnaud, S. and R. W. Evans (2003). "Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties." Mol Immunol **40**(7): 395-405.

Feinbaum, R. L., *et al.* (2012). "Genome-wide identification of Pseudomonas aeruginosa virulence-related genes using a Caenorhabditis elegans infection model." PLoS Pathog **8**(7): e1002813.

Ferguson, A. D. and J. Deisenhofer (2004). "Metal import through microbial membranes." Cell **116**(1): 15-24.

Fillat, M. F. (2014). "The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators." Arch Biochem Biophys **546**: 41-52.

Folkesson, A., *et al.* (2012). "Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective." Nat Rev Microbiol **10**(12): 841-851.

Friedman, L. and R. Kolter (2004). "Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix." J Bacteriol **186**(14): 4457-4465.

Fuxman Bass, J. I., *et al.* (2010). "Extracellular DNA: a major proinflammatory component of Pseudomonas aeruginosa biofilms." J Immunol **184**(11): 6386-6395.

Gaille, C., *et al.* (2002). "Salicylate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities." J Biol Chem **277**(24): 21768-21775.

Gaille, C., *et al.* (2003). "Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of Pseudomonas aeruginosa." J Biol Chem **278**(19): 16893-16898.

Garcia-Contreras, R., *et al.* (2013). "Isolation and characterization of gallium resistant Pseudomonas aeruginosa mutants." Int J Med Microbiol **303**(8): 574-582.

Garenaux, A., *et al.* (2011). "The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic Escherichia coli." Vet Microbiol **153**(1-2): 89-98.

Gasser, V., *et al.* (2015). "Cellular organization of siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for siderosomes." J Inorg Biochem.

Ge, R. G., *et al.* (2013). "Nickel trafficking system responsible for urease maturation in Helicobacter pylori." World J Gastroenterol **19**(45): 8211-8218.

Genco, C. A. and D. W. Dixon (2001). "Emerging strategies in microbial haem capture." Mol Microbiol **39**(1): 1-11.

Ghysels, B., *et al.* (2005). "The Pseudomonas aeruginosa pirA gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues." FEMS Microbiol Lett **246**(2): 167-174.

Giedroc, D. P. and A. I. Arunkumar (2007). "Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches." Dalton Trans(29): 3107-3120.

Giraud, C., *et al.* (2011). "The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first non-archetypal Pseudomonas aeruginosa chaperone-usher pathway system assembling fimbriae." Environ Microbiol **13**(3): 666-683.

Gloag, E. S., *et al.* (2013). "Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(28): 11541-11546.

Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia." Microbiol Rev **60**(3): 539-574.

Greenwald, J., *et al.* (2007). "Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in Pseudomonas aeruginosa. A role for ferrous iron." J Biol Chem **282**(5): 2987-2995.

Greenwald, J., *et al.* (2009). "FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter." Mol Microbiol **72**(5): 1246-1259.

Groisman, E. A., *et al.* (2013). "Bacterial Mg2+ homeostasis, transport, and virulence." Annu Rev Genet **47**: 625-646.

Gross, H. and J. E. Loper (2009). "Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp." Nat Prod Rep **26**(11): 1408-1446.

Grundlinger, M., *et al.* (2013). "Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes." Mol Microbiol **88**(5): 862-875.
Guillon, L., *et al.* (2013). "Deciphering protein dynamics of the siderophore pyoverdine pathway in Pseudomonas aeruginosa." PLoS One **8**(10): e79111.
Guillon, L., *et al.* (2012). "High cellular organization of pyoverdine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: clustering of PvdA at the old cell pole." Environ Microbiol **14**(8): 1982-1994.
Guskov, A. and S. Eshaghi (2012). "The mechanisms of Mg2+ and Co2+ transport by the CorA family of divalent cation transporters." Curr Top Membr **69**: 393-414.
Hall-Stoodley, L., *et al.* (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." Nat Rev Microbiol **2**(2): 95-108.
Hamza, I. and H. A. Dailey (2012). "One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans." Biochim Biophys Acta **1823**(9): 1617-1632.
Hannauer, M., *et al.* (2010). "The ferrichrome uptake pathway in Pseudomonas aeruginosa involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome." J Bacteriol **192**(5): 1212-1220.
Hannauer, M., *et al.* (2012). "The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa." Environ Microbiol **14**(7): 1696-1708.
Hannauer, M., *et al.* (2012). "Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of Pseudomonas aeruginosa involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain." FEBS Lett **586**(1): 96-101.
Hannauer, M., *et al.* (2010). "An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by Pseudomonas aeruginosa." FEBS Lett **584**(23): 4751-4755.
Hantash, F. M. and C. F. Earhart (2000). "Membrane association of the Escherichia coli enterobactin synthase proteins EntB/G, EntE, and EntF." J Bacteriol **182**(6): 1768-1773.
Hare, N. J., *et al.* (2012). "Proteomics of Pseudomonas aeruginosa Australian epidemic strain 1 (AES-1) cultured under conditions mimicking the cystic fibrosis lung reveals increased iron acquisition via the siderophore pyochelin." J Proteome Res **11**(2): 776-795.
Hare, N. J., *et al.* (2012). "Proteomic profiling of Pseudomonas aeruginosa AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain." BMC Microbiol **12**: 16.
Harrison, J. J., *et al.* (2007). "Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms." Nat Rev Microbiol **5**(12): 928-938.
Harrison, J. J., *et al.* (2009). "Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance." Environ Microbiol **11**(10): 2491-2509.
Heinrichs, D. E. and K. Poole (1993). "Cloning and sequence analysis of a gene (pchR) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **175**(18): 5882-5889.
Hernlem, B. J., *et al.* (1996). "Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations." Inorganic Chimica Acta **244**: 179-184.
Hider, R. C. and X. Kong (2010). "Chemistry and biology of siderophores." Nat Prod Rep **27**(5): 637-657.
Higuchi, K., *et al.* (2014). "Early senescence of the oldest leaves of Fe-deficient barley plants may contribute to phytosiderophore release from the roots." Physiol Plant **151**(3): 313-322.
Hodgkinson, V. and M. J. Petris (2012). "Copper homeostasis at the host-pathogen interface." J Biol Chem **287**(17): 13549-13555.

Hoegy, F., *et al.* (2009). "Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent pseudomonads." J Biol Chem **284**(22): 14949-14957.

Horng, T. and R. Medzhitov (2001). "Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12654-12658.

Hrkal, Z. and S. Klementova (1984). "Bilirubin and haeme binding to human serum albumin studied by spectroscopy methods." Int J Biochem **16**(7): 799-804.

Imperi, F., *et al.* (2013). "Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of Pseudomonas aeruginosa pathogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(18): 7458-7463.

Imperi, F., *et al.* (2008). "Membrane-association determinants of the omega-amino acid monooxygenase PvdA, a pyoverdine biosynthetic enzyme from Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **154**(Pt 9): 2804-2813.

Imperi, F. and P. Visca (2013). "Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of Pseudomonas aeruginosa: a membrane-associated "siderosome"." FEBS Lett **587**(21): 3387-3391.

Iobbi-Nivol, C. and S. Leimkuhler (2013). "Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in Escherichia coli." Biochim Biophys Acta **1827**(8-9): 1086-1101.

Irie, Y., *et al.* (2012). "Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(50): 20632-20636.

Irving, H. and R. J. P. Williams (1948). "Order of stability of metal complexes." Nature **162**: 746-747.

Kammler, M., *et al.* (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of Escherichia coli." J Bacteriol **175**(19): 6212-6219.

Kato, A., *et al.* (1999). "Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in Escherichia coli K-12: identification of extracellular Mg2+-responsive promoters." J Bacteriol **181**(17): 5516-5520.

Kim, H., *et al.* (2015). "Lon-Mediated Proteolysis of the FeoC Protein Prevents Salmonella enterica from Accumulating the Fe(II) Transporter FeoB under High-Oxygen Conditions." J Bacteriol **197**(1): 92-98.

Klumpp, C., *et al.* (2005). "From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin." Bioorg Med Chem Lett **15**(6): 1721-1724.

Kuznetsova, M. V., *et al.* (2013). "Interactions of Pseudomonas aeruginosa in predominant biofilm or planktonic forms of existence in mixed culture with Escherichia coli in vitro." Can J Microbiol **59**(9): 604-610.

Laghaei, R., *et al.* (2014). "Calculation of Iron Transport through Human H-chain Ferritin." J Phys Chem A.

Lamb, A. L. (2011). "Pericyclic reactions catalyzed by chorismate-utilizing enzymes." Biochemistry **50**(35): 7476-7483.

Lamont, I. L., *et al.* (2002). "Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in Pseudomonasaeruginosa." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7072-7077.

Lavoie, E. G., *et al.* (2011). "Innate immune responses to Pseudomonas aeruginosa infection." Microbes Infect **13**(14-15): 1133-1145.

Lee, J. W. and J. D. Helmann (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." Biometals **20**(3-4): 485-499.

Lefevre, J., *et al.* (2008). "Modulation by substrates of the interaction between the HasR outer membrane receptor and its specific TonB-like protein, HasB." J Mol Biol **378**(4): 840-851.

Leid, J. G., *et al.* (2005). "The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." J Immunol **175**(11): 7512-7518.

Lemire, J., *et al.* (2010). "Pseudomonas fluorescens orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity." Environ Microbiol **12**(6): 1384-1390.

Lemire, J. A., *et al.* (2013). "Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications." Nat Rev Microbiol **11**(6): 371-384.

Lessie, T. G. and F. C. Neidhardt (1967). "Formation and operation of the histidine-degrading pathway in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **93**(6): 1800-1810.

Letoffe, S., *et al.* (1999). "Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR." Mol Microbiol **33**(3): 546-555.

Letoffe, S., *et al.* (1998). "Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from Pseudomonas aeruginosa that shares function and sequence similarities with the Serratia marcescens HasA haemophore." Mol Microbiol **28**(6): 1223-1234.

Lewenza, S., *et al.* (2005). "Genome-wide identification of Pseudomonas aeruginosa exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen." Genome Res **15**(2): 321-329.

Lewin, A. C., *et al.* (2002). "The ferric uptake regulator of Pseudomonas aeruginosa has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion." Microbiology **148**(Pt 8): 2449-2456.

Lewinson, O., *et al.* (2009). "A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4677-4682.

Lewis, G. N. (1923). Valence and the structure of atoms and molecules. New York, The Chemical Catalog Company, inc.

Lewis, K. (2010). "Persister cells." Annu Rev Microbiol **64**: 357-372.

Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." Nature **460**(7257): 831-838.

Lima, W. C., *et al.* (2011). "What can Dictyostelium bring to the study of Pseudomonas infections?" Semin Cell Dev Biol **22**(1): 77-81.

Limmer, S., *et al.* (2011). "Virulence on the fly: Drosophila melanogaster as a model genetic organism to decipher host-pathogen interactions." Curr Drug Targets **12**(7): 978-999.

Lin, H., *et al.* (2005). "In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes." J Am Chem Soc **127**(31): 11075-11084.

Lin, P. C., *et al.* (2013). "In vitro-binding of the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantiopyochelin to their AraC-type regulators PchR in Pseudomonas." Biometals **26**(6): 1067-1073.

Lisher, J. P. and D. P. Giedroc (2013). "Manganese acquisition and homeostasis at the host-pathogen interface." Front Cell Infect Microbiol **3**: 91.

Llamas, M. A., *et al.* (2014). "Cell-surface signaling in Pseudomonas: stress responses, iron transport, and pathogenicity." FEMS Microbiol Rev **38**(4): 569-597.

Llamas, M. A., *et al.* (2008). "Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems." Mol Microbiol **67**(2): 458-472.

Llamas, M. A., *et al.* (2006). "The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **188**(5): 1882-1891.

Llamas, M. A., *et al.* (2009). "A Novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in Pseudomonas aeruginosa." PLoS Pathog **5**(9): e1000572.

Loomis, L. D. and K. N. Raymond (1991). "Solution equilibria of enterobactin and metal-enterobactin complexes." Inorg Chem **30**(5): 906-911.

Ma, L., *et al.* (2009). "Assembly and development of the Pseudomonas aeruginosa biofilm matrix." PLoS Pathog **5**(3): e1000354.

Ma, L., *et al.* (2007). "Pseudomonas aeruginosa Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide." J Bacteriol **189**(22): 8353-8356.
Ma, Z., *et al.* (2009). "Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing." Chem Rev **109**(10): 4644-4681.
Madigan, M., *et al.* (2012). Biology of Microorganisms. San Francisco, Perason Education, Inc.
Malki, I., *et al.* (2014). "Interaction of a partially disordered antisigma factor with its partner, the signaling domain of the TonB-dependent transporter HasR." PLoS One **9**(4): e89502.
Manara, A., *et al.* (2012). "Pseudomonas putida response to cadmium: changes in membrane and cytosolic proteomes." J Proteome Res **11**(8): 4169-4179.
Marshall, B., *et al.* (2009). "Citrate-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter." Microbiology **155**(Pt 1): 305-315.
Masi, M. and C. Wandersman (2010). "Multiple signals direct the assembly and function of a type 1 secretion system." J Bacteriol **192**(15): 3861-3869.
McMorran, B. J., *et al.* (2001). "Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **147**(Pt 6): 1517-1524.
Meile, L., *et al.* (1982). "Regulation of proline catabolism in Pseudomonas aeruginosa PAO." Arch Microbiol **132**(2): 189-193.
Meneely, K. M., *et al.* (2009). "Kinetic mechanism of ornithine hydroxylase (PvdA) from Pseudomonas aeruginosa: substrate triggering of O2 addition but not flavin reduction." Biochemistry **48**(20): 4371-4376.
Meneely, K. M., *et al.* (2013). "Lysine221 is the general base residue of the isochorismate synthase from Pseudomonas aeruginosa (PchA) in a reaction that is diffusion limited." Arch Biochem Biophys **538**(1): 49-56.
Meneely, K. M., *et al.* (2013). "Redesign of MST enzymes to target lyase activity instead promotes mutase and dehydratase activities." Arch Biochem Biophys **539**(1): 70-80.
Meyer, J. M. (1992). "Exogenous siderophore-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: possible involvement of porin OprF in iron translocation." J Gen Microbiol **138**(5): 951-958.
Meyer, J. M. and M. A. Abdallah (1978). "The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescence: biosynthesis, purification and physicochemical properties." J Gen Microbiol **107**: 319-328.
Meyer, J. M., *et al.* (2008). "Siderotyping of fluorescent Pseudomonas: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method." Biometals **21**(3): 259-271.
Meyer, J. M. and J. Hornspreger (1978). "Role of pyoverdine the iron binding fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescence iron transport." J Gen Microbiol **107**(329-331).
Michel, L., *et al.* (2007). "Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **153**(Pt 5): 1508-1518.
Michel, L., *et al.* (2005). "PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of Pseudomonas aeruginosa requires the siderophore pyochelin as an effector." Mol Microbiol **58**(2): 495-509.
Mishra, M., *et al.* (2012). "Pseudomonas aeruginosa Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization." Cell Microbiol **14**(1): 95-106.
Mislin, G. L., *et al.* (2006). "Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of Pseudomonas aeruginosa." J Mol Biol **357**(5): 1437-1448.
Moore, G. R., *et al.* (1994). "Structural heterogeneity of Pseudomonas aeruginosa bacterioferritin." Biochem J **304 (Pt 2)**: 493-497.

Moore, S. J., *et al.* (2014). "Towards a cell factory for vitamin B production in Bacillus megaterium: bypassing of the cobalamin riboswitch control elements." N Biotechnol.

Mossialos, D., *et al.* (2002). "Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine." Mol Microbiol **45**(6): 1673-1685.

Mulcahy, H., *et al.* (2008). "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms." PLoS Pathog **4**(11): e1000213.

Mulcahy, H., *et al.* (2010). "Pseudomonas aeruginosa produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source." Environ Microbiol **12**(6): 1621-1629.

Nadal-Jimenez, P., *et al.* (2014). "PvdP is a tyrosinase that drives maturation of the pyoverdine chromophore in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **196**(14): 2681-2690.

Nagar, E. and R. Schwarz (2014). "To be or not to be planktonic? Self-inhibition of biofilm development." Environ Microbiol.

Neubauer, U., *et al.* (2000). "Heavy Metal Sorption on Clay Minerals Affected by the Siderophore Desferrioxamine B." Environ. Sci. Technol. **34**: 2749-2755.

Nies, D. H. (1999). "Microbial heavy-metal resistance." Appl Microbiol Biotechnol **51**(6): 730-750.

Nies, D. H. (2003). "Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 313-339.

Nies, D. H. and S. Silver (2007). Molecular Microbiology of Heavy Metals. Berlin, Springer - Verlag.

Noinaj, N., *et al.* (2010). "TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function." Annu Rev Microbiol **64**: 43-60.

O'Neill, M. J. and A. Wilks (2013). "The P. aeruginosa heme binding protein PhuS is a heme oxygenase titratable regulator of heme uptake." ACS Chem Biol **8**(8): 1794-1802.

O'Toole, G., *et al.* (2000). "Biofilm formation as microbial development." Annu Rev Microbiol **54**: 49-79.

O'Toole, G. A. and R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development." Mol Microbiol **30**(2): 295-304.

Ochsner, U. A., *et al.* (2000). "Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **146 (Pt 1)**: 185-198.

Oglesby-Sherrouse, A. G. and E. R. Murphy (2013). "Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme." Metallomics **5**(4): 276-286.

Outten, C. E. and T. V. O'Halloran (2001). "Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis." Science **292**(5526): 2488-2492.

Park, J. H., *et al.* (2011). "An antimicrobial protein, lactoferrin exists in the sweat: proteomic analysis of sweat." Exp Dermatol **20**(4): 369-371.

Patel, H. M., *et al.* (2003). "Epimerization of an L-cysteinyl to a D-cysteinyl residue during thiazoline ring formation in siderophore chain elongation by pyochelin synthetase from Pseudomonas aeruginosa." Biochemistry **42**(35): 10514-10527.

Patel, H. M. and C. T. Walsh (2001). "In vitro reconstitution of the Pseudomonas aeruginosa nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities." Biochemistry **40**(30): 9023-9031.

Patzer, S. I. and K. Hantke (1998). "The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli." Mol Microbiol **28**(6): 1199-1210.

Payandeh, J., *et al.* (2013). "The structure and regulation of magnesium selective ion channels." Biochim Biophys Acta **1828**(11): 2778-2792.

Pearson, R. G. (1966). "Acids and bases." Science **151**(3707): 172-177.

Pederick, V. G., *et al.* (2014). "Acquisition and role of molybdate in Pseudomonas aeruginosa." Appl Environ Microbiol **80**(21): 6843-6852.

Poole, K., *et al.* (1990). "Enterobactin-mediated iron transport in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **172**(12): 6991-6996.

Porcheron, G., *et al.* (2013). "Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence." Front Cell Infect Microbiol **3**: 90.

Potvin, E., *et al.* (2008). "Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa." FEMS Microbiol Rev **32**(1): 38-55.

Quadri, L. E., *et al.* (1999). "Assembly of the Pseudomonas aeruginosa nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF." Biochemistry **38**(45): 14941-14954.

Rahme, L. G., *et al.* (2000). "Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8815-8821.

Rahme, L. G., *et al.* (1997). "Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13245-13250.

Ravel, J. and P. Cornelis (2003). "Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads." Trends Microbiol **11**(5): 195-200.

Raymond, K. N. and C. J. Carrano (1979). "Coordination Chemistry and Microbial Iron Transport." Accounts of Chemical Research **12**(5): 183-190.

Raymond, K. N., *et al.* (2003). "Enterobactin: an archetype for microbial iron transport." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3584-3588.

Reimmann, C. (2012). "Inner-membrane transporters for the siderophores pyochelin in Pseudomonas aeruginosa and enantio-pyochelin in Pseudomonas fluorescens display different enantioselectivities." Microbiology **158**(Pt 5): 1317-1324.

Reimmann, C., *et al.* (2001). "Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **183**(3): 813-820.

Reimmann, C., *et al.* (2004). "PchC thioesterase optimizes nonribosomal biosynthesis of the peptide siderophore pyochelin in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **186**(19): 6367-6373.

Reimmann, C., *et al.* (1998). "Dihydroaeruginoic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **144 (Pt 11)**: 3135-3148.

Reinhart, A., *et al.* (2014). "The prrF-encoded small regulatory RNAs are required for iron homeostasis and virulence of Pseudomonas aeruginosa." Infect Immun.

Rodriguez, G. M. (2006). "Control of iron metabolism in Mycobacterium tuberculosis." Trends Microbiol **14**(7): 320-327.

Rudner, D. Z. and R. Losick (2010). "Protein subcellular localization in bacteria." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a000307.

Rui, H., *et al.* (2012). "Protein dynamics and ion traffic in bacterioferritin." Biochemistry **51**(49): 9900-9910.

Sanders, J. D., *et al.* (1994). "Identification of a locus involved in the utilization of iron by Haemophilus influenzae." Infect Immun **62**(10): 4515-4525.

Sauer, K., *et al.* (2004). "Characterization of nutrient-induced dispersion in Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm." J Bacteriol **186**(21): 7312-7326.

Sauter, A., *et al.* (2003). "In vivo evidence for TonB dimerization." J Bacteriol **185**(19): 5747-5754.

Schalk, I. J., *et al.* (2002). "Recycling of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin uptake and dissociation in Pseudomonas aeruginosa." Biochemistry **41**(5): 1663-1671.

Schalk, I. J. and L. Guillon (2013). "Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways." Amino Acids **44**(5): 1267-1277.
Schalk, I. J. and L. Guillon (2013). "Pyoverdine biosynthesis and secretion in Pseudomonas aeruginosa: implications for metal homeostasis." Environ Microbiol **15**(6): 1661-1673.
Schalk, I. J., *et al.* (2011). "New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance." Environ Microbiol **13**(11): 2844-2854.
Schalk, I. J., *et al.* (2001). "Iron-free pyoverdin binds to its outer membrane receptor FpvA in Pseudomonas aeruginosa: a new mechanism for membrane iron transport." Mol Microbiol **39**(2): 351-360.
Schalk, I. J., *et al.* (2012). "Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore-iron outer membrane transporters." Curr Top Membr **69**: 37-66.
Schlegel, K., *et al.* (2006). "The X-ray structure of the pyochelin Fe3+ complex." Z Naturforsch C **61**(3-4): 263-266.
Schlegel, K., *et al.* (2004). "The stereoisomers of pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa." Biometals **17**(4): 409-414.
Schreiber, K., *et al.* (2006). "Anaerobic survival of Pseudomonas aeruginosa by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein." J Bacteriol **188**(2): 659-668.
Schubert, S., *et al.* (1999). "Ferric enterochelin transport in Yersinia enterocolitica: molecular and evolutionary aspects." J Bacteriol **181**(20): 6387-6395.
Serino, L., *et al.* (1997). "Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginoic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **179**(1): 248-257.
Seyedmohammad, S., *et al.* (2014). "Expression, purification and functional reconstitution of FeoB, the ferrous iron transporter from Pseudomonas aeruginosa." Protein Expr Purif **101**: 138-145.
Shapiro, L., *et al.* (2009). "Why and how bacteria localize proteins." Science **326**(5957): 1225-1228.
Shirley, M. and I. L. Lamont (2009). "Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **191**(18): 5634-5640.
Silby, M. W., *et al.* (2010). "Pseudomonas genomes: diverse and adaptable." FEMS Microbiol Rev **35**(4): 652-680.
Silver, S. and L. T. Phung (1996). "Bacterial heavy metal resistance: new surprises." Annu Rev Microbiol **50**: 753-789.
Simpson, J. A., *et al.* (1989). "Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages." Free Radic Biol Med **6**(4): 347-353.
Simpson, J. A., *et al.* (1993). "Alginate may accumulate in cystic fibrosis lung because the enzymatic and free radical capacities of phagocytic cells are inadequate for its degradation." Biochem Mol Biol Int **30**(6): 1021-1034.
Snouwaert, J. N., *et al.* (1992). "An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting." Science **257**(5073): 1083-1088.
Stanier, R. Y., *et al.* (1966). "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study." J Gen Microbiol **43**(2): 159-271.
Stover, C. K., *et al.* (2000). "Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
Suh, S. J., *et al.* (2002). "Effect of vfr mutation on global gene expression and catabolite repression control of Pseudomonas aeruginosa." Microbiology **148**(Pt 5): 1561-1569.
Sutherland, I. (2001). "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology **147**(Pt 1): 3-9.
Takeda, H., *et al.* (2014). "Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg2+ channel MgtE." Nat Commun **5**: 5374.

Tan, M. W. and F. M. Ausubel (2000). "Caenorhabditis elegans: a model genetic host to study Pseudomonas aeruginosa pathogenesis." Curr Opin Microbiol **3**(1): 29-34.

Tan, M. W., *et al.* (1999). "Pseudomonas aeruginosa killing of Caenorhabditis elegans used to identify P. aeruginosa virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2408-2413.

ter Beek, J., *et al.* (2014). "Structural diversity of ABC transporters." J Gen Physiol **143**(4): 419-435.

Thomas, M. S. (2007). "Iron acquisition mechanisms of the Burkholderia cepacia complex." Biometals **20**(3-4): 431-452.

Thulasiraman, P., *et al.* (1998). "Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria." J Bacteriol **180**(24): 6689-6696.

Traxler, M. F., *et al.* (2012). "Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy." Mol Microbiol **86**(3): 628-644.

Tricot, C., *et al.* (1994). "Purification and properties of a succinyltransferase from Pseudomonas aeruginosa specific for both arginine and ornithine." Eur J Biochem **224**(3): 853-861.

Tripathi, V. N. and S. Srivastava (2006). "Ni2+-uptake in Pseudomonas putida strain S4: a possible role of Mg2+-uptake pump." J Biosci **31**(1): 61-67.

Tseng, C. F., *et al.* (2006). "Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds." J Biol Inorg Chem **11**(4): 419-432.

Tsuji, A., *et al.* (1982). "The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods." Microbiol Immunol **26**(1): 15-24.

Vandenende, C. S., *et al.* (2004). "Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa PAO1." J Bacteriol **186**(17): 5596-5602.

Vander Wauven, C., *et al.* (1984). "Pseudomonas aeruginosa mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway." J Bacteriol **160**(3): 928-934.

Vasil, M. L. (2007). "How we learnt about iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa: a series of very fortunate events." Biometals **20**(3-4): 587-601.

Vasseur, P., *et al.* (2005). "The pel genes of the Pseudomonas aeruginosa PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation." Microbiology **151**(Pt 3): 985-997.

Visca, P., *et al.* (2002). "Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from Escherichia coli and Pseudomonas." Mol Microbiol **45**(5): 1177-1190.

Voulhoux, R., *et al.* (2006). "Pyoverdine-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: the Tat system is required for PvdN but not for FpvA transport." J Bacteriol **188**(9): 3317-3323.

Waldron, K. J. and N. J. Robinson (2009). "How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?" Nat Rev Microbiol **7**(1): 25-35.

Waldron, K. J., *et al.* (2009). "Metalloproteins and metal sensing." Nature **460**(7257): 823-830.

Wandersman, C. and P. Delepelaire (2004). "Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores." Annu Rev Microbiol **58**: 611-647.

Wandersman, C. and P. Delepelaire (2012). "Haemophore functions revisited." Mol Microbiol **85**(4): 618-631.

Wang, J., *et al.* (2014). "Enhanced succinic acid production and magnesium utilization by overexpression of magnesium transporter mgtA in Escherichia coli mutant." Bioresour Technol **170**: 125-131.

Wang, Y. and D. K. Newman (2008). "Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr)oxides and molecular oxygen." Environ Sci Technol **42**(7): 2380-2386.

Wang, Y., *et al.* (2011). "Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition." J Bacteriol **193**(14): 3606-3617.

Ward, P. P., *et al.* (2002). "Lactoferrin and host defense." Biochem Cell Biol **80**(1): 95-102.

Weaver, E. A., *et al.* (2013). "FeoA and FeoC are essential components of the Vibrio cholerae ferrous iron uptake system, and FeoC interacts with FeoB." J Bacteriol **195**(21): 4826-4835.

Weber, K. A., *et al.* (2006). "Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction." Nat Rev Microbiol **4**(10): 752-764.

Wei, Q. and L. Z. Ma (2013). "Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa." Int J Mol Sci **14**(10): 20983-21005.

Wilderman, P. J., *et al.* (2004). "Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in Pseudomonas aeruginosa involved in iron homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9792-9797.

Winter, W. E., *et al.* (2014). "The molecular biology of human iron metabolism." Lab Med **45**(2): 92-102.

Workentine, M. L., *et al.* (2008). "Pseudomonas fluorescens' view of the periodic table." Environ Microbiol **10**(1): 238-250.

Yang, L., *et al.* (2011). "Distinct roles of extracellular polymeric substances in Pseudomonas aeruginosa biofilm development." Environ Microbiol **13**(7): 1705-1717.

Yao, H., *et al.* (2011). "Two distinct ferritin-like molecules in Pseudomonas aeruginosa: the product of the bfrA gene is a bacterial ferritin (FtnA) and not a bacterioferritin (Bfr)." Biochemistry **50**(23): 5236-5248.

Yao, H., *et al.* (2012). "The structure of the BfrB-Bfd complex reveals protein-protein interactions enabling iron release from bacterioferritin." J Am Chem Soc **134**(32): 13470-13481.

Yeterian, E., *et al.* (2010). "Synthesis of the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa involves a periplasmic maturation." Amino Acids **38**(5): 1447-1459.

Yoneyama, H. and T. Nakae (1996). "Protein C (OprC) of the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa is a copper-regulated channel protein." Microbiology **142 (Pt 8)**: 2137-2144.

Youard, Z. A., *et al.* (2011). "Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in Pseudomonas species." Biometals **24**(3): 513-522.

Zannoni, D., *et al.* (2008). "The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te." Adv Microb Physiol **53**: 1-72.

Zhao, K., *et al.* (2013). "Psl trails guide exploration and microcolony formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms." Nature **497**(7449): 388-391.

Zhao, Q. and K. Poole (2002). "Differential effects of mutations in tonB1 on intrinsic multidrug resistance and iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **184**(7): 2045-2049.

Zhu, M., *et al.* (2005). "Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization." Microbiology **151**(Pt 7): 2363-2372.

Zumft, W. G. (1997). "Cell biology and molecular basis of denitrification." Microbiol Mol Biol Rev **61**(4): 533-616.

Olivier CUNRATH

METALLOME ET HOMEOSTASIE DU FER CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram-négatif, pathogène et opportuniste, responsable de nombreuses et sévères infections chez l'homme. Ce microorganisme comme la plupart des organismes vivants a besoin de fer pour sa croissance ainsi que d'autres métaux biologiques comme le zinc, le cuivre, le nickel, le manganèse, le cobalt, le molybdène, le vanadium et d'autres. Afin d'aquérir le fer *P. aeruginosa* produit deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (PVD), souvent considérée comme sidérophore principal, et la pyochéline (PCH).

Lors de cette thèse nous avons pu démontrer les enzymes de biosynthèse de ces sidérophores adoptent une organisation spécifique aux pôles des bactéries. De plus, l'étude de la composition en métaux de *P. aeruginosa* dans différentes conditions de cultures a pu démontrer que la bactérie adapte sa concentration intracellulaire en métaux selon la composition du milieu extracellulaire.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Fer, Métaux chez les bactéries, Sidérophores, Pyochéline, Pyoverdine

Résumé en anglais

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen. It is responsible for a wide range of human diseases. Iron is an essential element for this organism, like for nearly all other organisms. To a lower extent this organisms needs other metals such as zinc, copper, nickel, manganese and other for its survival. To acquire iron, *P. aeruginosa* secrets two major siderophores, pyoverdine (PVD) and pyochelin (PCH).

During the thesis we have shown that the enzymes involved in the biosynthesis of theses siderophores adopt a specific localization at the bacterial cell poles. Furthermore, the study of the metal composition of *P. aeruginosa* in different growth conditions has shown that this bacterium is able to adapt its internal metal concentration to the extracellular metal availability.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Iron, Metals in bacteria, Siderophores, Pyochelin, Pyoverdine