



HAL
open science

Effet de la limitation en fer selon le mode de vie et étude des mécanismes moléculaires de l'acquisition du fer chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Kilian Ducos

► **To cite this version:**

Kilian Ducos. Effet de la limitation en fer selon le mode de vie et étude des mécanismes moléculaires de l'acquisition du fer chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Biodiversité et Ecologie. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2022. Français. NNT : 2022PAUU3069 . tel-04595262

HAL Id: tel-04595262

<https://theses.hal.science/tel-04595262v1>

Submitted on 31 May 2024

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.

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications

(ED 211 SEA)

Présentée et soutenue le 09 décembre 2022

par **Kilian DUCOS**

pour obtenir le grade de docteur

de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Effet de la limitation en fer selon le mode de vie et
étude des mécanismes moléculaires de l'acquisition de
ce métal chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Isabelle SCHALK
- Virginie CHAPON

Directrice de recherche / Université de Strasbourg
Chercheur / CEA Cadarache

EXAMINATEURS

- Ryszard LOBINSKI
- Johann FAR
- Laurent OUERDANE

Directeur de recherche / IPREM, Université de Pau
Assistant professor / Université de Liège (Belgique)
Maître de conférences / IPREM, Université de Pau

DIRECTEURS

- Régis GRIMAUD
- Sophie NOLIVOS

Professeur / IPREM, Université de Pau
Maître de conférences / IPREM, Université de Pau



EFFET DE LA LIMITATION EN FER SELON LE MODE DE VIE ET ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES
D'ACQUISITION DE CE METAL CHEZ *MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS*

EFFET DE LA LIMITATION EN FER SELON LE MODE DE VIE ET ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES
D'ACQUISITION DE CE METAL CHEZ *MARINOBACTER HYDROCARBONOCLASTICUS*

Remerciements

A la fin de ces trois années de thèse, il est temps pour moi de clôturer ce chapitre de ma vie et de remercier toutes les personnes grâce à qui ce projet a pu aller jusqu'au bout. C'est non sans émotion que je rédige ces lignes.

En tout premier lieu je souhaite remercier mes rapporteurs de thèse, Isabelle Schalk et Virginie Chapon, ainsi que mes examinateurs, Ryszard Lobinski, Johann Far et Laurent Ouerdane d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie encore une fois Ryszard Lobinski de m'avoir accueilli au sein du laboratoire ainsi que E2S/UPPA d'avoir financé cette thèse et ma bourse de mobilité m'ayant offert l'opportunité d'aller au laboratoire de chimie analytique de Liège.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèse, Régis Grimaud et Sophie Nolivos. Merci pour votre confiance, votre aide et vos conseils précieux, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à mener ce projet jusqu'à son terme. J'aurais connu beaucoup de galères avec ces mutants récalcitrants, ces résultats qui n'ont presque jamais été ceux que l'on attendait et ces données qui m'ont parfois désespéré. Merci de votre patience, de votre disponibilité et d'avoir su m'encadrer de façon à ce que ne me sente jamais abandonné, en étant bien guidé tout en étant libre d'essayer toutes les manip que je souhaitais entreprendre. Merci Sophie de m'avoir pris en tant que stagiaire M2 et d'avoir bien voulu continuer avec moi durant la thèse. Cette expérience m'a beaucoup appris, je ne suis plus le même que celui qui a commencé son stage au laboratoire, toi et Régis y êtes pour beaucoup.

Je remercie également toutes les personnes qui sont impliquées dans mon projet et qui m'ont aidé à avancer : Francisco Calderon, Nang Htay Yin, Katarzyna Kinska, Laurent Ouerdane, Christophe Pecheyran, Fannie Claverie. Une pensée tout particulière à Nang avec qui nous avons réalisé des dosages de fer dans de très très très nombreux échantillons. Merci d'avoir toujours su te rendre disponible pour que l'on puisse y arriver ! Je n'oublie bien évidemment pas Florence Hakil, tu m'as apporté une aide infiniment précieuse avec la création des mutants. Merci également pour tous tes conseils sur les manip et tout le reste ! Merci aussi à Guillaume, stagiaire de L2, pour les quelques manip où tu m'auras donné un coup de main. Tu es malheureusement arrivé à la mauvaise époque, ton stage aura été très fortement raccourci à cause du Covid et du confinement. Un autre remerciement envers Oscar, stagiaire de M2, avec qui nous avons décoloré bon nombre de plaques ! J'espère que cela ne t'a pas laissé trop de mauvais souvenirs. Bien entendu, j'adresse des remerciements tout particuliers à Marine et Isaura. Marine, toi qui es toujours volontaire, de bonne humeur, appliquée et tellement efficace ! C'est un plaisir de travailler avec toi, même si cela aura été de (trop) courte durée, dommage que tu n'aies pas été là depuis le début. Et Isaura, le travail au labo aura été bien différent depuis ton arrivée. Certes c'était bien plus calme avant, mais quel plaisir d'aller travailler chaque jour quand je savais que tu étais là. Tu apportais de la gaieté même quand le moral était au plus bas ! Merci pour tout ça. Sache que j'ai eu du mal à me faire à ton départ vers de nouvelles aventures à Bordeaux.

Un grand merci également aux membres du laboratoire de Liège de m'avoir accueilli, Gauthier Eppe, Cédric Malherbe et Johann Far. Merci du temps que vous m'avez accordé pour d'abord m'expliquer les bases en Raman, Maldi et Saldi notamment, puis pour les nombreuses manip réalisées ensemble. J'ai appris plein de choses avec vous ! J'ai également découvert d'autres personnes super là-bas, Wendy, Stéphane, Lucas, Alex et Hugo. J'ai vraiment passé de bons moments durant ce séjour. C'était une expérience incroyable et c'est grâce à vous.

Je remercie également celles qui font tourner le labo, nous serions tous perdus sans vous ! Je pense à Claire, Alice, Marion et Flo (encore). Merci de ce que vous faites, de votre aide, et de votre disponibilité sans trop râler (Alice je pense surtout à toi -je suis obligé, tu me répètes sans cesse que je ne fais que râler, toi beaucoup moins c'est certain, sauf que moi je peux le transposer par écrit ;-). Alice et Marion, je vous remercie aussi pour m'accepter parfois le midi et de me remonter le moral dans les périodes difficiles ! Et également de m'avoir supporté, même si je n'y crois pas, il paraîtrait que je puisse être un peu lourd parfois.

Merci à François pour les réponses à mes questions sur les statistiques, Pierre et Jérôme pour les échanges lors des group meetings. Merci à Laurent de m'avoir accepté dans le bureau.

Ces remerciements vont envers tous ceux de l'Ibeas que j'ai côtoyé ou que côtoie chaque jour et dont certains sont désormais bien plus que des collègues. Désolé par avance si j'en oublie certains, Jo et Kévin, partenaires de la S26, Diva, Sophie, Etienne, Elise (je te le répète, oui je mange), Joyce, Manu, Sandrine, Robin, Eva, Clélia, Mégane, Lorena, Sergio, Camille, Isma, Jyotsna, Baptiste, David, Lou, Stéphanie, Magalie. Et bien sûr, une mention particulière à Guillaume et Ivan, merci d'être ce que vous êtes les gars, c'est aussi grâce à vous que j'ai tant aimé travailler ici.

Ces derniers remerciements sont désormais plus personnels et sont adressés à mes proches. A mes amis, Yohan, Pierre, Thomas, Chris, Kéké, Gaëtan, etc. qui m'ont aidé à penser à autre chose durant ces trois années.

A ma famille, d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu, et encouragé. Un merci tout particulier à ma grand-mère ainsi qu'à mes parents et ma sœur, qui m'ont suivi dans toutes mes décisions, épaulé lorsque c'était difficile et qui depuis que je suis tout petit ont toujours su au fond d'eux que j'allais y arriver, même si de mon côté c'était moins une évidence. Merci pour tout, je n'aurais pu rêver mieux comme famille.

Enfin ces derniers mots sont adressés à celle qui partage ma vie depuis quelques années déjà, Laurine. Merci de m'avoir supporté durant ces trois années de thèse où le moral n'a pas toujours été là. Tu auras su être patiente, attentionnée, et toujours là dans les moments difficiles. Je ne sais pas si j'aurais réussi sans toi. Merci pour tout. Et non ne t'inquiète pas, je n'oublie pas Palpale, merci à elle aussi ;).

Sommaire

Remerciements.....	I
Sommaire.....	III
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux.....	XIII
Liste des abréviations.....	XV
Chapitre I Etude bibliographique.....	2
1. Importance du fer et son impact dans les environnements marins.....	4
1.1. Rôle du fer chez les microorganismes.....	4
1.2. Rôle du fer dans les cycles des éléments majeurs au sein des environnements marins.....	5
1.2.1. Cycle du fer.....	5
1.2.2. Les regions HNLC (<i>High Nutrient Low Chlorophyll</i>).....	5
1.2.3. La pompe biologique ou cycle du carbone marin.....	8
1.2.4. Cycle de l'azote.....	9
1.3. Spéciation du fer dans l'environnement marin.....	11
1.3.1. Le fer est complexé à des ligands organiques.....	12
1.3.2. Origine des ligands organiques.....	15
1.3.3. Devenir du fer dans les océans et réactivité des ligands.....	17
1.3.4. Le fer inorganique.....	20
2. Les systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries.....	21
2.1. Voie dépendante de la production de sidérophores.....	24
2.1.1. Structure et fonctions des sidérophores.....	24
2.1.2. Voies de synthèse des sidérophores.....	27
2.1.3. L'export des sidérophores.....	30
2.1.4. L'import du sidérophore.....	32
2.1.5. Dissociation du complexe fer-sidérophore.....	33
a. Mécanismes généraux.....	34
b. Facteurs favorisant la dissociation.....	34
2.1.6. Utilisation de sidérophores exogènes.....	35
2.1.7. Systèmes de régulation de la production de sidérophores et risques liés à une trop forte concentration en fer.....	36
a. Les risques d'une accumulation de fer dans la cellule.....	36
b. Régulation à l'échelle de la cellule.....	36

c.	Régulation à l'échelle de la population.....	37
2.2.	Voies d'acquisition du fer indépendantes des sidérophores.....	38
2.2.1.	Hème, transferrine, lactoferrine et <i>ferric binding protein</i>	38
2.2.2.	Réduction du fer ferrique Fe ³⁺	39
2.2.3.	L'acquisition du fer ferreux	40
2.3.	Stratégies d'acquisition du fer	41
2.3.1.	Contact direct entre la cellule et la source de fer	41
2.3.2.	Sécrétion de sidérophores	44
2.3.3.	Les sidérophores doivent être sécrétés en très grande quantité pour être efficaces	44
3.	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	45
3.1.	Le genre <i>Marinobacter</i>	46
3.2.	Les caractéristiques de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	46
3.2.1.	Description de l'espèce.....	46
a.	Mécanismes de formation des biofilms	47
b.	La formation de biofilm est une stratégie efficace pour l'assimilation de composés organiques hydrophobes (HOC)	48
3.2.2.	Les biofilms de <i>Mh</i> SP17.....	50
3.3.	L'acquisition du fer dans le genre <i>Marinobacter</i>	53
4.	La pétrobactine	56
4.1.	Généralités.....	56
4.2.	La biosynthèse de la pétrobactine.....	58
4.3.	L'export de la pétrobactine	59
4.4.	Import de la pétrobactine	60
4.5.	Dissociation du complexe pétrobactine-fer.....	60
4.6.	Transport supposé de la pétrobactine chez <i>Mh</i> et gènes potentiels	62
5.	Objectifs	63
Chapitre II	Matériel & méthodes	64
1.	Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture	66
1.1.	Souches et plasmides.....	66
1.2.	Milieux de cultures et conditions de croissance	70
1.3.	Matériel et milieu de culture pour croissance contrôlée en fer.....	71
2.	Croissance en condition contrôlée en fer	72
2.1.	Préparation des précultures.....	72
2.2.	Suivi de la croissance planctonique en tubes en verre	72
2.3.	Quantification de la croissance en plaques 24 puits.....	73
3.	Dosage du fer dans le milieu de culture, intracellulaire et dans les substrats de biofilms	75
3.1.	Dosage des métaux dans les milieux de culture.....	75
3.2.	Dosage du fer intracellulaire	75

3.3	Dosage du fer dans les différents substrats	78
4.	Détection et quantification de la pétrobactine	79
4.1.	Test CAS liquide	79
4.2	Purification et quantification de la pétrobactine	80
4.3	Quantification de la pétrobactine par LC-ESI-MS dans le milieu de culture	81
4.4	Détection de la pétrobactine intracellulaire	82
5.	Construction des plasmides et des souches	82
5.1.	Extraction et purifications d'ADN	82
5.2.	PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	82
5.3	Construction plasmidique pour la délétion d'un gène cible	83
5.4.	Transformation <i>E. coli</i> DH5- α λ pir et sélection des plasmides recombinants	86
5.5.	Transformation <i>E. coli</i> S17-1 λ pir et conjugaison	86
5.6.	Conjugaison entre <i>E.</i> et <i>Mh</i> et obtention des mutants par recombinaisons homologues ..	88
6.	Imagerie moléculaire de la pétrobactine dans un biofilm de <i>Mh</i> JM1	90
7.	Analyses statistiques	91
Chapitre III Constitution d'un milieu de culture pour l'étude de l'assimilation du fer chez <i>Mh</i> JM1		92
1.	Contexte	94
2.	Suppression du tampon	95
3.	Modification de la composition ionique du milieu de culture	96
4.	Mise au point des conditions de carence en fer	100
4.1.	Étude de la déplétion en oligo-éléments par la résine Chelex-100	100
4.2.	Préparation de l' <i>inoculum</i> pour éviter le stockage du fer par <i>Mh</i> JM1	104
Chapitre IV Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes d'acquisition de ce métal selon le substrat chez <i>Mh</i> JM1		106
Préambule		108
Article : The nature of the carbon source modulates the iron requirement and the acquisition systems of <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>		110
1.	Introduction	111
2.	Materials and Methods	113
2.1.	Strains and culture conditions	113
2.2.	Biofilm assays	114
2.3.	Construction of mutants	114
2.4.	Petrobactin detection and quantification by LC-ESI-MS	114
2.5.	Statistical analysis	115
3.	Results	116
3.1.	Carbon source and lifestyle modulate the expression of genes encoding iron-containing proteins	116

3.2. Biofilm on paraffin or tristearin can grow at lower iron concentration than planktonic cells growing on acetate.	119
.....	119
3.3. Petrobactin is produced at low iron concentration and the proportion of the sulfonated form is lower in biofilms on paraffin and tristearin.	121
3.4. At low iron concentration, petrobactin is involved but not essential in iron acquisition in biofilms on paraffin or tristearin.....	124
3.5. The ferric ion binding protein, FbpA is involved in iron acquisition in biofilms on paraffin and tristearin conditions	124
4. Discussion	125
4.1. Iron requirement is modulated by the nature of growth substrate	125
4.2. Petrobactin is involved in growth in iron deplete condition	126
4.3. FbpA is involved in iron replete and deplete conditions	128
5. References	129
6. Supplementary Materials and Methods.....	133
6.1. Correlation between OD _{600nm} for planktonic biomass quantification and OD _{595nm} for biofilm biomass quantification	133
6.2. Procedure for mutant obtention	133
7. Supplementary tables	134
8. Supplementary figures	142
9. Supplementary references	149
Résultats complémentaires	150
1. La pétrobactine est également produite après 24h de croissance	151
2. $\Delta asbABF$ ne se détache pas du biofilm lors d'une croissance sur tristéarine	156
3. Utilisation d'un promoteur inductible à l'arabinose chez <i>Mh</i> JM1	157
4. Phénotype du double mutant conditionnel $\Delta asbABF \Delta fbpA$	159
5. Conclusion.....	164
Chapitre V Influence de la nature du substrat sur les besoins en fer et systèmes de transport de ce métal chez <i>Mh</i> JM1	166
Préambule.....	168
1. Croissance de <i>Mh</i> JM1 sur les différents intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes	172
2. Quantification du fer piégé et contenu dans les différents substrats	177
3. Lavage des culots pour retirer le fer intracellulaire	179
4. Quantification de la pétrobactine intracellulaire et du complexe pétrobactine-fer	183
5. Essais d'imagerie moléculaire pour détecter la pétrobactine à l'intérieur du biofilm de <i>Mh</i> JM1	186
6. Étude de mutants potentiellement impliqués dans les mécanismes d'acquisition du fer chez <i>Mh</i> JM1	189

.....	189
Résultats et discussion	197
Conclusion.....	199
Discussion générale et perspectives.....	200
1. Importance du fer.....	202
1.1. Les besoins en fer sont dépendants de la source de carbone.....	202
1.2. Dosage du fer dans les substrats carbonés paraffine et tristéarine	203
1.3. Lavage des cellules pour réaliser un dosage du fer intracellulaire	204
2. Outils génétiques développés chez <i>Mh</i> JM1	204
3. Mécanismes d'acquisition du fer chez <i>Mh</i> JM1	205
3.1. Importance de la pétrobactine	205
3.2. Détails de la production de pétrobactine chez <i>Mh</i> JM1 et comparaison avec <i>B. anthracis</i>	206
3.3. Importance de la pétrobactine en fonction de la source de carbone	207
3.4. Un mécanisme d'acquisition du fer indépendant de l'utilisation de sidérophore	208
3.5. La pétrobactine et FbpA semblent être les deux seuls mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer	209
3.6. Systèmes de transport de la pétrobactine	210
3.7. Hypothèses sur le rôle de la pétrobactine sulfonatée	210
3.8. Le rôle de la pétrobactine se limite-t-il à l'acquisition du fer ?.....	211
4. Conclusions	212
Références bibliographiques	214
Annexes	237
Supplément de Matériel & méthodes.....	238
1.1 Préparation de cellules d' <i>E. coli</i> DH5- α λ pir électro-compétentes	238
1.2 Préparation de cellules d' <i>E. coli</i> S17-1 λ pir chimio-compétentes.....	238
Figures supplémentaires.....	239
Résumé.....	246
Abstract	247

Liste des figures

Figure I.1. Cycle du carbone marin ou pompe biologique du carbone.	7
Figure I.2. Réactions simplifiées de la fixation d'azote, de la réduction de nitrates et de nitrites, et enzymes impliquées.....	9
Figure I.3. Réactions d'hydrolyse du fer et formation d'hydroxydes.	11
Figure I.4. Distribution physique du fer dans l'eau de mer.	12
Figure I.5. Structures théoriques de composés humiques.....	15
Figure I.6. Exemples de sidérophores marins et leurs photoproduits.	17
Figure I.7. Devenir du fer dans les océans et réactivité des ligands.....	19
Figure I.8. Liaison entre le fer et la pétrobactine.	23
Figure I.9. Différentes structures de sidérophores.	25
Figure I.10. Implication des enzymes NIS dans la voie de biosynthèse de l'achromobactine.	27
Figure I.11. Exemple d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries didermes.	29
Figure I.12. Représentation schématique des systèmes d'efflux impliqués dans l'export de sidérophores chez les bactéries didermes.	31
Figure I.13. Stratégies d'acquisition du fer par production de sidérophore ou contact direct.	43
Figure I.14. Image de microscopie électronique de <i>Mh</i> SP17 lors d'une croissance sur acétate. ..	45
Figure I.15. Le développement en 5 étapes d'un biofilm.	47
Figure I.16. Images de biofilms matures de <i>Mh</i> SP17.....	49
Figure I.17. Modèle de la formation de biofilm de <i>Mh</i> SP17 sur composé organique hydrophobe.	51
Figure I.18. Structures des différentes formes de la pétrobactine.	55
Figure I.19. Schéma de la biosynthèse de la pétrobactine et opéron de biosynthèse de la pétrobactine chez <i>Mh</i>	57
Figure I.20. Schéma hypothétique du transport du fer à travers les deux membranes de <i>Mh</i> JM1. 61	
Figure II.1. Protocole de la coloration des biofilms au cristal violet en plaque 24 puits.	73
Figure II.2. Construction pour le dosage du fer dans les substrats par ablation laser.	77
Figure II.3. Protocole du test CAS liquide.....	79
Figure II.4. Schéma de clonage par Gibson Assembly.....	83
Figure II.5. Schéma de clonage par POE-PCR.	85
Figure II.6. Schéma de construction du mutant délété du gène <i>MARHY3427 (asbF)</i>	87
Figure III.1. Courbe de corrélation entre la DO _{600nm} des cellules planctoniques et la DO _{595nm} des cellules en biofilm.	94
Figure III.2. Comparaison de la croissance de <i>Mh</i> JM1 en EMS et MEM.....	97
Figure III.3. Croissances de <i>Mh</i> JM1 avec ajout ou non de solution SL12 après élimination des résidus de fer dans le milieu de culture par la résine Chelex-100.....	99
Figure III.4. Croissance de <i>Mh</i> JM1 avec et sans ajout de fer.	101

Figure III.5. Croissance de <i>Mh</i> JM1 avec et sans ajout de fer après avoir réduit la concentration en fer dans la préculture.	103
Figure 1. Relative expression of genes encoding iron-containing protein in acetate, n-hexadecane and triolein conditions.	117
Figure 2. <i>Mh</i> JM1 growth yield depending on the iron concentration and the carbon sources.	119
Figure 3. Quantification of petrobactin and petrobactin sulfonate in culture supernatants.	122
Figure 4. Growth yield of iron acquisition defectives mutants.	123
Figure S1. The petrobactin structure and the biosynthetic operon of petrobactin producer <i>Mh</i> ATCC 49840 below.	142
Figure S2. Correlation between OD _{600nm} and OD _{595nm} for direct biofilm and planktonic growth comparison.	143
Figure S3. Growth comparison in EMS and MEM medium.	144
Figure S4. Putatives secondary metabolites in <i>Mh</i> using AntiSmash.	145
Figure S5. Total ion chromatogram of the supernatant extracts from <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 WT and petrobactin nonproducer mutant, Δ <i>asbABF</i> grown in iron limited medium.	146
Figure S6. Detailed fractions (planktonic and biofilm) of all strain growths at high iron concentration.	147
Figure S7. Putative siderophore TBDT in <i>Mh</i> JM1 genome.	148
Figure IV.1. Quantification de la pétrobactine et de ses dérivés dans des surnageants de culture à 24h.	151
Figure IV.2. Détail des fractions (planctonique et biofilm) des souches <i>Mh</i> JM1, Δ <i>asbABF</i> et Δ <i>fbpA</i>	155
Figure IV.3. Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules portant le plasmide pSN75 avant et après induction par l'arabinose.	158
Figure IV.4: Etude du phénotype du mutant conditionnel Δ <i>asbABF</i> Δ <i>fbpA</i> sur MEM solide et liquide.	162
Figure V.2. Comparaison de la croissance de <i>Mh</i> JM1 sur paraffine, tristéarine et acétate à différentes concentrations en fer.	171
Figure V.3. Comparaison de la croissance de <i>Mh</i> JM1 sur des intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes à différentes concentrations en fer.	173
Figure V.4. Quantité de fer présent dans la paraffine et la tristéarine avant et après incubation dans un milieu riche en fer.	177
Figure V.5. Quantité de fer détecté dans les surnageants après lavage à l'eau et à l'EDTA.	179
Figure V.6. Diagramme de Pourbaix indiquant la forme du fer en fonction du pH et du potentiel redox.	181
Figure V.7. Observation de l'intégrité des cellules par marquage avec les fluorophores SYTO-9 et iodure de propidium après un lavage dans du MEM acidifié à pH 5 en microscopie à fluorescence.	182

Figure V.8. Proportions des différentes formes de la pétrobactine et du complexe pétrobactine-fer retrouvées dans les surnageants de culture et le biofilm de <i>Mh</i> JM1.	183
Figure V.9. Détection des différentes formes de la pétrobactine et du complexe pétrobactine-fer dans les milieux intra et extracellulaires.	185
Figure V.10. Comparaison de la croissance de <i>Mh</i> JM1 et du mutant $\Delta asbF$	189
Figure V.11. Transporteurs TonB-dépendant et gènes adjacents retrouvés sur le génome de <i>Mh</i> JM1 et homologies des récepteurs TonB-dépendants de <i>Mh</i> JM1.	192
Figure V.12. Comparaison de la croissance entre <i>Mh</i> JM1 et les mutants $\Delta 3432$, $\Delta fhuE$ et $\Delta cirA$	194
Annexe 1. Suivi de croissance planctonique sur acétate durant 25h de <i>Mh</i> JM1 dans du milieu EMS avec différents tampons.	239
Annexe 2. Quantification du biofilm de <i>Mh</i> JM1 à 24h sur paraffine dans du milieu EMS avec différents tampons.	239
Annexe 3. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur paraffine.	240
Annexe 4. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur tristéarine.	241
Annexe 5. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur acétate.	242
Annexe 6. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ sur paraffine.	243
Annexe 7. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ sur tristéarine.	244
Annexe 8. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ sur acétate.	245

Liste des tableaux

Tableau I.1. Correspondance des protéines impliquées dans la biosynthèse de la pétrobactine chez <i>B. anthracis</i> AMES et <i>Mh</i> SP17.....	59
Tableau II.1. Liste des souches utilisées au cours de cette étude.....	66
Tableau II.2. Liste des plasmides utilisés au cours de cette étude.	69
Tableau II.3. Liste des amorces utilisées au cours de cette étude.	89
Tableau III.1. Concentration des principaux ions dans l'eau de mer, l'EMS et le MEM.	96
Table S1. List of bacterial strains used during this study.	134
Table S2. List of plasmids used during this study.....	135
Table S3. List of primers used during this study.....	136
Table S4. Iron-containing proteins selected for expression analysis.	137
Table S5. Comparison of MEM medium and sea water composition.....	141
Table S6. Particulate fraction of iron in MEM medium.....	141

Liste des abréviations

ABC : *ATP binding cassette*

Ac : acetate

ADN : acide désoxyribonucléique

AI : auto inducteur

ARN : acide ribonucléique

ATP : adenosine-5'-triphosphate

BET : bromidure d'éthidium

CAS : *chrome azurol S*

CDS : *coding sequence*

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétracétique

EMS : eau de mer synthétique

ESI-MS : *electrospray ionization-mass spectrometry*

Fbp : *ferric binding protein*

FT-ICR MS : *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

Gm^R/Gm^S : résistant à la gentamicine/sensible à la gentamicine

h : heure

HDTMA : bromure de cétyltriméthylammonium

HEX : n-hexadécane

HNLC : *high nutrient low chlorophyll*

HOC : *hydrophobic organic compound*

HPLC : *high pressure liquid chromatography*

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

ICP-OES : *Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*

Kn^R/Kn^S : résistant à la kanamycine/sensible à la kanamycine

LC-ESI-MS : *liquid-chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*

m/v : masse/volume

MALDI : *matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

MATE : *multidrug and toxic compound extrusion*

MEM : milieu eau de mer

MFS : *major facilitator superfamily*

Mh : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Min : minute

mol : mole

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

NBD : *nucleotide binding domain*

NIS : *NRPS independant siderophore*

NRPS : *non-ribosomal peptide synthetase*

PACE : *proteobacterial antimicrobial compound efflux*

PBP : *periplasmic binding protein*

PCR : *polymerase chain reaction*

POE-PCR : *prolonged overlap extension PCR*

PSI BLAST : *position-specific iterative basic local alignment search tool*

RND : *resistance-nodulation-division*

s : seconde

SALDI : *surface-assisted laser desorption/ionisation*

SMR : *small multidrug resistance*

Sm^R/Sm^S : résistant à la streptomycine/sensible à la streptomycine

SPE : *solid phase extraction*

SSW : *synthetic sea water*

TBDT : TonB-dependant transporters

Tp^R/Tp^S : résistant au triméthoprimine/sensible au triméthoprimine

TRI : trioléine

TSS : *transformation and storage solution*

v/v : volume/volume



Chapitre I

Etude bibliographique



1. Importance du fer et son impact dans les environnements marins

1.1. Rôle du fer chez les microorganismes

Dans la nature le fer est un métal omniprésent, il est indispensable à tout organisme vivant, avec néanmoins quelques rares exceptions, comme par exemple des espèces du genre *Lactobacillus* (Weinberg, 1997). Ce métal est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, tels que la respiration, la photosynthèse, la fixation de l'azote ou encore la synthèse d'ADN. Le fer est un excellent transporteur d'électron, de par sa faculté à en acquérir et à en perdre aisément. Ainsi, sous forme ferreux, Fe^{2+} , il est une source d'électron pour les bactéries ferro-oxydantes qui sont capables d'oxyder le fer pour produire de l'énergie. Réciproquement, la forme ferrique, Fe^{3+} , peut jouer le rôle d'accepteur final d'électron lors de la respiration anaérobie réalisée par les bactéries ferriréductrices (Weber *et al.*, 2006). Le fer est aussi assimilé par les organismes vivants, il est avec le magnésium et le zinc un des métaux les plus courants dans les systèmes biologiques, et le majoritaire retrouvé dans les centres redox des enzymes (d'après la base de données Metal-MACiE) (Andreini *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2018). Il est principalement présent dans des groupements prosthétiques tels que l'hème ou les centres fer-soufre (Beinert *et al.*, 1997; Frawley and Fang, 2014). Certains processus sont extrêmement coûteux en fer. Par exemple, pour les organismes pratiquant la respiration, environ 94 % du fer cellulaire est retrouvé dans la chaîne respiratoire, en étant associé à des enzymes telles que la NADH-Q réductase, la succinate-Q réductase, le cytochrome b_1 et des complexes cytochrome oxydase (Tortell *et al.*, 1999). Ce métal est également indispensable pour la photosynthèse. En effet, entre 36 et 47 atomes de fer sont nécessaires à la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. Le métal se retrouve par exemple dans le centre réactionnel des photosystèmes avec 12 atomes de fer pour le photosystème I et 2-3 atomes pour le photosystème II (Raven *et al.*, 1999).

Bien qu'il soit abondant sur Terre, le fer n'est que très peu retrouvé dans sa forme libre, notamment dans des environnements oxygéniques, le rendant ainsi peu biodisponible pour les organismes (Konhauser *et al.*, 2011). Pour toutes ces raisons, le fer est généralement l'élément limitant pour la croissance des microorganismes, et joue ainsi un rôle essentiel dans des cycles majeurs tels que celui du carbone ou encore de l'azote, car il est indispensable pour que les organismes puissent pratiquer la respiration, la photosynthèse ou la fixation de l'azote.

Ce travail se focalise tout particulièrement sur les environnements marins où la concentration en fer est très faible, généralement comprise entre 0,02 et 1 nmol.L⁻¹ (Vraspir and Butler, 2009), le métal étant souvent limitant pour la croissance des organismes.

1.2. Rôle du fer dans les cycles des éléments majeurs au sein des environnements marins

Les océans sont des acteurs majeurs du climat car ils sont responsables d'environ la moitié de la production primaire nette mondiale qui convertit le CO₂ en carbone organique (Field *et al.*, 1998). Ils absorbent également une quantité élevée des rejets de carbone liés à l'activité humaine. En effet, il est estimé qu'entre un quart et un tiers des émissions anthropiques de carbone issues de l'utilisation des énergies fossiles, de la déforestation ou encore de la production de ciment (qui génère à elle seule environ 7% des émissions mondiales de CO₂) sont séquestrées par les océans (Ali *et al.*, 2011; Gruber *et al.*, 2019; Passow and Carlson, 2012; Sabine *et al.*, 2004; Sabine and Tanhua, 2010).

1.2.1. Cycle du fer

Le fer présent dans les environnements marins provient majoritairement des particules déposées par les vents, de sources hydrothermales, de la fonte des glaces ou encore des activités humaines (Hutchins and Boyd, 2016). Le phénomène d'*upwelling* (remontée d'eau océanique provenant des profondeurs) permet également d'apporter du fer aux organismes en surface. Ces derniers vont rapidement en recycler la moitié en l'utilisant pour produire de la matière organique. L'autre partie est piégée dans des particules qui coulent vers les zones profondes de l'océan (Boyd and Ellwood, 2010; Tagliabue *et al.*, 2017). La présence de fer stimule l'activité de certains microorganismes qui produisent des ligands organiques afin d'acquérir le métal, augmentant ainsi sa disponibilité pour d'autres organismes. Le fer devenant accessible, la croissance est alors limitée par un manque d'autres nutriments (Lauderdale *et al.*, 2020). Néanmoins, une grande partie des environnements marins est très pauvre en fer.

1.2.2. Les regions HNLC (*High Nutrient Low Chlorophyll*)

Approximativement un tiers de la surface des océans est riche en nutriments mais présente une faible production primaire (Boyd *et al.*, 2007). Dans ces régions, appelées HNLC pour *High Nutrient Low Chlorophyll*, une concentration élevée de nutriments azotés et phosphatés est retrouvée, alors que la concentration en chlorophylle est basse en raison d'une faible biomasse

phytoplanctonique. Il y a plusieurs décennies, John Martin a proposé l'hypothèse du fer (*The Iron Hypothesis*) qui stipule que la limitation de la croissance du phytoplancton serait causée par une carence en fer (Martin and Fitzwater, 1988). Des études mettant en jeu des fertilisations artificielles ou naturelles de fer ont confirmé que le fer était l'élément limitant dans les régions HNLC (Coale *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1994; Blain *et al.*, 2007). Ces résultats ont été remis en question quelques années plus tard, en démontrant notamment que la quantité de carbone organique particulaire n'augmente pas significativement dans le flux d'eau vertical malgré l'ajout de fer (Quéguiner, 2013). En effet, d'autres facteurs en plus de la concentration en fer limitent la croissance, comme par exemple le manque de lumière ou une concentration en silicate trop faible (Aumont and Bopp, 2006). Bien que le manque de fer puisse effectivement limiter la production primaire dans certaines zones des environnements marins, ce n'est pas forcément le facteur limitant dans tous les océans. Même si elle n'est pas limitante, la concentration en fer est un paramètre important pour la croissance de microorganismes marins qui sont fortement impliqués dans les cycles biogéochimiques, notamment ceux du carbone et de l'azote.

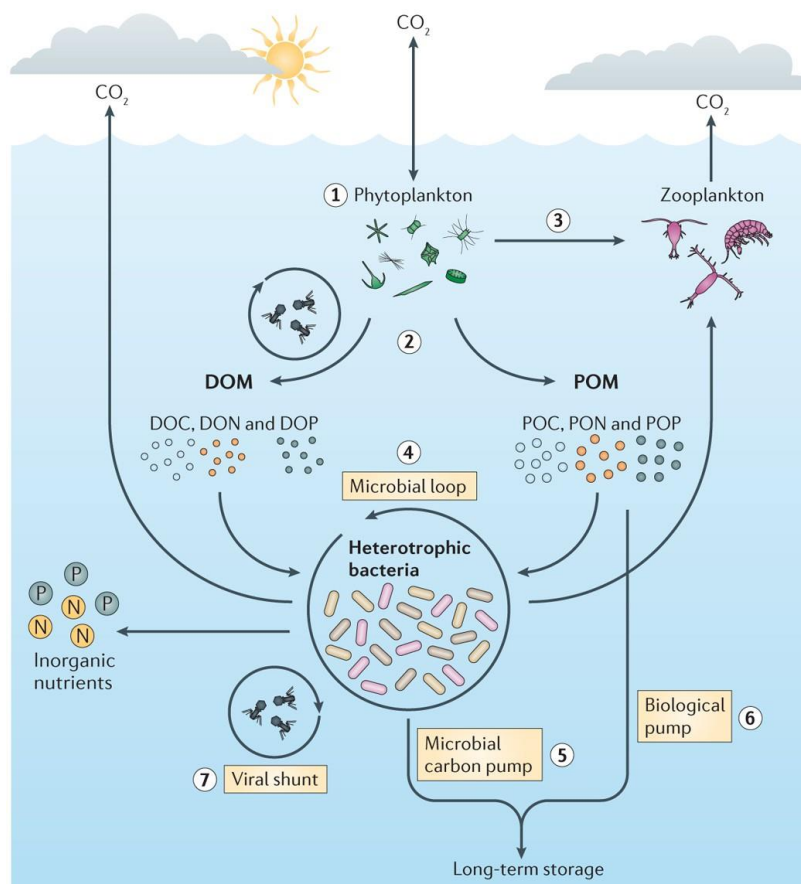


Figure I.1. Cycle du carbone marin ou pompe biologique du carbone.

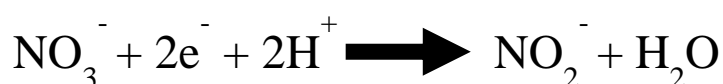
Le carbone inorganique (CO_2) est utilisé par le phytoplancton pour produire du carbone organique par la photosynthèse (étape 1). Lors de sa mort (par lyse virale ou par senescence par exemple), le phytoplancton libère de la matière organique (contenant du C, N et P) dissoute et particulaire (étape 2). Le phytoplancton peut également être consommé par le zooplancton (étape 3). En respirant, le zooplancton va reminéraliser une partie du carbone organique en CO_2 et par excrétion ou lors de leur mort, le zooplancton libère également du carbone organique (particulaire et dissous) qui pourra être utilisé par les bactéries hétérotrophes. Ainsi les bactéries vont recycler le carbone organique provenant à la fois du phytoplancton et du zooplancton. En respirant elles vont reminéraliser ce carbone organique. Les bactéries peuvent également être consommées par le zooplancton. Tous ces phénomènes constituent la boucle bactérienne (étape 4). Les bactéries reminéralisent les nutriments (C, N et P) qui pourront de nouveau être utilisés par le phytoplancton. Une partie du carbone organique, qualifié de récalcitrant et résistant à la dégradation coule au fond de l'océan et y restera pendant des milliers d'années, processus de la pompe microbologique de carbone (étape 5). Une partie du carbone organique particulaire n'est pas dégradé par les organismes et va lui aussi se retrouver au fond des océans, il s'agit de la pompe biologique (étape 6). La dernière étape, le shunt viral, participe à la libération de carbone organique dissous et particulaire en lysant les cellules bactériennes et phytoplanctoniques. Adapté de (Buchan *et al.*, 2014).

1.2.3. La pompe biologique ou cycle du carbone marin

Dans le milieu marin, le cycle du carbone est en partie contrôlé par les organismes vivants. Les producteurs primaires autotrophes, majoritairement le phytoplancton, produisent de la matière organique à partir d'énergie lumineuse et de CO₂ par photosynthèse. Le phytoplancton est un terme employé pour désigner les organismes photosynthétiques et qui est composé à la fois d'organismes procaryotes, les cyanobactéries, et d'organismes eucaryotes tels que les diatomées ou encore les dinoflagellés. La pompe biologique de carbone (**Figure I.1**), ou cycle du carbone marin, repose sur des processus biologiques qui transforment et stockent le CO₂ atmosphérique. Le phytoplancton réalise la photosynthèse pour produire de la matière organique à partir des nutriments présents dans l'eau de mer ainsi que du carbone inorganique. Lorsque ces producteurs primaires sont consommés par le zooplancton ou qu'ils lysent, le carbone organique est recyclé (Bopp *et al.*, 2019). Le carbone organique libéré lors de la lyse peut être utilisé par des bactéries, et lors de la mort de ces dernières, la matière organique peut se retrouver de nouveau dans l'environnement sous forme de particules qui vont sédimenter au fond de l'océan. En résumé, le carbone organique dissous, comprenant les composants cellulaires tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides aminés se retrouvent dans la colonne d'eau par trois sources : lors de la mort des producteurs primaires (par sénescence, lyse virale ou fongique, ou encore manque de nutriments), par sécrétion de ces composés par les organismes phytoplanctoniques et enfin par excrétion ou mort des organismes hétérotrophes (Moran *et al.*, 2022). Cette matière organique est en grande partie recyclée par les organismes hétérotrophes, qui en respirant reminéralisent la matière organique en CO₂. Au sein de la colonne d'eau, la consommation du carbone organique est majoritairement réalisée par les bactéries hétérotrophes en raison de leur abondance et de leur diversité (Azam and Malfatti, 2007). Le cycle du carbone repose donc sur un équilibre entre les activités autotrophiques et hétérotrophiques, et est dépendant des phénomènes d'efflorescence phytoplanctonique. Ces efflorescences interviennent au printemps lorsque, notamment, la température de l'eau, l'ensoleillement et la quantité de nutriments augmentent (Buchan *et al.*, 2014). Ce recyclage de la matière organique est indissociable de processus tels que la respiration et la photosynthèse, nécessaire pour la production d'énergie. Comme mentionné précédemment, le fer est un cofacteur, entre autres, des cytochromes ou des photosystèmes impliqués dans la respiration et la photosynthèse. Il est donc indispensable pour la croissance des organismes, quel que soit leur rôle, démontrant l'implication de ce métal dans le cycle du carbone marin.

1.2.4. Cycle de l'azote

Nitrate réductase



Nitrite réductase



Nitrogénase



Figure I.2. Réactions simplifiées de la fixation d'azote, de la réduction de nitrates et de nitrites, et enzymes impliquées.

Le fer est également étroitement lié au cycle de l'azote. En effet, selon la forme de l'azote dans l'environnement (N_2 , NH_4^+ , NO_3^-), les cellules auront un besoin en fer variable (Schoffman *et al.*, 2016). Cela s'explique par le fait que l'ammonium (NH_4^+) peut être directement utilisé par les organismes pour l'incorporer aux acides aminés, alors qu'à l'inverse, le diazote (N_2) et les nitrates (NO_3^-) doivent être tout d'abord convertis en ammonium (ou ammoniacque NH_3 selon les conditions). Chez les organismes phytoplanctoniques tels que les algues ou les cyanobactéries (Moreno-Vivián and Flores, 2007), les enzymes nitrite et nitrate réductases, qui convertissent les nitrates en nitrites et les nitrites en ammonium (**Figure I.2**), utilisent toutes deux du fer comme cofacteur. Le fer est également nécessaire pour d'autres enzymes, comme par exemple la nitrate réductase périplasmique car cette protéine contient un cluster fer-soufre (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014).

Les microorganismes diazotrophes tels que les cyanobactéries dans les océans fixent l'azote atmosphérique (N_2) grâce à une enzyme, la nitrogénase, catalysant la réduction du N_2 en ion

ammonium NH_4^+ (**Figure I.2**). Cette enzyme requiert une quantité particulièrement élevée de fer pour pouvoir réaliser cette réaction de réduction. En effet, 26 atomes de fer sont nécessaires pour chaque complexe enzymatique actif, auxquels s'ajoutent d'autres atomes indispensables pour le transport d'électrons (Hutchins and Capone, 2022; Hutchins and Sañudo-Wilhelmy, 2022). Par conséquent, les organismes diazotrophes sont généralement limités par la teneur en fer de leur environnement.

Jusqu'à présent, il a été discuté du fait que le fer intervient dans plusieurs processus cellulaires (respiration, photosynthèse, fixation de l'azote) expliquant pourquoi il est nécessaire que les organismes en acquièrent en quantité suffisante. L'objet du prochain paragraphe est de comprendre pour quelle raison le fer est présent en concentration très faible dans les environnements marins.

1.3. Spéciation du fer dans l'environnement marin

Le fer impliqué dans les réactions biologiques présente essentiellement deux degrés d'oxydation : +II noté Fe(II) et +III noté Fe(III). Dans les composés ioniques, Fe(II) correspond à l'ion ferreux Fe^{2+} et Fe(III) à l'ion ferrique Fe^{3+} . En milieu aqueux oxygène, le fer ionique existe uniquement sous la forme oxydée Fe^{3+} . Les ions Fe^{3+} ne sont pas stables dans l'eau, surtout à pH alcalin, où ils subissent des réactions d'hydrolyse (**Figure I.3**) pour former des espèces d'hydroxide ferrique qui sont insolubles et précipitent (Libes, 2011; Liu and Millero, 2002). Dans l'eau de mer, une grande partie du fer est assimilée par les organismes vivants et se trouve liée à des ligands organiques qui sont libérés à la mort de ces organismes. De cette manière, le fer appartenant à la fraction dissoute dans l'eau de mer est dans sa quasi-totalité (>99%) complexé avec des ligands organiques et suit une spéciation complexe (Gledhill and Buck, 2012).

La discussion des paragraphes 1.3.1 et 1.3.2 se base principalement sur deux revues, Boyd and Ellwood (2010) et Gledhill and Buck (2012) qui traitent de la complexation entre le fer et les ligands organiques. Quelques précisions ont été apportées, avec des données plus récentes.

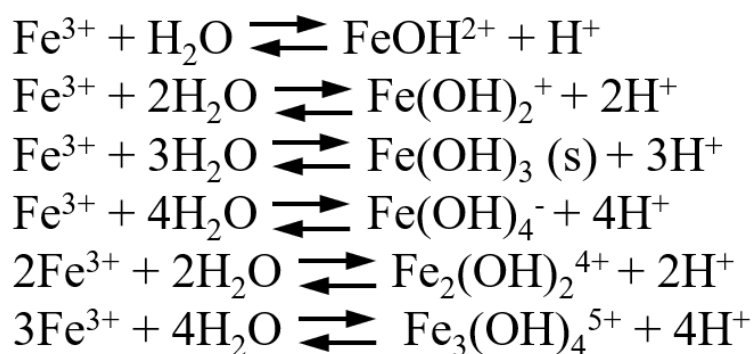


Figure I.3. Réactions d'hydrolyse du fer et formation d'hydroxydes.

Adapté de (Stefánsson, 2007).

1.3.1. Le fer est complexé à des ligands organiques

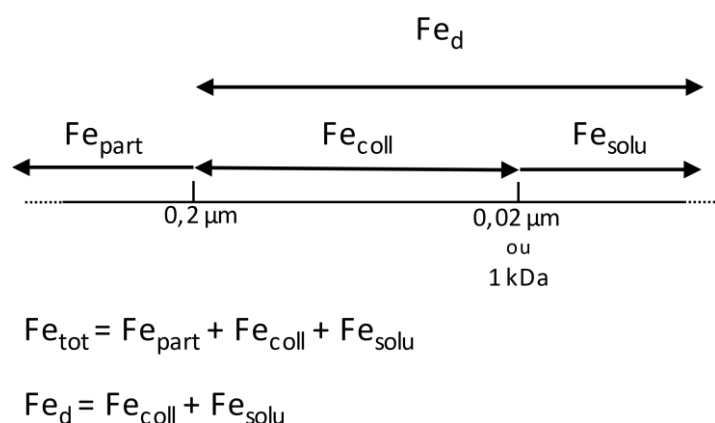


Figure I.4. Distribution physique du fer dans l'eau de mer.

Fe_{tot} fer total ; Fe_{part} fer particulaire ; Fe_{coll} fer colloïdale ; Fe_{solu} fer soluble ; Fe_d fer dissous.

La spéciation physique du fer dans l'eau de mer est définie par la taille des pores des filtres utilisés pour isoler les différentes fractions (**Figure I.4**). Le fer soluble correspond à la fraction inférieure à $0,02 \mu\text{m}$ (ou 1 kDa), la fraction colloïdale a une taille de $0,02 \mu\text{m}$ à $0,2 \mu\text{m}$. Le fer dissous est composé des fractions soluble et colloïdale. La fraction particulaire du fer correspond aux formes complexées du fer, dont la taille est supérieure à $0,2 \mu\text{m}$. A cette spéciation physique s'ajoute une spéciation chimique basée sur les ligands du fer. En effet, le fer dissous est complexé à plus de 99% par des ligands organiques, qui sont généralement divisés en deux groupes : les ligands ayant une forte affinité avec le fer, appelés L1 (avec une constante de stabilité : $\log_{FeL1} > 12$), et ceux ayant une plus faible affinité, appelés L2 (avec une constante de stabilité : $\log_{FeL2} \leq 12$). L'origine biologique de ces ligands a été démontrée dans plusieurs études, où de forts excès de ligands ont été détectés là où la biomasse est maximale (Buck and Bruland, 2007; Gerringa *et al.*, 2006, 2008; Gledhill and Buck, 2012; Ibanami *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2011). De plus, une étude menée par Wagener en 2008, indique également que la concentration en ligands augmente avec la production primaire, durant les périodes de printemps et d'été (entre mai et août), en raison de l'ensoleillement et de la température plus élevés, confirmant l'origine biologique de ces ligands

(Wagener *et al.*, 2008). Le fer lié à de la matière organique n'est pas immédiatement biodisponible pour les cellules, ces dernières doivent généralement elles-aussi produire des ligands afin de pouvoir assimiler le métal. A l'inverse, la forme inorganique du fer est la seule qui est directement disponible pour certains organismes, mais sa concentration est extrêmement faible, inférieure à 10^{-15} mol.L⁻¹ (Tagliabue *et al.*, 2017).

La répartition spatiale des ligands dépend de leur affinité avec le fer. Les ligands les plus forts, sont retrouvés à forte concentration et en excès en surface ainsi qu'à des profondeurs intermédiaires (moins de 2000 m). Plus la profondeur augmente, plus la quantité de ligands fort diminue et ces derniers se retrouvent saturés en fer. Aux profondeurs élevées, les ligands faibles se retrouvent très majoritaires (Buck *et al.*, 2018), bien qu'ils soient toutefois présents tout au long de la colonne d'eau (Boyd and Ellwood, 2010).



1.3.2. Origine des ligands organiques

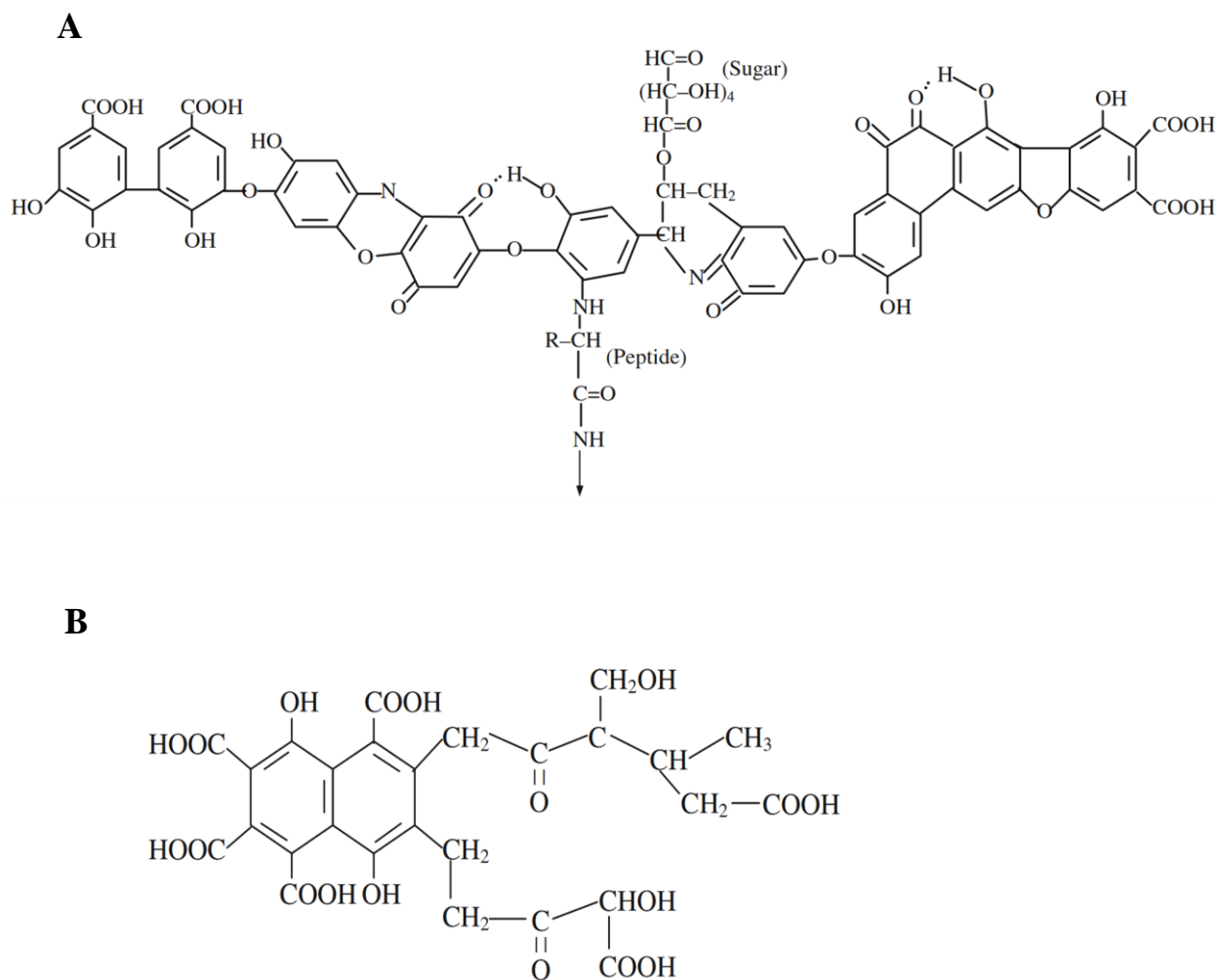


Figure I.5. Structures théoriques de composés humiques.

Les structures représentées sont celles de l'acide humique (A) et de l'acide fulvique (B). La flèche vers le bas de la structure de l'acide humique (A) indique que d'autres structures identiques (acides aminés voire même d'autres molécules d'acides humiques) peuvent être liées à la molécule. R indique un résidu alkyle. L'affinité avec le fer est proportionnelle au nombre de cycles aromatiques.

Adapté de (Buffle, 1977; Stevenson, 1994; Wang and Mulligan, 2006).

Les ligands à forte affinité pour le fer sont des sidérophores produits par les microorganismes qui les utilisent pour l'acquisition du fer. La production de ces ligands étant biologique, la distance par rapport à la côte n'influence pas particulièrement la distribution des ligands, à l'inverse de la profondeur car c'est en surface que vit la majorité des organismes vivants (Boye *et al.*, 2003; Buck and Bruland, 2007; Gledhill and Buck, 2012; Hopkinson and Barbeau, 2007). La structure et la fonction des sidérophores sont détaillées dans le paragraphe 2.1.1.

Les ligands les plus faibles sont généralement des substances humiques résultant de la décomposition de matière organique d'origine marine ou terrestre (Boyd and Ellwood, 2010; Gledhill and Buck, 2012; Laglera and van den Berg, 2009). Les concentrations en substances humiques les plus hautes, autour de $190 \mu\text{g.L}^{-1}$, ont été relevées à proximité des côtes alors qu'en milieu océanique elles sont comprises entre 10 et $120 \mu\text{g.L}^{-1}$. Des concentrations élevées sont également retrouvées à des profondeurs entre 500 et 1000 m (Whitby *et al.*, 2020). Majoritairement composées d'acides humiques et fulviques, les substances humiques sont très hétérogènes, avec notamment un nombre de sites liant le fer ainsi qu'une affinité pour ce métal variables (Krachler *et al.*, 2015). La structure type de ces composés est présentée en **Figure I.5**. La liaison entre le métal et les composés humiques se fait au niveau de leurs cycles aromatiques. Leur affinité avec le fer est moins élevée que les ligands forts car ils ne forment pas nécessairement un complexe hexadentate avec le métal comme le font les sidérophores. Un ligand hexadentate se combine avec un atome métallique avec six liaisons assurant ainsi une forte stabilité du complexe. Plus le nombre de liaison est proche de 6, plus la stabilité du complexe est forte, c'est pourquoi la complexation du fer est positivement corrélé avec l'aromaticité des composés humiques (Kikuchi *et al.*, 2017). Il est également possible que ces complexes ne soient pas de stœchiométrie 1:1, une molécule humique peut lier plusieurs atomes de fer, ou à l'inverse, deux composés peuvent n'en lier qu'un seul. Les composés humiques représentent une fraction importante des ligands, entre 25 et 50 % (Dulaquais *et al.*, 2018; Whitby *et al.*, 2020). Une autre source de ligands faibles provient également des produits de la photolyse de sidérophores tels que la pétrobactine, la vibrioferrine, ou encore l'aquachéline par exemple (Amin *et al.*, 2009; Barbeau *et al.*, 2001; Boyd and Ellwood, 2010; Butler *et al.*, 2021). Les sidérophores et leurs photoproduits sont présentés en **Figure I.6**.

1.3.3. Devenir du fer dans les océans et réactivité des ligands

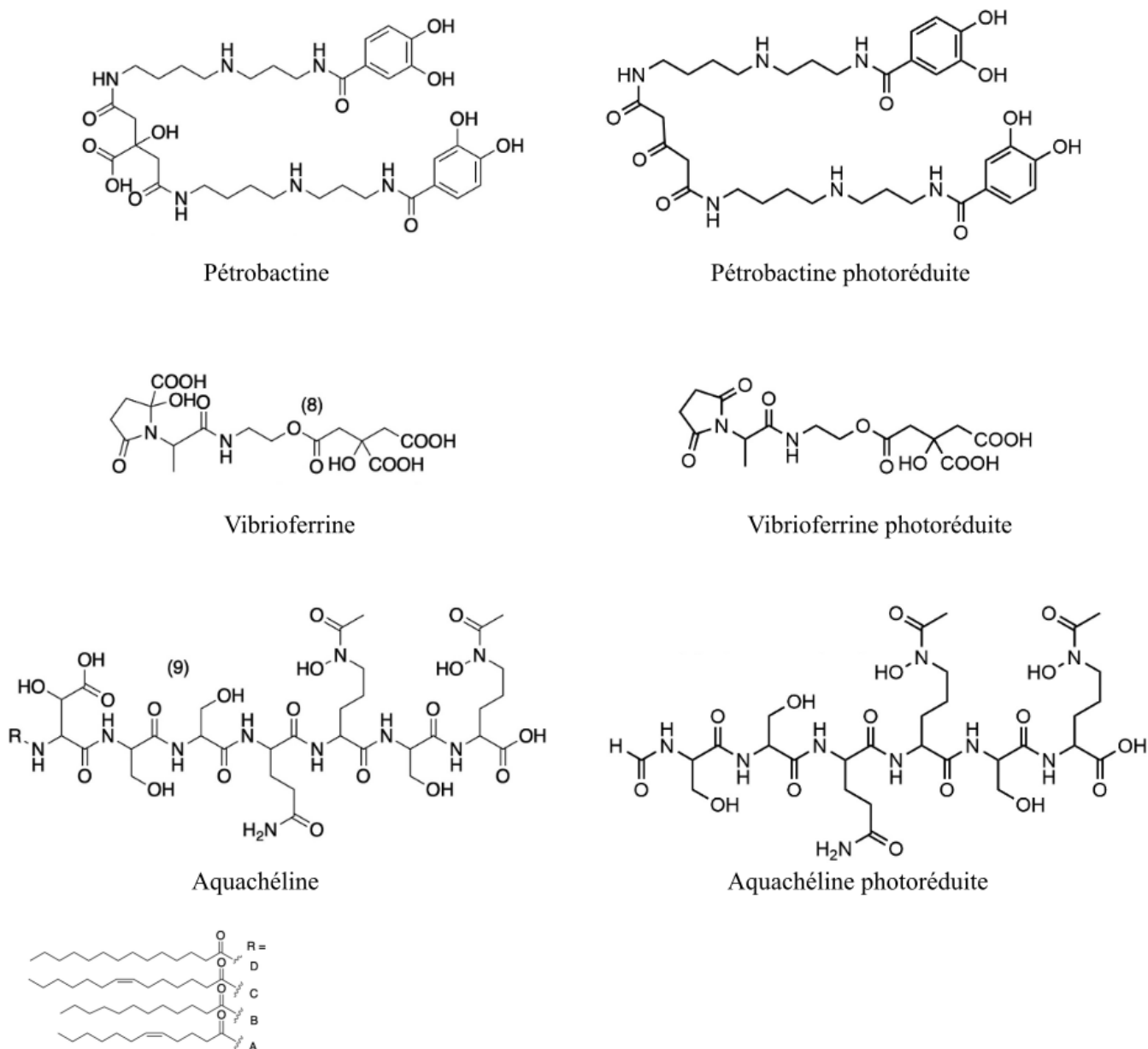


Figure I.6. Exemples de sidérophores marins et leurs photoproduits.

L'affinité des sidérophores photoréduits pour le fer est souvent plus faible car la réduction a modifié certains groupements impliqués dans la liaison avec le métal et ne forment plus des complexes hexadentates.

Adapté de (Butler *et al.*, 2021).

La majeure partie des ligands du fer, qu'ils soient forts ou faibles, réside dans les fractions solubles et colloïdales constituant le fer dissous. Le fer ainsi que les ligands peuvent passer d'une fraction à l'autre, par divers mécanismes tels que la réduction photochimique ou encore l'acquisition du fer par les bactéries. Ainsi, lorsqu'un sidérophore est photolysé (**Figure I.6**), son affinité avec le fer est réduite, et le complexe peut même se dissocier. Par conséquent, le fer peut par la suite être complexé par de la matière organique et donc passer de la fraction soluble (complexe fer-sidérophore) à la fraction colloïdale ou particulaire (complexe fer-matière organique). Le fer libéré et/ou sous forme de complexe avec le sidérophore peut aussi être acquis par un microorganisme. A la mort de ce dernier, le fer se retrouve dans la fraction colloïdale ou particulaire, car lié à de la matière organique. Il est également possible que divers agrégats puissent se former à partir de matière organique dissoute, réduisant ainsi la concentration en fer soluble au profit du fer colloïdal ou particulaire (Boyd and Ellwood, 2010). La grande majorité du fer étant complexé par des ligands biologiques, sa concentration dans les différentes fractions est par conséquent très dépendante de l'activité biologique. Les microorganismes vont dégrader la matière organique pour se développer et produire des sidérophores pour acquérir le fer, ce qui aura pour conséquence de libérer à la fois des ligands forts et des ligands faibles (Boyd and Ellwood, 2010; Wu and Boyle, 2002). La production de sidérophores complexant le fer augmente ainsi la concentration en fer dissous, le métal devient alors biodisponible même pour les organismes ne produisant pas de sidérophores, tels que les diatomées ou encore le picophytoplancton (Sato *et al.*, 2007). L'origine ainsi que les échanges de fraction des ligands sont présentées en **Figure I.7**.

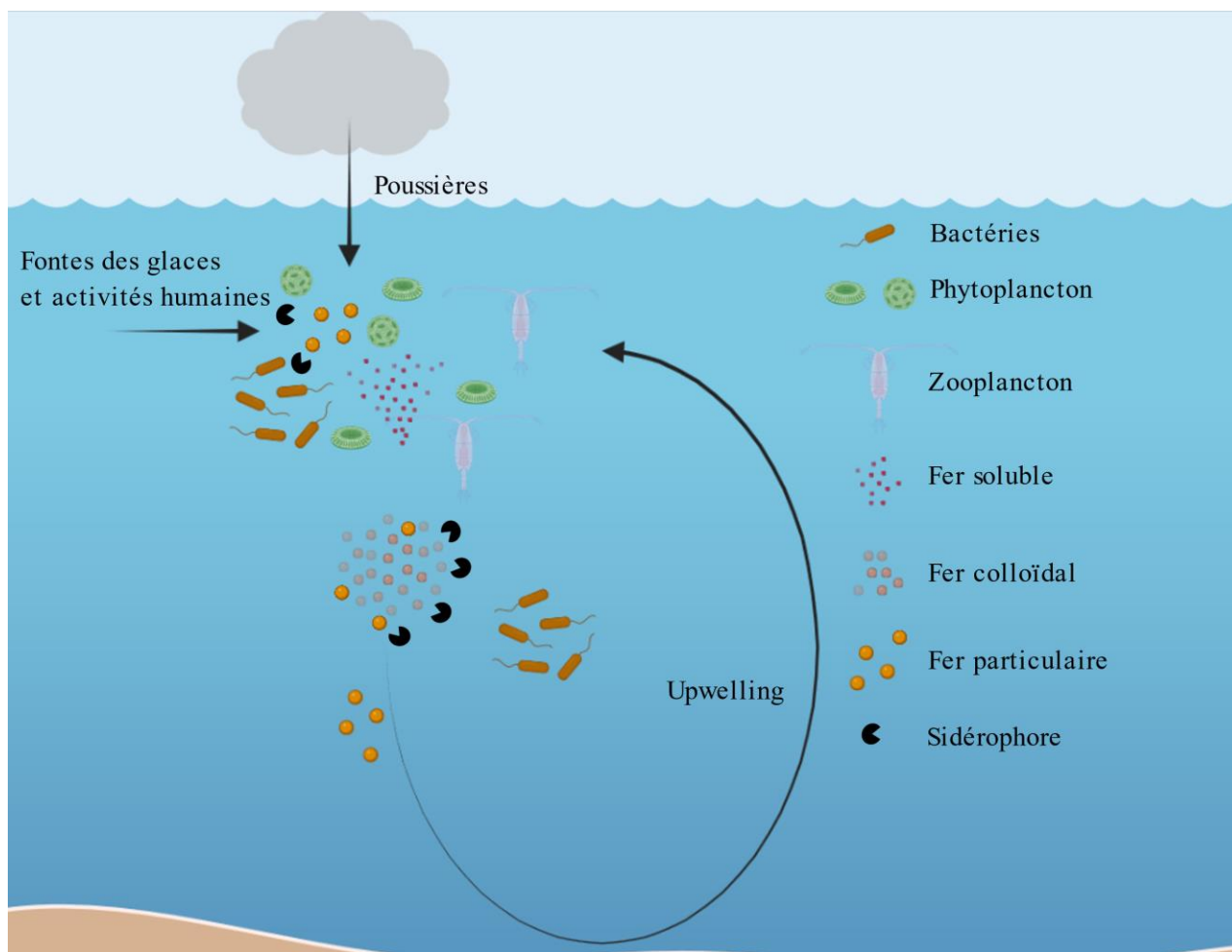


Figure I.7. Devenir du fer dans les océans et réactivité des ligands.

Le fer entre dans les environnements marins par les poussières apportées par les vents, suite à la fonte des glaces ou aux activités humaines. Le métal est sous forme particulaire, et est très vite assimilé par les organismes phytoplanctoniques, ou par les bactéries qui produisent des sidérophores. Lorsque ces organismes meurent par sénescence, lyse virale ou broutage par le zooplancton, le fer est libéré. Suite à une lyse, il se retrouve sous forme colloïdale ou particulaire car lié à de la matière organique (protéines, lipides, etc.). Sous cette forme, une partie du fer va être récupérée par les bactéries qui là encore vont produire des sidérophores pour acquérir le métal. L'autre partie coule au fond de l'océan et les ligands organiques s'agrègent, le fer est par conséquent majoritairement sous forme particulaire. Des phénomènes ponctuels d'*upwelling* peuvent également avoir lieu et ramener le fer précipitant à la surface des océans, qui peut alors à nouveau entrer dans le cycle en étant consommé par les organismes.

Comme il vient d'en être discuté, les concentrations en fer dans les différentes fractions sont dépendantes de la profondeur. La concentration en fer dissous est généralement limitée par la concentration en ligands libres (Whitby *et al.*, 2020). De la surface à 250m, la concentration en fer particulaire diminue avec la profondeur, bien qu'il n'y ait pas d'augmentation de la concentration en fer dissous (Boyd *et al.*, 2005; Boyd and Ellwood, 2010). D'après les auteurs, bien que surprenant, ce constat pourrait néanmoins s'expliquer par l'assimilation biologique du fer. Ainsi, le fer particulaire serait directement assimilé par les microorganismes et n'entrerait pas dans la fraction dissoute. Entre 250 et 1000m de profondeur, la concentration en fer dissous augmente, résultant de l'activité biologique et de la production de ligands solubles tels que les sidérophores. Enfin, en dessous de 1000m, la concentration en fer soluble diminue de nouveau, car les grosses particules organiques séquestrent le fer en sédimentant (Boyd and Ellwood, 2010; Lamborg *et al.*, 2008; Wu and Boyle, 2002). En résumé, la concentration en fer particulaire diminue au fur et à mesure avec la profondeur, jusqu'à environ 1000m car il est consommé par les organismes ou complexé par des sidérophores. En dessous de 1000m, sa concentration augmente de nouveau suite à l'agrégation de molécules organiques sédimentant au fond de l'océan.

1.3.4. Le fer inorganique

Bien que la majorité du fer dissous soit complexé à des ligands organiques, une partie de cette fraction du fer est inorganique. Cette fraction existe sous la forme de minéraux nanoparticulaires constitués d'(oxyhydr)oxides de fer tel que la ferrihydrite, goethite, lepidocrocite, hematite et schwertmannite (Raiswell, 2011). Les sources d'entrée de ces (oxyhydr)oxides de fer dans l'océan sont via les estuaires où ils sont apportés depuis les rivières et le vent qui transporte des poussières minérales vers l'océan et qui sont une source de fer soluble (Raiswell, 2011). La fonte des icebergs libère également le fer qui y était contenu en grande quantité, $9,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en moyenne (Hopwood *et al.*, 2019). Le fer inorganique est également retrouvé à la surface des sédiments du plateau continental (Raiswell, 2011), possiblement libéré par des phénomènes tels que l'érosion. Sa concentration est très faible dans la colonne d'eau car il est rapidement complexé à des ligands organiques. Bien que peu d'études se soient intéressées à la concentration en fer inorganique dans les océans, quelques données sont tout de même disponibles dans la littérature. La première concerne l'océan austral, où sa concentration est comprise entre 40 et $0,04 \text{ pmol.L}^{-1}$ (Boye *et al.*, 2001). Cet océan est connu pour être une zone HNLC, la concentration en fer est donc supposée être particulièrement faible. Une deuxième étude, menée à la station ALOHA située dans l'océan

Pacifique, au nord d'Hawaï indique que la concentration en fer inorganique mesurée est d'environ $0,1 \text{ pmol.L}^{-1}$ (Bundy *et al.*, 2018). Le fer n'est pas considéré comme limitant dans cet environnement, néanmoins, sa concentration sous forme inorganique est encore plus faible que pour l'océan austral. Même si ces données ne sont pas totalement représentatives de l'ensemble des océans, elles soulignent tout de même que la quantité de fer sous cette forme est extrêmement faible. Cela s'explique par le fait que les ligands organiques, tels que les sidérophores ou les composés humiques ont une affinité élevée avec ce métal, ils vont donc se lier aux ions de fer provenant des (oxy)hydroxides, conduisant à une diminution de la concentration en fer inorganique et une augmentation de celle en fer organique.

La ferrihydrite est une forme de fer biodisponible pour les organismes phytoplanctoniques (Raiswell, 2011), qui sont capables de l'acquérir par des transporteurs TonB-dépendants ou des porines (Sutak *et al.*, 2020). A l'inverse du phytoplancton, les microorganismes hétérotrophes n'ont pas été décrits comme capables de transporter directement le fer inorganique. De plus, bien que le métal soit majoritairement complexé à des ligands organiques, il n'est pas pour autant directement disponible pour ces organismes. C'est pourquoi les cellules disposent de systèmes d'acquisition leur permettant de récupérer le fer complexé.

2. Les systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries

Ce paragraphe décrit les différents systèmes et stratégies d'acquisition du fer chez les bactéries. Bien que les recherches menées durant cette thèse concernent une bactérie marine, les mécanismes discutés ici sont, le plus souvent, ceux de bactéries modèles à intérêt médical car ce sont des études menées avec ce type de bactérie qui ont fourni la plupart des connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'acquisition du fer. Parmi les bactéries aérobies, l'assimilation du fer par l'utilisation de sidérophores occupe une place prépondérante dans la littérature alors que les autres voies restent beaucoup moins connues. Les voies dépendantes des sidérophores sont donc traitées séparément des voies indépendantes de sidérophores. Cette distinction est toutefois purement organisationnelle puisque beaucoup de bactéries possèdent les deux types de mécanisme d'acquisition du fer. Le type de transport utilisé dépend de la solubilité du fer et donc, de son état redox puisque, de pH neutre à alcalin, Fe(II) est relativement soluble dans l'eau alors que Fe(III) ne l'est pas. Les ions Fe^{2+} sont donc pris en charge directement par des transporteurs membranaires. Les ions Fe^{3+} sont majoritairement liés à des ligands organiques ou sous forme de particules

minérales. La nature des ligands détermine aussi grandement le type de transport. Le fer lié aux ligands organiques et le fer inorganique sont généralement assimilés via des sidérophores. Néanmoins, le fer lié aux hèmes ou à certaines protéines comme la transferrine et la lactoferrine, pour lesquels des bactéries possèdent des transporteurs spécifiques, peut être assimilé sans l'aide de sidérophores.

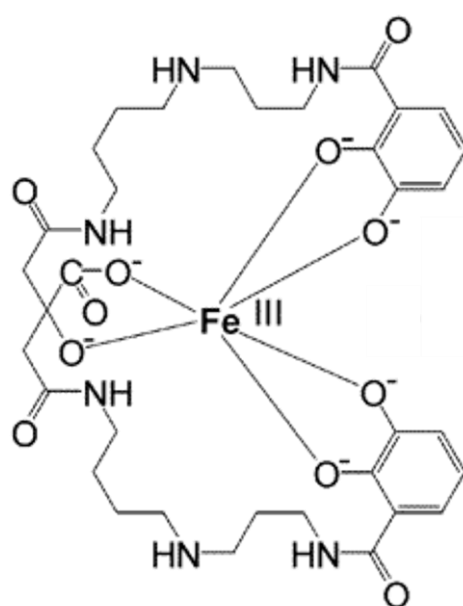


Figure I.8. Liaison entre le fer et la pétrobactine.

Adapté de (Barbeau *et al.*, 2002).

2.1. Voie dépendante de la production de sidérophores

2.1.1. Structure et fonctions des sidérophores

Les sidérophores sont des composés de faible poids moléculaire ayant une très forte affinité pour le fer(III) (Neilands, 1995). La liaison avec le fer se fait grâce aux atomes d'oxygène, qui sont des donneurs d'électrons et qui ont par conséquent une forte affinité pour les cations métalliques (Khan *et al.*, 2018). La conformation la plus stable pour lier un atome de fer comprend six fonctions coordinantes (hexadenticité) (Soares, 2022), généralement six atomes d'oxygène, comme présenté dans la **Figure I.8**. Les sidérophores peuvent être regroupés en cinq classes principales, indiquées en **Figure I.9** : catécholates, phénolates, hydroxamates, carboxylates et un assemblage de différents types. À ce jour, environ 300 sidérophores ont été recensés (Siderophore Base - The Web Data Base of Microbial Siderophores), certains associés à quelques espèces appartenant à un même genre, comme par exemple la bacillibactine ou encore la mycobactine, produites par des espèces appartenant au genre *Bacillus* ou *Mycobacterium*, respectivement. A l'inverse, un même sidérophore peut être produit par deux espèces bactériennes très opposées, comme c'est le cas par exemple pour la pétrobactine, synthétisée par *Bacillus anthracis*, bactérie terrestre appartenant à la classe des *Bacilli* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*. Une même souche bactérienne peut produire plusieurs sidérophores, comme *B. anthracis* qui produit à la fois la pétrobactine et la bacillibactine (Wilson *et al.*, 2009).

Les sidérophores sont sécrétés dans le milieu extracellulaire par les organismes dans le but d'acquérir du fer. De par leur forte affinité avec ce dernier, ces molécules se lient à un ion Fe^{3+} et le complexe ainsi formé est ensuite récupéré par les cellules. Les sidérophores permettent donc de récupérer le fer sous forme inorganique mais également lorsqu'il est déjà lié à de la matière organique car l'affinité entre le fer et le sidérophore est bien plus élevée que celle entre le métal et les composés humiques. Quelques sidérophores, notamment ceux produits par des bactéries marines, ont la particularité d'être amphiphiles. Ils possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe, composée d'acides gras (Vraspir and Butler, 2009). Certains d'entre eux restent même accrochés à la membrane cellulaire via leur partie hydrophobe, captant le fer à la surface de la cellule, ne diffusant ainsi pas dans leur environnement (Martinez *et al.*, 2003). A l'inverse, les sidérophores ne possédant pas cette propriété doivent être sécrétés dans le milieu extracellulaire. Une autre particularité des sidérophores marins est qu'ils sont souvent composés d'une moitié acide α -hydroxyle (Vraspir and Butler, 2009). Ce groupement rend les molécules photooxydables.

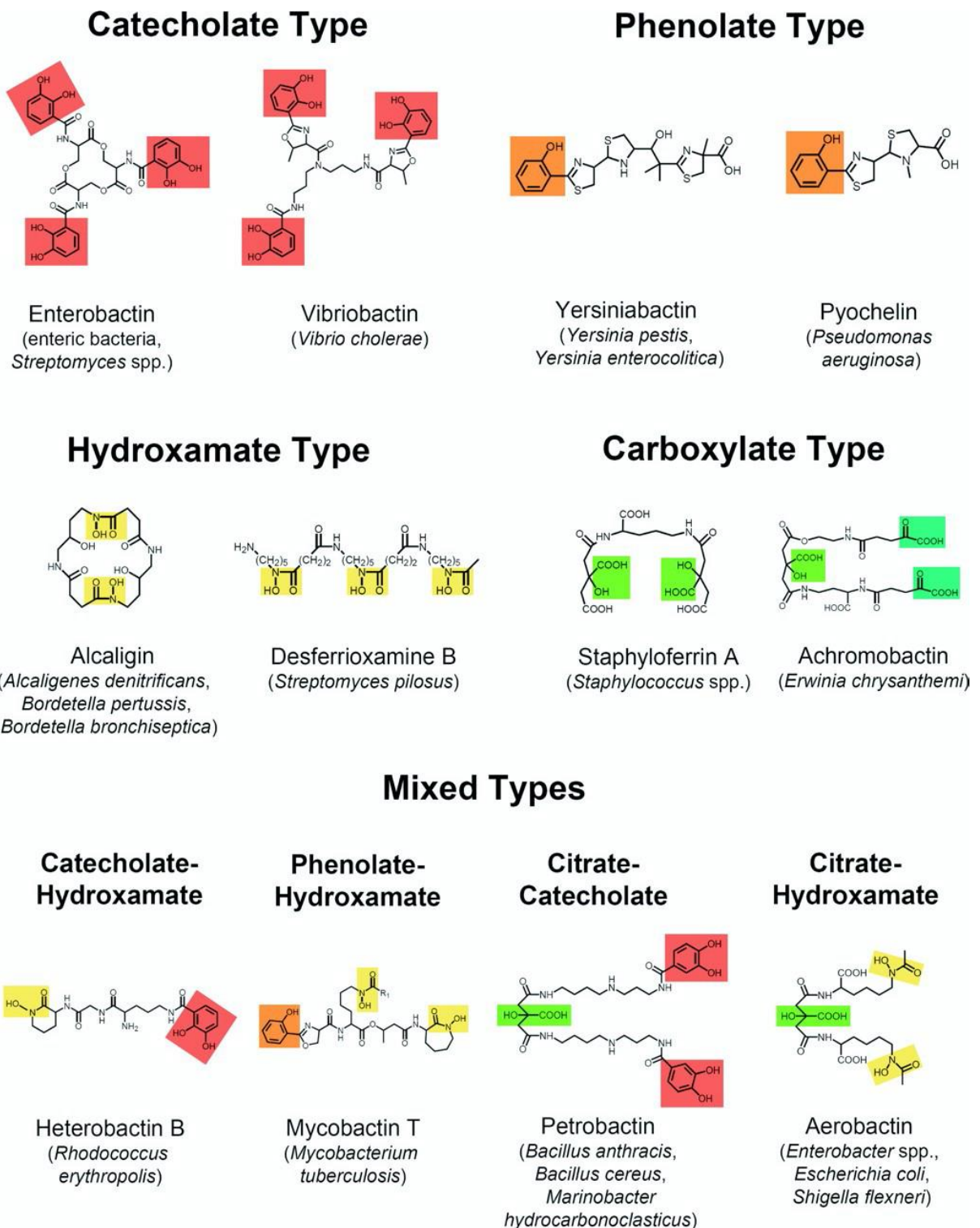


Figure I.9. Différentes structures de sidérophores.

Les sidérophores peuvent être regroupés en 5 classes en fonction de leur structure. Les groupements ont été encadrés : catécholate (en rouge), phénolate (en orange), hydroxamate (en jaune), carboxylate (en vert) et un assemblage de différents types (mix). Les espèces produisant ces sidérophores sont précisées.

Adapté de (Kramer *et al.*, 2020).

En plus de leur rôle dans l'acquisition du fer, les sidérophores assurent également d'autres fonctions. Ces molécules sont capables de chélater d'autres métaux essentiels, tels que le zinc ou le manganèse par exemple, qui peuvent ensuite être récupérés par les cellules (Behnsen *et al.*, 2021; Duckworth *et al.*, 2009). Cette propriété permet aussi de protéger les cellules contre les métaux toxiques dont certains d'entre eux sont capables d'entrer dans le périplasme par diffusion chez les bactéries didermes. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* produit la pyoverdine qui est capable de se lier avec une affinité différente à plusieurs métaux, dont certains pouvant s'avérer toxiques comme le plomb ou le chrome. Le complexe formé avec ces métaux n'est pas reconnu par le transporteur et reste dans le milieu extracellulaire (Braud *et al.*, 2009). Les métaux liés aux sidérophores ne pourront plus traverser la membrane externe, réduisant leur toxicité.

Un autre rôle observé des sidérophores est leur implication dans la protection contre le stress oxydant. Une étude a démontré que l'entérobactine, un sidérophore produit par *Escherichia coli* protège les cellules contre le peroxyde d'oxygène et le paraquat (Peralta *et al.*, 2016). Les groupes hydroxyles contenus dans les cercles aromatiques permettent de stabiliser les radicaux libres.

Il a également été démontré que l'utilisation de sidérophores est essentielle pour la formation de biofilms chez *B. subtilis* et *Mycobacterium segmentis* dans des conditions de faible concentration en fer (Ojha and Hatfull, 2007; Rizzi *et al.*, 2019). Pour ces biofilms, le fer est indispensable pour que leur formation puisse avoir lieu et l'utilisation de sidérophores est nécessaire pour que les cellules puissent acquérir suffisamment de fer.

Pour les organismes pathogènes, l'utilisation de sidérophores est essentielle pour assurer leur virulence car chez leur hôte, le fer n'est pas libre. Par exemple chez les mammifères, il est lié à des protéines de la famille des transferrines. La sécrétion de sidérophores par les organismes pathogènes est alors nécessaire pour pouvoir acquérir du fer et proliférer (Saha *et al.*, 2013). C'est le cas pour *Staphylococcus aureus* dont la production de deux sidérophores, la staphyloferrine A et B permet d'obtenir du fer lié à des transferrines chez leur hôte, contribuant à leur virulence (Beasley *et al.*, 2011). Chez *P. aeruginosa*, il a même été observé que la pyoverdine agit comme une molécule de signal et régule sa propre production ainsi que celle de facteurs de virulence comprenant l'exotoxine A et une endoprotéase (Lamont *et al.*, 2002).

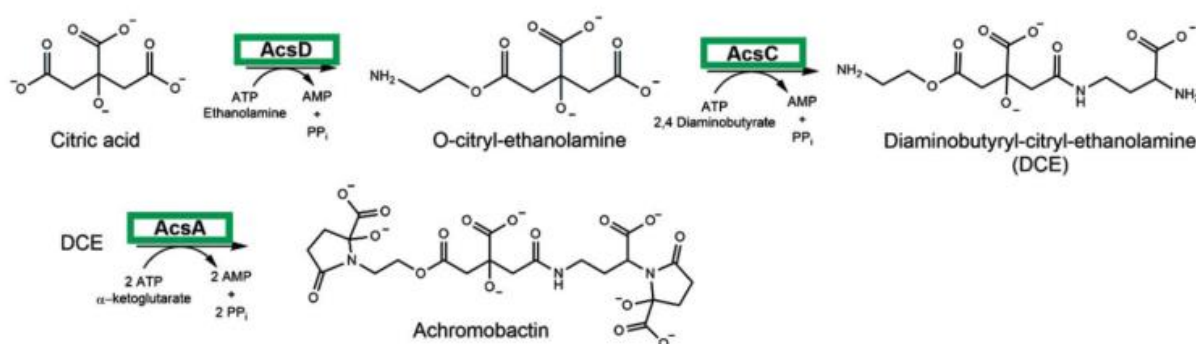


Figure I.10. Implication des enzymes NIS dans la voie de biosynthèse de l'achromobactine.

AcsD est une enzyme NIS de type A (catalyse la condensation d'un des groupes prochiral de l'acide citrique avec une amine), AscC une enzyme NIS de type C (catalyse la condensation entre une amine et un intermédiaire citryl) et AscA une enzyme NIS de type B (catalyse la condensation d' α -ketoglutarate avec un intermédiaire citryl-amine). Adapté de (Carroll and Moore, 2018).

2.1.2. Voies de synthèse des sidérophores

La biosynthèse des sidérophores est dans la majorité des cas assurée par des enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques, abrégées NRPS pour *non-ribosomal peptides synthetase*. Les sidérophores sont l'assemblage de précurseurs, tels que du citrate, du dihydroxybenzoate, des acides aminés, catalysé par les NRPS (Chen *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2018). Ces dernières sont des complexes multi-enzymatiques, indépendants du ribosome (c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas de modèle ARN) (Crosa and Walsh, 2002), impliqués dans la synthèse de peptides, tels que les sidérophores. Ces enzymes sont composées de modules, eux-mêmes constitués de domaines enzymatiques. Trois domaines sont essentiels pour l'assemblage des sidérophores et sont retrouvés dans chaque module. Il s'agit du domaine d'adénylation, catalysant la reconnaissance et l'activation du substrat, du domaine de thiolation assurant le transport des substrats vers les centres catalytiques (domaine également appelé *peptidyl carrier protein*) et enfin le domaine de condensation qui catalyse la formation du peptide (Schwarzer *et al.*, 2003). La synthèse de sidérophores peptidiques, tels que la pyochéline, la pyoverdine, l'entérobactine ou encore la mycobactine est essentiellement réalisée par des NRPS.

Une autre partie de sidérophores est synthétisée par une autre voie, appelée NRPS *independant siderophore* (NIS) *synthetase*. Les NIS ne partagent pas de similarités de structure, ni de séquence avec les NRPS (Chen *et al.*, 2019). Les synthétases NIS n'assurent qu'une réaction enzymatique, qui consiste généralement en la condensation d'acide citrique (ou d'un dérivé) avec un composé possédant un groupement alcool ou amine (Carroll and Moore, 2018). Cette voie permet l'assemblage de sidérophores contenant des acides α -hydroxy et hydroxamiques (Challis, 2005). Les enzymes NIS sont classées en quatre types : A, A', B et C selon leur spécificité de substrat. Trois exemples de réactions impliquant ces trois classes sont présentés en **Figure I.10**. Pour le type A, les enzymes catalysent la condensation d'un des groupes prochiral de l'acide citrique avec des alcools ou des amines. Le type A', sous classe du type A, contient des enzymes qui catalysent la condensation de l'autre groupe prochiral de l'acide citrique avec des amines. Pour le type B, les enzymes catalysent la condensation d' α -ketoglutarate et de groupes γ -carboxyles avec les intermédiaires du cytril-amine (produit par les enzymes de la classe A). Enfin les enzymes du type C catalysent la condensation entre un mono-amide ou une amine avec un intermédiaire succinyl ou citryl. Des sidérophores non-peptidiques tels que l'aérobactine ou encore la rhizobactine sont synthétisés à l'aide de synthétases NIS (Carmichael *et al.*, 2019). Dans certains cas, il est possible que la synthèse du sidérophore fasse intervenir à la fois des enzymes NRPS et des NIS, comme pour la pétrobactine où AsbA et AsbB sont des synthétases NIS de type A et C, respectivement, et AsbC, AsbD et AsbE sont des NRPS (Chen *et al.*, 2019). La dernière enzyme impliquée dans la biosynthèse de la pétrobactine, AsbF n'est ni un NRPS ni une NIS, il s'agit d'une déhydratase (qui retire un groupement H₂O).

Comme il vient d'en être discuté, les sidérophores sont le résultat d'un assemblage de précurseurs. Les paragraphes suivants traitent du fonctionnement de l'acquisition du fer par l'utilisation de sidérophores. Le sidérophore est tout d'abord sécrété dans le milieu extracellulaire où il se lie au fer, puis le complexe est récupéré par la cellule, nécessitant plusieurs transporteurs (Crosa and Walsh, 2002), avant d'être dissocié dans le périplasme ou le cytoplasme. Tout ce processus est résumé dans la **Figure I.11**.

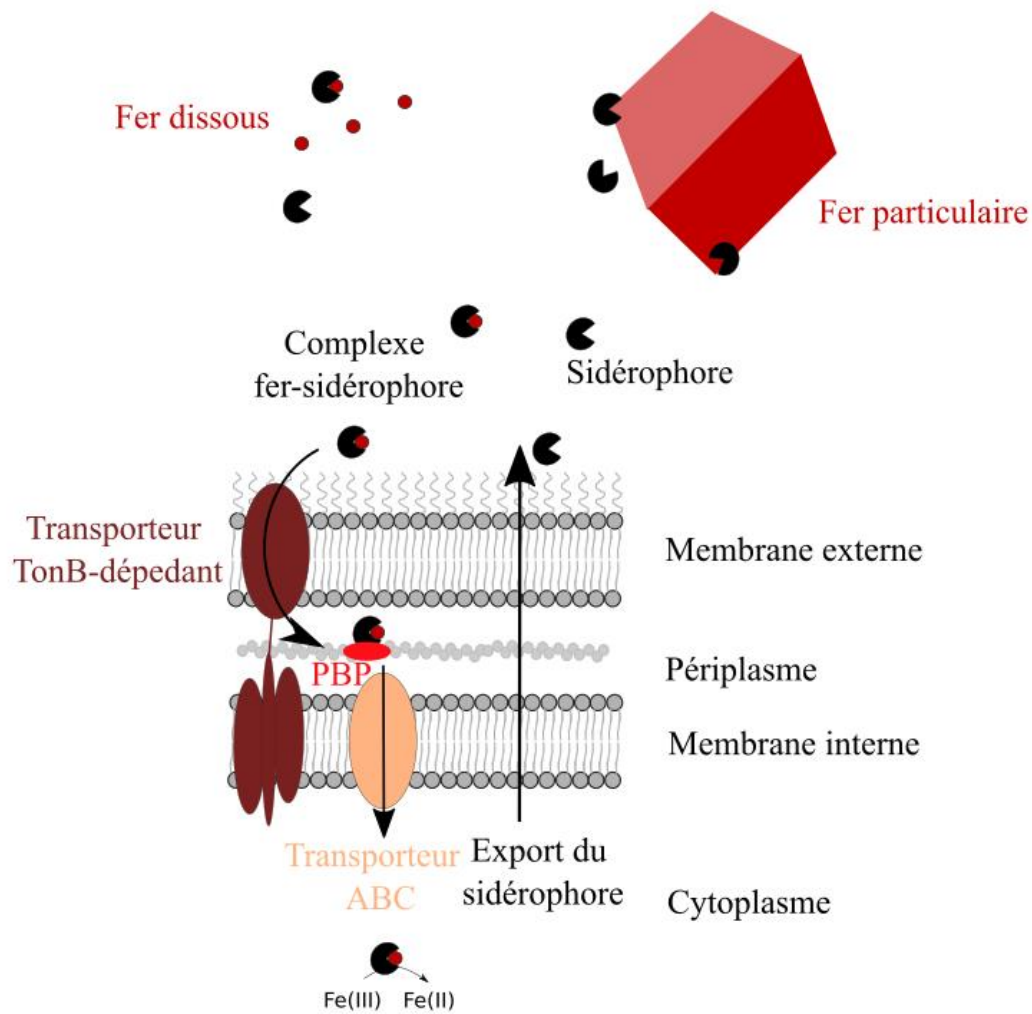


Figure I.11. Exemple d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries didermes.

Le sidérophore est tout d'abord sécrété dans le milieu extracellulaire après sa biosynthèse. Il diffuse librement jusqu'à rencontrer du fer (sous forme particulaire ou dissoute). Une fois le complexe formé, il va lui aussi diffuser librement jusqu'à atteindre un récepteur cellulaire, puis traverser la membrane externe par un transporteur TonB-dépendant. Une fois dans le périplasme, le complexe peut être pris en charge par une protéine périplasmique, qui va amener le complexe jusqu'au transporteur ABC (*ATP-binding cassette*), lui permettant de traverser la membrane interne avec un transporteur ABC pour atteindre le cytoplasme. Le complexe se dissocie, libérant le fer qui peut être assimilé par la cellule.

2.1.3. L'export des sidérophores

Dans ce manuscrit, les bactéries sont classées en deux catégories en fonction des caractéristiques de leur(s) membrane(s) (Sutcliffe, 2010). Ainsi les bactéries n'ayant qu'une seule membrane (correspondant à la membrane cytoplasmique des bactéries Gram-positives typiques) sont définies comme « monoderms » et les bactéries possédant deux membranes (correspondant à la membrane cytoplasmique et la membrane externe des bactéries Gram-négatives typiques) sont des « diderms ».

Une fois que les cellules ont synthétisé un sidérophore, elles doivent l'exporter hors de la cellule, afin qu'il puisse se lier à un ion ferrique. Bien moins documenté que les systèmes d'import, la sécrétion de sidérophores dans le milieu extracellulaire est non spécifique et réalisé par un système d'efflux (Li *et al.*, 2016). L'efflux est un mécanisme de transport actif assuré par des protéines transmembranaires par lequel les cellules excrètent des composés, souvent toxiques tels que des antibiotiques ou des métaux dans le milieu extérieur. Les systèmes d'efflux sont classés en six familles : les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), la famille RND (Résistance-Nodulation-Division), la famille MFS (*Major facilitator superfamily*), la famille SMR (*Small multidrug resistance*), la famille MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), la famille PACE (*proteobacterial antimicrobial compound efflux*) (Du *et al.*, 2018). Parmi ces six systèmes d'efflux, trois sont majoritairement retrouvés dans l'export de sidérophores, les transporteurs MFS, RND et ABC. Ces trois systèmes d'efflux sont détaillés dans la **Figure I.12**. Chez *E. coli*, l'entérobactine est exportée par un transporteur MFS (Bleuel *et al.*, 2005; Furrer *et al.*, 2002). Chez *B. subtilis*, c'est également ce transporteur qui est retrouvé pour l'export de la bacillibactine (Miethke *et al.*, 2008) (Miethke *et al.*, 2008). Le transporteur RND est impliqué dans l'export de la pétrobactine chez *B. anthracis* (Hagan *et al.*, 2017). Le fait que la pétrobactine soit exportée par ce type de transporteur est assez surprenant car les transporteurs RND sont plus courants chez les bactéries diderms. Les transporteurs ABC sont impliqués dans l'export de sidérophores chez *M. tuberculosis* (Farhana *et al.*, 2008).

Une fois le sidérophore sécrété dans le milieu extracellulaire, son rôle est de se lier à l'ion ferrique puis d'être récupéré par la bactérie. Il existe pour cela plusieurs mécanismes.

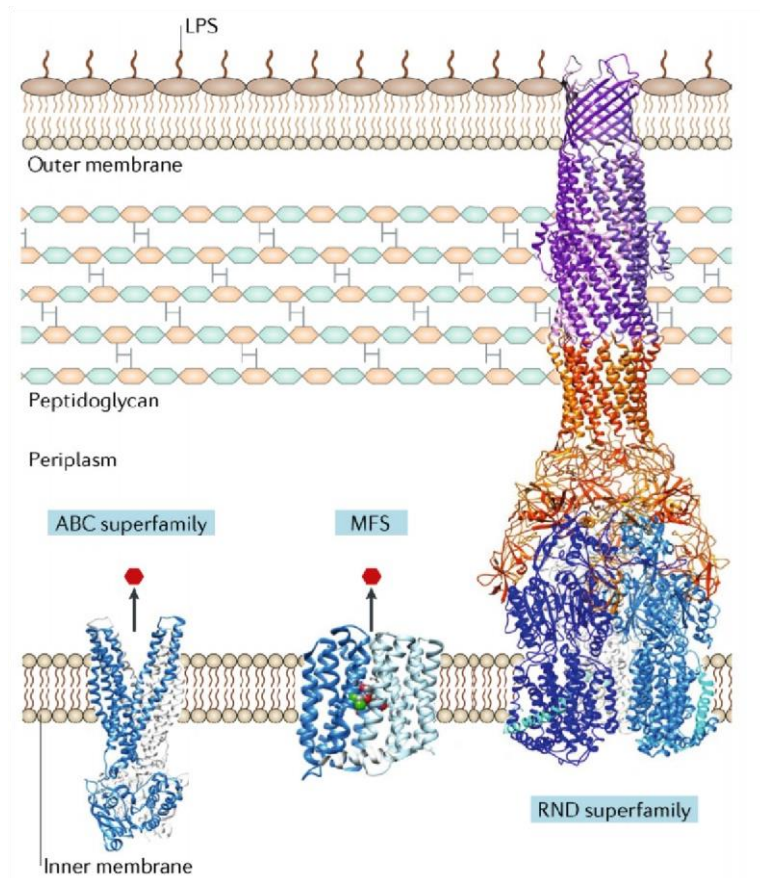


Figure I.12. Représentation schématique des systèmes d'efflux impliqués dans l'export de sidérophores chez les bactéries didermes.

Adapté de (Du *et al.*, 2018)

- Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC permettent à la fois l'import et l'export de substrats. Ils sont composés de quatre domaines : deux domaines transmembranaires formant un pore par lequel les substrats traversent la membrane, et deux domaines (appelés NBD pour *nucleotide-binding domain*) permettant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport (Davidson *et al.*, 2008).

- Les transporteurs MFS

Les transporteurs MFS interviennent dans l'import et dans l'export d'une large gamme de substrats, tels que des ions, des glucides, des lipides, des acides aminés, etc. La majorité de ces transporteurs est composée de deux domaines, chacun contenant six hélices transmembranaires. Les protéines ne contiennent qu'un seul site de liaison situé au milieu de la membrane plasmique. Ce type de transporteur est retrouvé à la fois chez les bactéries didermes et monodermes. Chez les didermes, il permet le transport à travers la membrane interne. Les transporteurs MFS sont souvent des symporteurs, et parfois des antiporteurs utilisant le potentiel électrochimique pour permettre le transport du substrat contre son gradient. Un système symporteur permet le passage dans un même sens d'un ou plusieurs substrats. Ces transporteurs exploitent

tous l'énergie stockée sous forme de gradient de protons à travers la membrane pour permettre le passage de substrats à travers la membrane. Ce co-transport est réalisé par un changement de conformation de la protéine. La liaison ainsi que la dissociation du substrat sont liées à un changement de conformation de la protéine et ce changement de conformation est lié quant à lui à la protonation et la déprotonation de certains résidus de la protéine (Yan, 2013). Pour simplifier, la liaison du substrat à la protéine a pour effet de changer la conformation de la protéine. Par exemple chez une bactérie monoderme, la liaison d'un composé extracellulaire implique le changement de conformation de la protéine de transport, son côté extracellulaire s'ouvre tandis que son côté cytoplasmique se ferme puis le relargage du substrat dans le milieu intracellulaire résulte sur un nouveau changement de conformation de la protéine où cette fois-ci son côté cytoplasmique s'ouvre et son côté extracellulaire se ferme.

- Les pompes à efflux de la superfamille RND

Les pompes à efflux de la superfamille RND sont composées d'un complexe tripartite et jouent un rôle important dans l'efflux des antibiotiques, principalement chez les bactéries didermes. Le complexe est composé de trois protéines couvrant la membrane interne, la membrane externe ainsi que l'espace périplasmique. La protéine de l'espace périplasmique relie les deux autres protéines. Le gradient de proton permet de fournir l'énergie nécessaire. Il s'agit d'un système antiport, c'est à dire qu'un ion H^+ entre dans la cellule pour qu'une molécule d'antibiotique puisse être expulsée (Nikaido, 2003; Venter *et al.*, 2015).

2.1.4. L'import du sidérophore

Il existe deux stratégies différentes pour faire entrer le fer capté par le sidérophore. La première concerne des organismes eucaryotes (algues filamenteuses et champignons) où le fer est dissocié du complexe dans le milieu extracellulaire puis entre dans la cellule comme un ion. La deuxième stratégie, employée par les bactéries, consiste à faire entrer tout le complexe dans la cellule (Saha *et al.*, 2013). L'internalisation du complexe sidérophore-fer fait intervenir des transporteurs, et les mécanismes diffèrent sur certains aspects entre les bactéries monodermes et didermes. Chez les bactéries monodermes, des protéines réceptrices de la membrane plasmique permettent de capter le complexe sidérophore-fer, qui traverse ensuite la membrane par le biais d'un transporteur ABC (Ahmed and Holmström, 2014). Chez les bactéries didermes, la membrane externe nécessite un système de transport supplémentaire, les transporteurs TonB-dépendant. À la

différence des transporteurs ABC qui peuvent transporter plusieurs sidérophores différents, les transporteurs TonB-dépendant sont spécifiques d'un sidérophore ou de quelques sidérophores ayant des structures proches (Schalk *et al.*, 2012). Ces transporteurs sont des protéines de la membrane externe qui captent et assurent le passage de quelques composés spécifiques à travers cette membrane chez les bactéries didermes. Ils permettent de transporter les complexes fer-sidérophores, mais également la vitamine B12, des glucides et des complexes de nickel. Il s'agit d'un transport actif secondaire car il utilise la force proton-motrice. Un complexe de trois protéines situé dans la membrane interne (TonB-ExbB-ExbD) est nécessaire pour transférer l'énergie issue de la force proton motrice vers le récepteur TonB-dépendant localisé dans la membrane externe. Le contact entre le complexe et le récepteur TonB-dépendant se fait au niveau de la boîte TonB. Les transporteurs TonB-dépendant forment un pore et permettent le passage du complexe sidérophore-fer à travers la membrane externe (Noinaj *et al.*, 2010).

Lorsqu'il a atteint le périplasma, le complexe ferrisidérophore peut traverser la membrane interne de la même manière que pour les bactéries monodermes, par un transporteur ABC via des protéines de liaison périplasmiques, abrégées PBP pour *periplasmic binding protein*. Le transporteur ABC est parfois remplacé par des perméases dépendantes de la force proton-motrice (Schalk and Guillon, 2013). Les perméases permettent un transport facilité qui est assuré par un changement de conformation de la protéine.

2.1.5. Dissociation du complexe fer-sidérophore

Une fois le sidérophore dans le cytoplasme, la dernière étape est la dissociation du complexe sidérophore-fer pour que la cellule puisse assimiler l'atome de fer (dont le mécanisme est détaillé dans la section 2.1.5.a). Dans certains cas, il est possible que la dissociation du complexe se réalise dans le périplasma. Cela a été étudié pour la pyoverdine produite par *P. aeruginosa*. Dans ce cas, la dissociation du complexe n'implique pas de dégradation ou de modification du sidérophore, mais une réduction du fer (Greenwald *et al.*, 2007; Schalk and Guillon, 2013; Yeterian *et al.*, 2010). Lorsque le complexe pyoverdine-fer atteint le périplasma, il est probablement d'abord chélaté par un complexe de protéines périplasmiques. Le fer est ensuite réduit sous l'action d'une protéine fer réductase. La pyoverdine ayant moins d'affinité pour le fer ferreux, le métal peut alors être capté par une protéine périplasmique, qui l'accompagne jusqu'à un transporteur ABC afin qu'il puisse atteindre le cytoplasme (Ganne *et al.*, 2017). Le principal avantage dans ce cas est que la pyoverdine

peut alors être recyclée en étant exportée dans le milieu extracellulaire via une pompe à efflux où elle pourra de nouveau acquérir un ion ferrique (Imperi *et al.*, 2009; Schalk *et al.*, 2002; Schalk and Guillon, 2013; Yeterian *et al.*, 2010).

a. Mécanismes généraux

La dissociation du complexe sidérophore-fer implique une réduction du fer. Cette réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} peut avoir lieu dans le milieu extracellulaire lorsque les conditions sont favorables ou dans le milieu intracellulaire. Cela a pour effet de réduire l'affinité du sidérophore pour le fer, permettant à un autre composé de récupérer l'ion Fe^{2+} encore lié au sidérophore (Boukhalfa and Crumbliss, 2002) ou débouchant sur une libération spontanée du fer. L'avantage de ce mécanisme est qu'il permet un recyclage du sidérophore car ce dernier n'est pas dégradé. La libération du fer peut également avoir lieu après hydrolyse du sidérophore, qui peut là aussi se réaliser dans le milieu extracellulaire sous l'action des rayons UV, ou dans le milieu intracellulaire. Cette réaction diminue la stabilité du complexe, et est suivie d'une réduction du fer, favorisant ainsi sa libération. Ce deuxième mécanisme est moins courant. En effet, tous les sidérophores ne sont pas hydrolysables, et pour ceux qui le sont, le coût énergétique est plus important, le sidérophore ne pouvant généralement pas être réutilisé (Miethke and Marahiel, 2007).

b. Facteurs favorisant la dissociation

Plusieurs facteurs peuvent favoriser la réduction du complexe sidérophore-fer, qui peut avoir lieu dans le milieu extracellulaire, dans le périplasme ou encore le cytoplasme : une acidification du milieu, l'activité d'une ferrisidérophore réductase ou la photooxydation. Dans le cas de la ferrisidérophore réductase, il s'agit souvent d'une action indirecte de flavines réductases. Ces protéines ne sont pas spécifiques de cette réaction car elles catalysent la réduction de la flavine mononucléotide, de la flavine adénine dinucléotide et de la riboflavine par l'intermédiaire de NAD(P)H comme donneur d'électron (Pierre *et al.*, 2002). Ces flavines libres réduites permettent alors, via le transfert d'un électron, la réduction du complexe sidérophore-fer. Toutefois, il existe des protéines ferrisidérophore réductases spécifiques, dont la première, FhuF, a été découverte chez *E. coli*. La protéine FhuF est spécifiquement impliquée dans la réduction des complexes fer-sidérophore à hydroxamate (Müller *et al.*, 1998). D'autres protéines homologues à FhuF et spécifiques de la réduction de ferrisidérophores ont été découvertes par la suite (Matzanke *et al.*, 2004). Un autre mécanisme implique

l'hydrolyse du complexe sidérophore-fer, comme par exemple sous l'action d'une estérase. La première à être découverte, la protéine Fes chez *E. coli*, permet d'hydrolyser les trois groupements lactones présents au centre de l'entérobactine et d'obtenir des monomères, dimères ou trimères linéaires de 2,3-dihydroxybenzoylserine. Une fois le sidérophore hydrolysé, deux possibilités sont envisageables. Bien que peu documenté, il est supposé que le sidérophore puisse servir une nouvelle fois à la capture de Fe^{3+} (Miethke and Marahiel, 2007). L'autre alternative est la destruction du sidérophore, comme c'est le cas chez *Erwinia chrysanthemi*, qui dégrade son sidérophore via une peptidase une fois le fer réduit et récupéré (Rauscher *et al.*, 2002).

Certains sidérophores contiennent des groupements photoréactifs comme le sont par exemple le citrate ou l'acide α -hydroxy-carboxylique. Les rayons UV oxydent le ligand qui perd une molécule de CO_2 et réduisent le Fe(III) en Fe(II) (Butler and Theisen, 2010). Bien que le rôle de la photooxydation ne soit pas encore clair, la photoréactivité des sidérophores pourrait permettre la libération du fer. Le Fe(II) ainsi formé pourrait être utilisé directement par les microorganismes, ou en présence d'oxygène, être oxydé en Fe(III) pour être chélaté de nouveau par un autre sidérophore ou le sidérophore photooxydé. Pour la pétrobactine, la photolyse du complexe sidérophore-Fe(III) débouche sur une photodécarboxylation du ligand et une réduction du fer (Butler, 2005). Le sidérophore ainsi oxydé possède lui aussi une très forte affinité avec les ions Fe(III), ce qui pourrait permettre un recyclage du sidérophore.

2.1.6. Utilisation de sidérophores exogènes

Les sidérophores sont un moyen très efficace pour l'acquisition du fer chez les bactéries, mais très coûteux énergétiquement, avec notamment leur production qui nécessite la synthèse de plusieurs molécules. Pour limiter ce coût énergétique, certains organismes sont capables de transporter un complexe sidérophore-fer au sein de leur cytoplasme alors qu'ils ne synthétisent pas par eux-même ce sidérophore. Même des bactéries ne produisant aucun sidérophore sont capables de transporter un complexe sidérophore-fer (Baig *et al.*, 1986; Guan *et al.*, 2001). Par conséquent, le fait que les sidérophores puissent être perdus au profit d'autres bactéries, un système de régulation est indispensable.

2.1.7. Systèmes de régulation de la production de sidérophores et risques liés à une trop forte concentration en fer

a. Les risques d'une accumulation de fer dans la cellule

Les risques d'assimilation du fer n'étant pas le sujet principal de ce travail, ils sont mentionnés mais sans être détaillés.

Outre le fait que les bactéries puissent produire un sidérophore et ne jamais le récupérer, la régulation de l'assimilation de fer par les bactéries est indispensable afin d'éviter une concentration en fer libre trop élevée dans la cellule. En effet, du fer libre présent en trop grande quantité dans les cellules conduit à un stress oxydatif extrêmement néfaste. Le fer mène à une toxicité plus élevée de l'oxygène via la réaction de Fenton au cours de laquelle Fe^{2+} et H_2O_2 réagissent pour former, entre autres, un radical hydroxyle, qui cause un stress oxydant à la cellule (Touati, 2000). Il est donc nécessaire pour les cellules de réguler la production de sidérophores pour éviter d'acquérir trop de fer. La régulation peut également avoir lieu au niveau des récepteurs de la membrane externe par le biais de systèmes à deux composants, comme cela a été démontré chez *P. aeruginosa* (Dean and Poole, 1993). Ces derniers sont généralement induits à faible concentration en fer et ne sont plus présents à forte concentration (Andrews *et al.*, 2003).

b. Régulation à l'échelle de la cellule

La régulation de la production de sidérophores peut avoir lieu à des niveaux différents, à l'échelle de la cellule ou de la population. De nombreuses recherches ont montré que cette régulation à l'échelle de la cellule est sous le contrôle du régulateur Fur (*ferric uptake regulator*). La protéine Fur est un homodimère dont les sous-unités sont composées de deux domaines, un domaine N-terminal impliqué dans la liaison à l'ADN et un domaine C-terminal qui contient deux sites de liaison aux métaux. En cas de forte concentration en fer, les ions Fe^{2+} se fixent sur la protéine Fur, augmentant fortement (1000 fois plus) son affinité pour son site de liaison sur l'ADN. Ce site de liaison s'appelle boîte Fur et est généralement situé entre les sites -35 et -10 du promoteur des gènes régulés par Fur (Andrews *et al.*, 2003). Chez *E. coli*, le complexe Fur- Fe^{2+} reconnaît une boîte Fur de 19 pb (GATAATGATAATCATTATC) (Escolar *et al.*, 1999) et bloque ainsi la transcription du gène en aval. De nombreux gènes sont sous le contrôle de Fur, dont ceux impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores. En effet, lorsque la concentration en fer ferreux est élevée, la cellule arrête de produire et de transporter les sidérophores (Bagg and Neilands, 1987; Hantke, 2001), car ils ne sont pas nécessaires à leur acquisition. Néanmoins, il est à préciser que la séquence

de la boîte Fur peut être différente chez certaines espèces de celle décrite initialement chez *E. coli* (Baichoo and Helmann, 2002).

c. Régulation à l'échelle de la population

Un autre type de régulation, à l'échelle d'une population est le *quorum sensing*. Le *quorum sensing* est un système permettant aux bactéries d'une population de coordonner l'expression de gènes en fonction de la diffusibilité du milieu ou de la densité cellulaire par le biais de petites molécules appelées autoinducteurs (AI). Les AI utilisés par les bactéries didermes sont principalement des acyl homosérine lactones et des oligo-peptides pour les bactéries monodermes (Miller and Bassler, 2001; Waters and Bassler, 2005). Les AI diffusent librement à travers la membrane, ainsi la concentration intracellulaire est égale à la concentration extracellulaire. Par conséquent, lorsque la densité bactérienne est faible ou que le milieu est fortement diffusif, la concentration en AI reste basse. À l'inverse, lorsque la densité cellulaire est élevée ou que le milieu est peu diffusif, la concentration en AI augmente jusqu'à atteindre un seuil qui aura pour conséquence d'activer une protéine régulatrice. Pour cela, l'AI se fixe au régulateur, qui ainsi activé peut bloquer ou initier la transcription des gènes régulés par ce système. Concernant les sidérophores, il semblerait que lorsque la densité cellulaire est élevée, les bactéries produiraient plus de sidérophores car leur probabilité de récupérer un complexe sidérophore-fer serait plus élevée. Stintzi et ses collègues ont montré en 1998 que *P. aeruginosa* ne pouvant plus produire d'AI, diminuait d'environ deux fois la production de pyoverdine, un sidérophore produit par cette bactérie (Stintzi *et al.*, 1998). En effet, dans ces conditions de forte densité cellulaire, certaines bactéries produisent des sidérophores qui seront récupérés par d'autres cellules. Il est supposé que l'intérêt soit de créer un système de coopération où les bactéries « partagent » les sidérophores. Car à l'inverse, lorsque les bactéries sont isolées les unes des autres, si elles produisent des sidérophores, leur probabilité de récupérer un complexe sidérophore-fer est très faible. Cela s'explique par le fait que la concentration en sidérophores sera faible dans ces conditions, diluant ainsi les sidérophores par diffusion dans le milieu extracellulaire et empêchant la bactérie de le récupérer (Kramer *et al.*, 2020). La stimulation de production de sidérophore par les AI ne peut tout de même pas être généralisée pour toutes les espèces, il a par exemple été démontré chez *Vibrio harveyi* que la sécrétion des sidérophores est réprimée par le *quorum sensing* (McRose *et al.*, 2018).

2.2. Voies d'acquisition du fer indépendantes des sidérophores

2.2.1. Hème, transferrine, lactoferrine et *ferric binding protein*

En plus de la production de sidérophores, d'autres systèmes d'acquisition du fer ferrique existent chez les bactéries, notamment celles pathogènes. Ils ne seront que brièvement décrits dans ce paragraphe, car ils n'ont pas été étudiés au cours de ce travail.

L'hème est une molécule contenant du fer et servant au transport de l'oxygène. Il s'agit également d'une source importante de fer pour certaines bactéries, notamment les pathogènes dont l'hème est produit par l'hôte (Tong and Guo, 2009). Ces organismes pathogènes sont capables d'acquérir le fer contenu par l'hème, soit en l'incorporant directement par des récepteurs et des transporteurs spécifiques, soit en sécrétant des hémophores, qui de la même manière que les sidérophores, sont capables de chélater l'hème présent dans le milieu extracellulaire puis de transporter le complexe formé jusqu'à des récepteurs spécifiques TonB-dépendants (Sandy and Butler, 2009; Stojiljkovic and Perkins-Balding, 2002; Wandersman and Stojiljkovic, 2000).

Comme avec l'hème, certaines bactéries pathogènes sont capables d'acquérir du fer via des protéines servant au transport du fer chez l'hôte, la transferrine ou la lactoferrine, par contact direct entre ces protéines et la surface du pathogène. Ce dernier produit des protéines de la membrane externe spécifiques à la lactoferrine et la transferrine, permettant leur transport jusqu'au cytoplasme (Ekins *et al.*, 2004; Sandy and Butler, 2009; Williams and Griffiths, 1992).

Chez les organismes didermes, que ce soit par le biais de sidérophores ou d'autres transporteurs tels que l'hème ou les transferrine, une fois que le fer atteint le périplasma, le métal est pris en charge par une *ferric binding protein* (FBP), l'amenant jusqu'à un récepteur de la membrane interne (Sandy and Butler, 2009). Un exemple de protéine périplasmique liant le fer est FbpA, particulièrement bien caractérisé chez *Neisseria gonorrhoeae*, mais également retrouvée chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, le modèle d'étude de ce travail de recherche. FbpA est associée à la transferrine en raison de leur structure similaire et du fait qu'elles assurent la même fonction, toutes deux transportent le fer sous forme Fe^{3+} d'un récepteur jusqu'à un autre (Parker Siburt *et al.*, 2012). FbpA est néanmoins également une PBP (évoquée dans le paragraphe 2.1.4) car elle partage une structure homologue et assure, là encore, la même fonction, de délivrer le fer à un transporteur ABC pour que le métal puisse traverser la membrane cytoplasmique (Parker Siburt *et al.*, 2012). Ainsi, une fois que le fer a traversé la membrane externe, il se lie à FbpA par un procédé

non réducteur. Un ion synergique est requis, tel que du phosphate ou du borate par exemple, afin de stabiliser la liaison avec le métal. L'énergie nécessaire est fournie par une protéine TonB et une fois le fer fixé, le complexe diffuse dans le périplasma jusqu'à être reconnu par un transporteur ABC, permettant au métal d'atteindre le cytoplasme (Mietzner *et al.*, 1998; Parker Siburt *et al.*, 2012).

2.2.2. Réduction du fer ferrique Fe³⁺

La réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ permet ainsi son assimilation par les microorganismes. Cette réduction peut se réaliser par voie abiotique : de manière photochimique impliquant la photolyse d'un sidérophore par exemple (Barbeau *et al.*, 2003), par échange d'électron avec des substances humiques (Jiang and Kappler, 2008) ou encore par le biais d'espèces soufrées (Yao and Millero, 1996). La réduction du fer peut également être réalisée par des microorganismes, par voie assimilatrice où dans ce cas la réduction du fer est suivie de son assimilation, ou par voie dissimilatrice où le fer n'est pas assimilé mais sert d'accepteur final d'électrons. Pour la voie assimilatrice, la réduction du fer complexé est réalisée par une ferric reductase. Les ferric réductases réduisent en général le Fe³⁺ en Fe²⁺ en utilisant le NADH ou le NADPH comme donneur d'électron. La réaction peut avoir lieu dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire après le transport du complexe. Ces enzymes peuvent être périplasmiques (chez *Legionella pneumophila*, *P. aeruginosa*), cytoplasmiques (chez *L. pneumophila*), extracellulaires (chez *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*) ou encore liées à la membrane (chez *E. coli*, *Spirillum itersonii*, *S. aureus*) (Schröder *et al.*, 2003). Un même organisme peut produire des ferric réductases dans plusieurs compartiments cellulaires. D'après les auteurs, ces protéines excrétées dans le milieu extracellulaire ne sont retrouvées que chez les organismes pathogènes où les cofacteurs circulent dans le milieu extracellulaire car ils sont produits par l'hôte. En effet, comme mentionné précédemment, la réduction du fer ferrique en fer ferreux nécessite un cofacteur, tel que le NAD(P)H ou encore le glutathione ou la flavine. Or ces composés ne sont pas excrétés par la cellule, empêchant la réduction du métal (Schröder *et al.*, 2003). Lorsque les cofacteurs sont présents et que la réduction du complexe ligand-fer a lieu, celle-ci débouche sur un complexe ligand-Fe²⁺. Le ligand a alors une affinité plus faible pour le métal, entraînant la libération de ce dernier qui peut alors être transporté vers l'intérieur de la cellule ou assimilé (Schröder *et al.*, 2003). Les ligands du fer peuvent être des sidérophores. Par conséquent, cela incombe aux organismes non pathogènes de tout de même devoir transporter le complexe sidérophore-fer jusqu'au cytoplasme ou périplasma ou au moins jusqu'à

leur membrane pour que cette réduction puisse avoir lieu. L'avantage est que sans produire de sidérophores, les cellules peuvent être capables d'acquérir du fer.

Certains microorganismes sont également capables de réduire le fer ferrique, dans une réaction dissimilatrice, c'est-à-dire sans assimiler ensuite le métal, en utilisant des donneurs d'électrons tels que l'acétate, le lactate ou H_2 (Melton *et al.*, 2014). Dans ce cas, il s'agit par exemple de bactéries ferri-réductrices qui utilisent le fer comme accepteur d'électron lors de la respiration anaérobie. Certains organismes nécessitent un contact direct avec le fer, comme c'est par exemple le cas pour *Shewanella oneidensis* MR-1 qui emploie des cytochromes associés à la membrane lui permettant de lier le fer et de le réduire (Melton *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2009). D'autres mécanismes permettent de réduire le fer jusqu'à quelques centimètres autour de la cellule (Melton *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2010). Dans ce cas, les organismes sécrètent des molécules, des flavines par exemple, capables de transporter des électrons jusqu'à la source de fer (von Canstein *et al.*, 2008). Il a même été démontré que certaines cellules en biofilm sont capables de réduire le fer à distance, avec des cofacteurs redox actifs présents dans le biofilm qui permettent aux électrons d'atteindre le fer en plusieurs étapes, décrites comme des « bonds d'électrons » par les auteurs (Melton *et al.*, 2014; Snider *et al.*, 2012). Le fer ainsi réduit par ces organismes n'étant pas assimilé et sous forme Fe^{2+} , il peut alors être utilisé par d'autres organismes vivant dans un même environnement (Schröder *et al.*, 2003).

2.2.3. L'acquisition du fer ferreux

Le fer est retrouvé abondamment sous la forme ferreuse, Fe^{2+} , en condition d'anaérobie ou à faible pH, où le métal existe sous forme libre, pouvant être directement pris en charge par des transporteurs, sans passer par l'intermédiaire d'un sidérophore ou d'autres ligands. Ces transporteurs sont différents de ceux du fer ferrique en raison des propriétés chimiques différentes entre les deux formes (Lau *et al.*, 2016; Silva and Williams, 2001). Ainsi, sous forme Fe^{2+} , le fer diffuse à travers la membrane externe via des porines, qui sont des protéines formant un canal et permettant le passage dans les deux sens (export et import) d'ions et de petites molécules hydrophiles. Ces protéines ne sont retrouvées que chez les bactéries possédant deux membranes. Elles permettent donc un passage facilité des ions ferreux vers l'espace périplasmique où un transport actif est alors nécessaire pour que l'ion atteigne le cytoplasme. Une fois dans le périplasma, le métal peut atteindre le cytoplasme à l'aide de plusieurs transporteurs (Ge and Sun, 2012), tels que

MntH, ZupT, YfeABCD, FutABC, EfeUOB and Feo (Cao *et al.*, 2007; Courville *et al.*, 2004; Grass *et al.*, 2005; Große *et al.*, 2006; Haemig *et al.*, 2010; Kammler *et al.*, 1993; Katoh *et al.*, 2001b, 2001a; Lau *et al.*, 2016; Makui *et al.*, 2000; Koropatkin *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2007). Parmi tous ces transporteurs, seul Feo est dédié au fer et largement distribué chez des organismes pathogènes et non pathogènes (Lau *et al.*, 2016).

2.3. Stratégies d'acquisition du fer

En simplifiant, l'acquisition du fer peut être classée en deux stratégies distinctes : les organismes produisant des sidérophores et ceux établissant un contact direct avec le fer. Une étude de modélisation s'est intéressée à savoir quelle stratégie est la plus efficace, dans des conditions différentes, notamment en modifiant la taille de la source de fer (Leventhal *et al.*, 2019). Les auteurs ont comparé l'efficacité d'assimilation d'une cellule sécrétant des sidérophores à celle d'une cellule acquérant le fer par contact direct. Les paragraphes suivants 2.3.1, 2.3.2 et 2.3.3 se basent en grande partie sur cette étude et visent à étudier l'efficacité des sidérophores en conditions naturelles. Il est à noter que dans ces paragraphes, le terme de « particule » employé pour désigner la source de fer ne sous-entend pas que le fer est sous forme particulaire ($\geq 0,2\mu\text{m}$). Il ne s'agit ici que d'une accommodation utilisée pour désigner la source de fer.

2.3.1. Contact direct entre la cellule et la source de fer

Les cellules ne sécrétant pas de sidérophore nécessitent un contact direct avec la source de fer, qu'elles récupèrent alors via des sidérophores amphiphiles (qui restent accrochés à la membrane sans diffuser dans le milieu extracellulaire) ou des récepteurs. Ces cellules sont par conséquent dépendantes de la diffusion des particules de fer, plus cette dernière est grande, plus sa diffusion est lente, comme expliqué en **Figure I.13**. Une fois que le contact est établi entre la particule et la cellule, le fer doit être dissous à l'aide de ligands de surface ou de réductase par exemple (Melton *et al.*, 2014; Schwertmann *et al.*, 1999). D'après les modélisations réalisées par Leventhal et ses collègues, à une concentration en fer comprise entre 0,1 et 1 nmol.L^{-1} , et une particule d'une taille d'environ 1 nm, une cellule ne produisant pas de sidérophore nécessiterait plusieurs jours afin de rencontrer, dissoudre et acquérir suffisamment de fer pour pouvoir se diviser. Pour une particule d'une taille de 10 nm, le temps nécessaire se compterait en mois (Leventhal *et al.*, 2019). D'après

les auteurs, cette durée très élevée s'explique par le fait que la diffusion des particules de fer est lente, réduisant le taux de rencontre entre le fer et la cellule. Ensuite, plus la particule sera de grande taille, plus sa dissolution sera lente en raison d'un ratio surface-volume plus faible (Leventhal *et al.*, 2019). Ce temps particulièrement élevé peut être réduit, par la sécrétion de sidérophores, qui permet d'augmenter la vitesse de diffusion et l'assimilation de la source de fer par les cellules (Leventhal *et al.*, 2019).

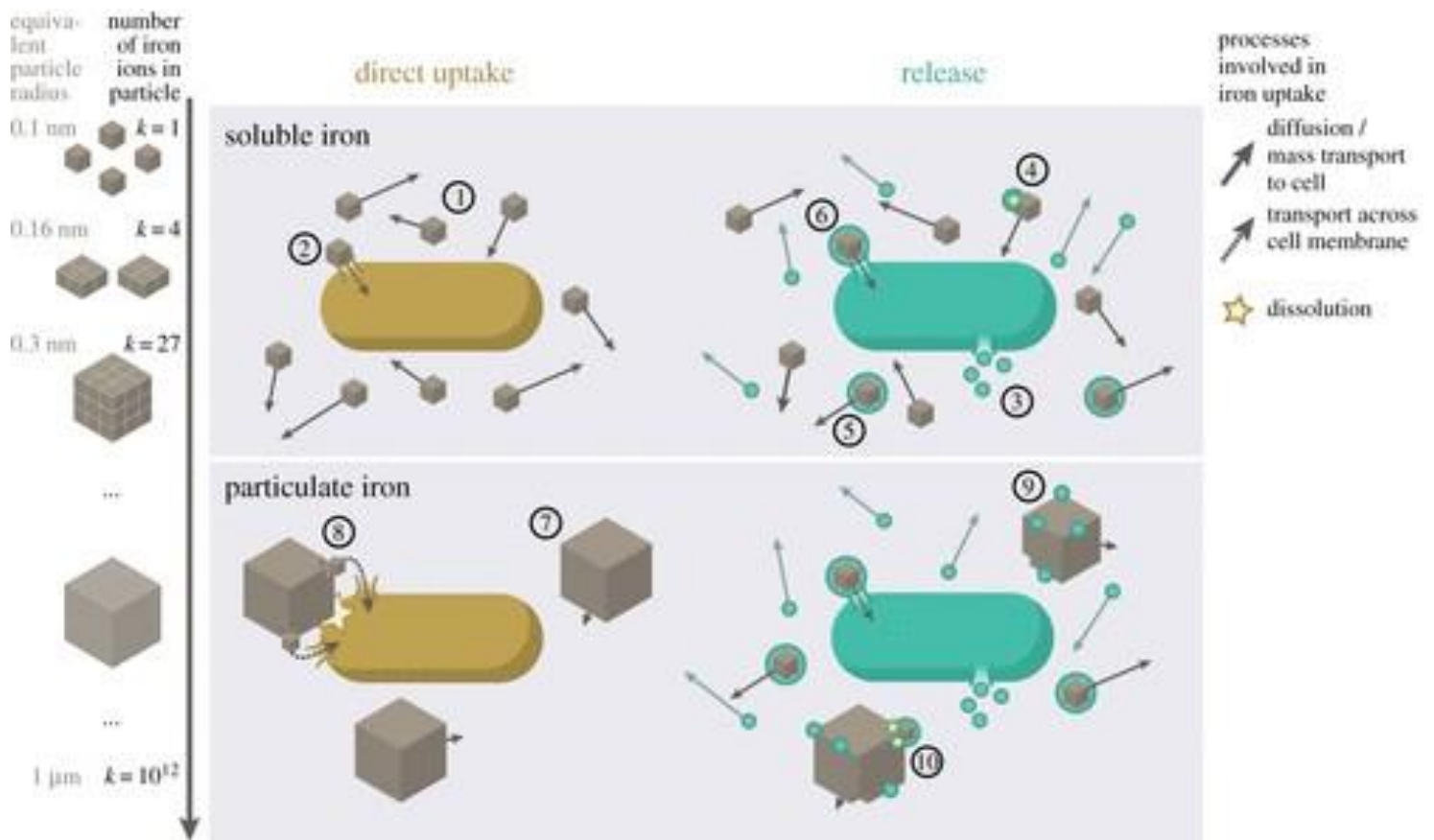


Figure I.13. Stratégies d’acquisition du fer par production de sidérophore ou contact direct.

La cellule acquérant le fer par contact direct est représentée en jaune et celle produisant des sidérophores en vert. Dans la partie supérieure le fer est sous forme dissoute et dans la partie inférieure, particulaire. D’après la description faite par les auteurs, lorsqu’il est sous forme dissoute, le fer diffuse librement (1) et les cellules l’acquièrent par un contact direct (2). A l’inverse, les cellules produisant des sidérophores (3) qui diffusent dans le milieu extracellulaire jusqu’à rencontrer du fer (4). Le complexe diffuse alors également librement (5) et certains peuvent alors être récupérés par les cellules (6). Sous forme particulaire (7), les cellules ne sécrétant pas de sidérophore doivent d’abord rencontrer la particule de fer afin de pouvoir en extraire les ions (8). Dans le cas d’une cellule produisant des sidérophores, ces derniers se lient à la surface de la particule de fer (9) et peuvent récupérer des ions ferriques (10). Adapté de (Leventhal et al., 2019).

2.3.2. Sécrétion de sidérophores

La sécrétion de sidérophores présente de nombreux avantages par rapport à un contact direct entre une cellule et une particule de fer, (**Figure I.13**). Tout d'abord lorsque leur taille est inférieure à celle des particules, cela leur confère ainsi un coefficient de diffusion plus élevé. De plus, la production de sidérophores permet de solubiliser le fer à partir de plusieurs sources simultanément et non pas de se limiter à un contact direct avec une seule (Leventhal *et al.*, 2019). L'efficacité des sidérophores dépend néanmoins de la taille des particules. Dans le cas d'une grande particule, de plus de 10 nm, la sécrétion de sidérophore est bien plus efficace qu'un contact direct. Toujours d'après les mêmes auteurs, une fois produits, les sidérophores vont rapidement diffuser jusqu'à quelques centimètres et atteindre la particule, qui elle diffuse bien moins rapidement. Les sidérophores vont alors dissoudre le fer de la particule autour de la cellule et certains d'entre eux vont retourner vers cette dernière qui pourra alors acquérir le métal. Ainsi, la production de sidérophores permet à la cellule d'acquérir suffisamment de fer pour se diviser en quelques semaines, là où une cellule n'en produisant pas aurait besoin d'environ un an. L'intérêt des sidérophores est en revanche limité lorsque les particules de fer sont de petite taille (< 10 nm). Les auteurs expliquent que dans ce cas, le fait que le sidérophore doive diffuser jusqu'au fer rajoute une étape supplémentaire par rapport à un contact direct entre la cellule et le fer. De plus, de par sa taille plus grande, le complexe sidérophore-fer diffuse moins rapidement que le fer seul, limitant là aussi l'intérêt du sidérophore (Leventhal *et al.*, 2019).

Pour conclure, la taille des particules de fer influe considérablement l'efficacité d'acquisition du métal par les bactéries. Les sidérophores sont une technique très efficace d'assimilation du fer pour les cellules lorsque la taille des particules est supérieure à 10 nm. A l'inverse, lorsque ces dernières ont une taille inférieure à 10 nm, la sécrétion de sidérophores ralentit l'acquisition du fer, et un contact direct entre les cellules et le fer est plus efficace.

2.3.3. Les sidérophores doivent être sécrétés en très grande quantité pour être efficaces

La condition nécessaire pour que la production de sidérophore soit efficace est que la cellule en produise un très grand nombre. En effet, les mêmes auteurs estiment que pour une concentration en fer de $0,1 \text{ nmol.L}^{-1}$ et une particule de fer de 100 nm, selon son taux de production de sidérophore,

une bactérie peut sécréter entre 28000 et 180000 sidérophores avant de récupérer un ion ferrique (Leventhal *et al.*, 2019). Par conséquent, d'après les auteurs, l'intérêt des sidérophores est basé sur une coopération entre les cellules car la production de ces molécules est coûteuse énergétiquement.

Cette étude de modélisation permet de comparer l'efficacité dans l'acquisition du fer entre un contact direct et la sécrétion de sidérophores. Plus la taille de la particule de fer est grosse, plus l'utilisation de sidérophore sera adaptée. En milieu naturel, les sources de fer étant souvent sous forme colloïdale ou particulaire (poussières transportées par les vents ou lors des phénomènes d'*upwelling* qui font remonter à la surface le fer sédimentant), la production de sidérophore est probablement une technique efficace pour acquérir le fer, expliquant pourquoi ce mécanisme est une stratégie répandue chez les organismes marins.

3. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

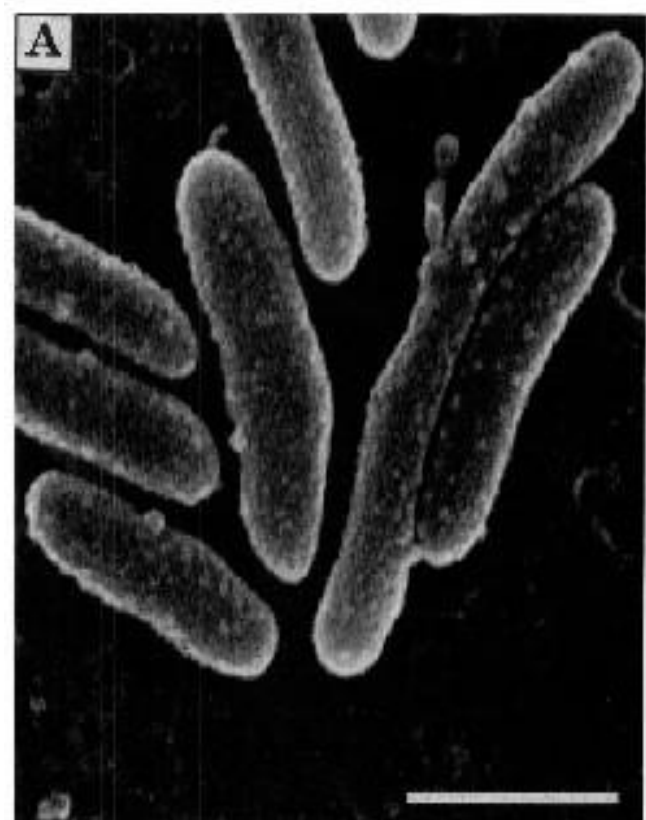


Figure I.14. Image de microscopie électronique de *Mh* SP17 lors d'une croissance sur acétate.

La barre représente 1 μm . Adapté de (Gauthier *et al.*, 1992).

3.1. Le genre *Marinobacter*

Les bactéries du genre *Marinobacter* appartiennent à la famille des *Alteromonadaceae*, à l'ordre des *Alteromonadales* et à la classe des *Gammaproteobacteria*. Ce genre bactérien compte 57 espèces décrites à ce jour (base de données LPSN, *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, <https://lpsn.dsmz.de>, Parte, 2018) et est largement répandu dans tous les environnements marins, comme par exemple l'eau de mer de surface (Liu *et al.*, 2018), à proximité de raffineries de pétrole (Gauthier *et al.*, 1992), ou encore dans des sédiments d'Antarctique (Montes *et al.*, 2008), et même dans des lacs salés (Zhong *et al.*, 2015). Ce sont des bactéries didermes, halotolérantes et plusieurs espèces de *Marinobacter* sont hydrocarbonoclastes, c'est à dire qu'elles sont capables de dégrader les hydrocarbures (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Teramoto *et al.*, 2009). Ces espèces hydrocarbonoclastes de *Marinobacter* peuvent utiliser les hydrocarbures et leurs dérivés oxydés, les lipides, ainsi que de petits acides organiques comme substrats. C'est notamment pour cela que dans les environnements pollués par du pétrole, la proportion des séquences détectées de *Marinobacter* est élevée (Bonin *et al.*, 2015).

3.2. Les caractéristiques de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

3.2.1. Description de l'espèce

Marinobacter hydrocarbonoclasticus (*Mh*), organisme modèle du laboratoire, a un potentiel de dégradation des hydrocarbures en utilisant les alcanes comme source de carbone. En raison de son implication dans la dégradation et le recyclage du carbone organique marin, *Mh* est un modèle adapté pour étudier l'acquisition du fer en milieu marin. Cet organisme est d'ailleurs au centre de nombreuses recherches menées au laboratoire depuis le début des années 2000. La souche *Mh* SP17 a été isolée en 1992 à proximité d'une raffinerie de pétrole (Gauthier *et al.*, 1992). C'est la souche type du genre. Elle est décrite comme bactérie Gram-négative (diderme), halotolérante (se développe jusqu'à une concentration de 3,5 mol.L⁻¹ de NaCl), ayant un métabolisme aérobie, mais capable d'utiliser le nitrate comme accepteur d'électron en condition d'anaérobie car elle est dénitrifiante non fermentative, motile avec un unique flagelle polaire, ne formant pas de spore et sous forme de bacille (**Figure I.14**). Cette souche possède une croissance optimale à une température de 32°C, à un pH compris entre 7 et 7,5 et à une concentration en NaCl d'environ 0,6 mol.L⁻¹. *Mh* SP17 est utilisée comme modèle d'étude de dégradation des alcanes en formant des biofilms à l'interface eau-hexadécane. *Mh* VT8 est une autre souche de *M. hydrocarbonoclasticus* qui est utilisée, entre

autres, pour l'étude de la biosynthèse de lipides neutres à intérêt industriel (Lenneman *et al.*, 2013; Wahlen *et al.*, 2009). Cette souche, tout d'abord décrite comme la souche type de l'espèce *M. aquaeolei* (Huu *et al.*, 1999) a été ensuite réassignée à l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus* (Márquez and Ventosa, 2005). *Mh* SP17 *et Mh* VT8 sont capables de se développer sous forme planctonique ou de biofilm.

a. Mécanismes de formation des biofilms

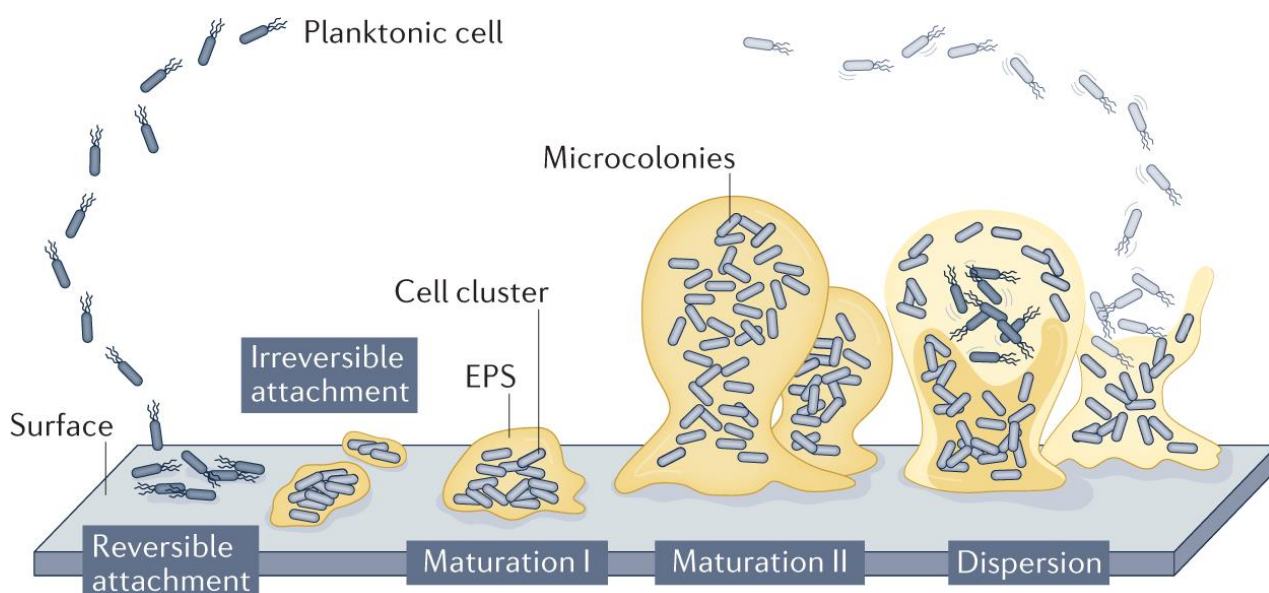


Figure I.15. Le développement en 5 étapes d'un biofilm.

Tout d'abord une cellule établit un contact avec un substrat et adhère de manière réversible à celui-ci via son extrémité (son pôle) ou par un flagelle (étape 1). Chez *P. aeruginosa*, le passage d'un attachement réversible à un attachement irréversible se traduit, entre autres, par un attachement longitudinal de la cellule et non plus par un pôle (étape 2). S'en suivent alors une modification d'expression de gènes (notamment ceux liés au flagelle) et la production d'une matrice extracellulaire. Les deux étapes suivantes correspondent à la maturation du biofilm. Pour la maturation I, les cellules s'entassent entre elles, en formant une couche mince entourée de matrice (étape 3). A l'étape de maturation II, les cellules forment des microcolonies (étape 4). La dernière étape est la dispersion du biofilm où les cellules réduisent leur production de composants de la matrice et dégradent même cette dernière (étape 5). Lors de cette dernière étape, les cellules deviennent de nouveau mobiles, pouvant coloniser un nouveau substrat (Sauer *et al.*, 2022).

La croissance en biofilm est caractérisée depuis de nombreuses années. Les différentes étapes de la formation du biofilm ont notamment été décrites chez *P. aeruginosa* et servent de base pour décrire tous les biofilms (Sauer *et al.*, 2002, 2022; Petrova and Sauer, 2009). Il s'agit d'un modèle en 5 étapes, dont chacune d'entre elles est détaillée en **Figure I.15**. Ce modèle sert de référence pour la description de tous les biofilms. Il a toutefois été discuté du fait qu'il puisse ne pas être représentatif de tous les biofilms retrouvés dans la nature car il est basé sur l'étude d'un organisme modèle *P. aeruginosa*, bien que ce modèle ait été adapté, notamment pour décrire les biofilms formés par d'autres organismes modèles, *S. aureus* (Moormeier and Bayles, 2017) ou encore *B. subtilis* (Vlamakis *et al.*, 2013).

Un modèle alternatif en trois étapes a été proposé : l'agrégation où les cellules s'agrègent entre elles ou s'attachent à la surface qu'elles sont en train de coloniser (étape 1). Une fois adhérentes au support, des colonies se forment, soit par croissance des cellules déjà présentes dans le biofilm, soit par des cellules autour qui vont entrer dans le biofilm (étape 2). Enfin, le biofilm va se désagréger soit par des cellules isolées ou des agrégats de cellules qui sortent du biofilm (étape 3) (Sauer *et al.*, 2022).

b. La formation de biofilm est une stratégie efficace pour l'assimilation de composés organiques hydrophobes (HOC)

Dans les environnements marins, la formation de biofilms est une stratégie particulièrement efficace pour la dégradation de composés hydrophobes (HOC pour *hydrophobic organic compound*) (Sivadon *et al.*, 2019). Ainsi, une fois un substrat immergé, sa colonisation par des microorganismes est extrêmement rapide (en quelques secondes). Ces derniers produisent des molécules (protéines et glycoprotéines majoritairement) qui s'adsorbent sur le substrat, formant un film avant que les cellules n'y adhèrent. Cela permet notamment de modifier les propriétés du substrat en homogénéisant sa surface. L'avantage est de faciliter l'adhésion de différentes bactéries (Dang and Lovell, 2015). Par la suite, le contact avec le substrat s'établit par diffusion ou par nage des bactéries. L'adhésion varie selon les organismes mais nécessite généralement la sécrétion de protéines (Chagnot *et al.*, 2013). Pour les organismes capables de former un biofilm sur un support nutritif, cela implique que les cellules sont capables de reconnaître leur substrat, de par son hydrophobicité, sa charge ou encore sa rugosité (Sivadon *et al.*, 2019). Une fois les cellules adhérentes, elles vont produire des enzymes extracellulaires afin de pouvoir dissoudre le substrat. En effet, ce dernier ne

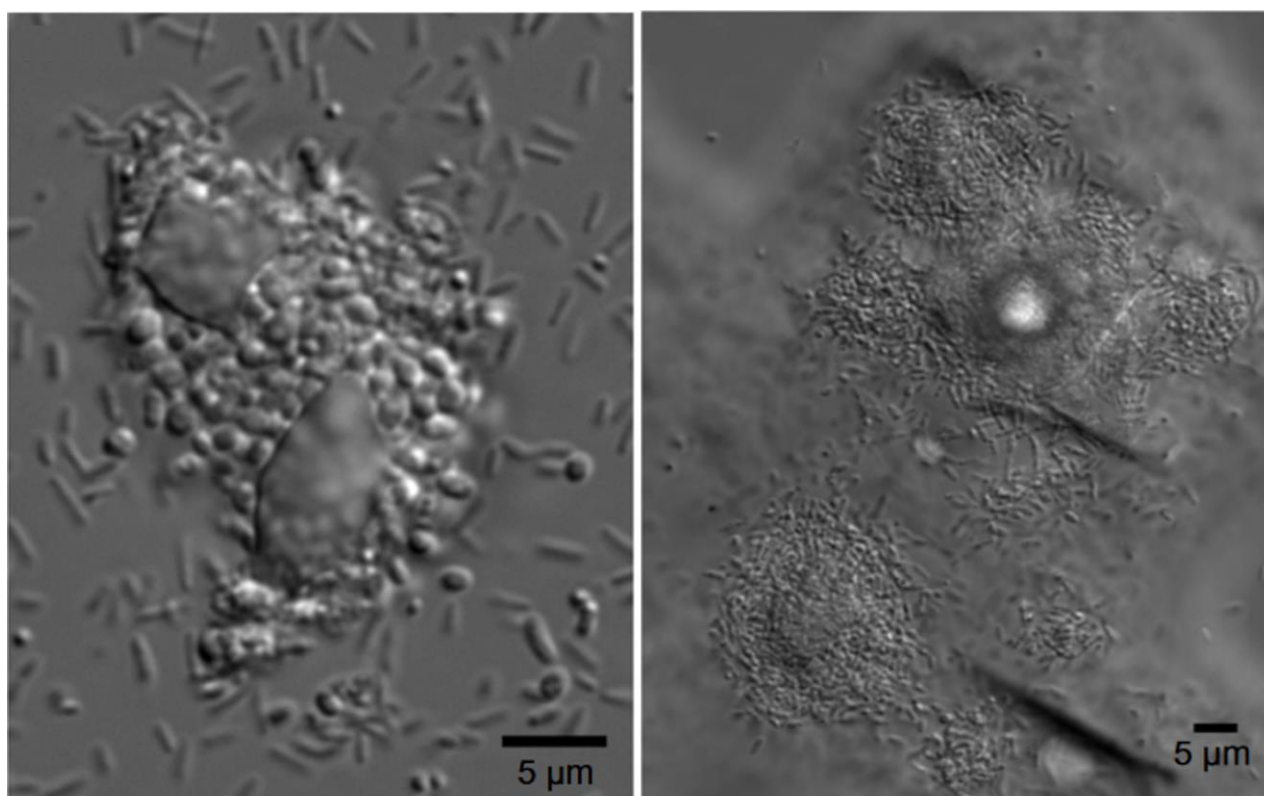


Figure I.16. Images de biofilms matures de *Mh* SP17.

Image de microscopie à contraste interférentiel différentiel d'un biofilm mature de *Mh* SP17 sur *n*-hexadécane (à gauche) et trioléine (à droite). La barre représente 5 µm.

Adapté de (Mounier *et al.*, 2014).

pouvant pas être transporté jusqu'au cytoplasme de la cellule par des transporteurs en raison de sa taille, il doit être dégradé en plus petites molécules dans le milieu extracellulaire. Il est également nécessaire que le composé soit solubilisé pour pouvoir être assimilé par les cellules. La matrice du biofilm joue alors un rôle essentiel dans l'acquisition du substrat, en maintenant les cellules en contact direct avec celui-ci. De plus, les composants du biofilm sécrétés par les cellules (polymères amphiphiles, protéines ou encore polysaccharides) peuvent aider les cellules à dégrader les HOC, soit en favorisant le transfert de masse de la phase organique vers la phase aqueuse (Sivadon *et al.*, 2019) ou encore comme par exemple chez *Mh* où la sécrétion d'une protéine dans la matrice du biofilm est nécessaire pour l'assimilation des alcanes (Ennouri *et al.*, 2017). Enfin, la proximité entre les cellules et le substrat permet de maintenir une faible distance entre les facteurs de solubilisation et le substrat solubilisé (Sivadon *et al.*, 2019).

3.2.2. Les biofilms de *Mh* SP17

Les mécanismes d'adhésion de *Mh* SP17 sur hexadécane ont été étudiés au laboratoire, notamment en modélisant la formation de biofilm à l'interface eau-substrat à l'aide d'un tensiomètre à goutte dynamique (Klein *et al.*, 2010). Cet appareil permet d'analyser les altérations mécaniques de l'interface eau-alcane lors de l'adsorption des cellules. Comme pour de nombreux biofilms sur composé hydrophobe, *Mh* SP17 atteint son substrat par simple diffusion puis produit des composés aux propriétés tensio-actives, formant un film qui diminue la tension interfaciale (Klein *et al.*, 2010). Les auteurs se sont aperçus que la nature du substrat n'influe pas sur la production de ces composés. En effet, cette interaction est observée aussi bien sur un substrat métabolisable que non métabolisable. En revanche pour les stades les plus avancés du biofilm, la nature métabolisable ou non du substrat influe sur le développement du biofilm car des amas de cellules n'ont été observés que sur le substrat métabolisable (Klein *et al.*, 2010). Les biofilms de *Mh* SP17 se développant à l'interface eau-substrat contiennent quelques particularités (**Figure I.16**). L'hydrocarbure sert à la fois de support et de substrat. À l'inverse des biofilms sur une surface inerte où le donneur et l'accepteur d'électron proviennent tous deux de la phase aqueuse, dans ce type de biofilms, le donneur d'électron est fourni par le substrat et l'accepteur d'électrons par la phase aqueuse. Par conséquent, deux gradients opposés sont présents dans ce type de biofilms et ce sont eux qui contrôleraient le développement du biofilm (Sivadon and Grimaud, 2017). Les étapes de formation et de développement du biofilm chez *Mh* SP17 sont représentées dans la **Figure I.17**.

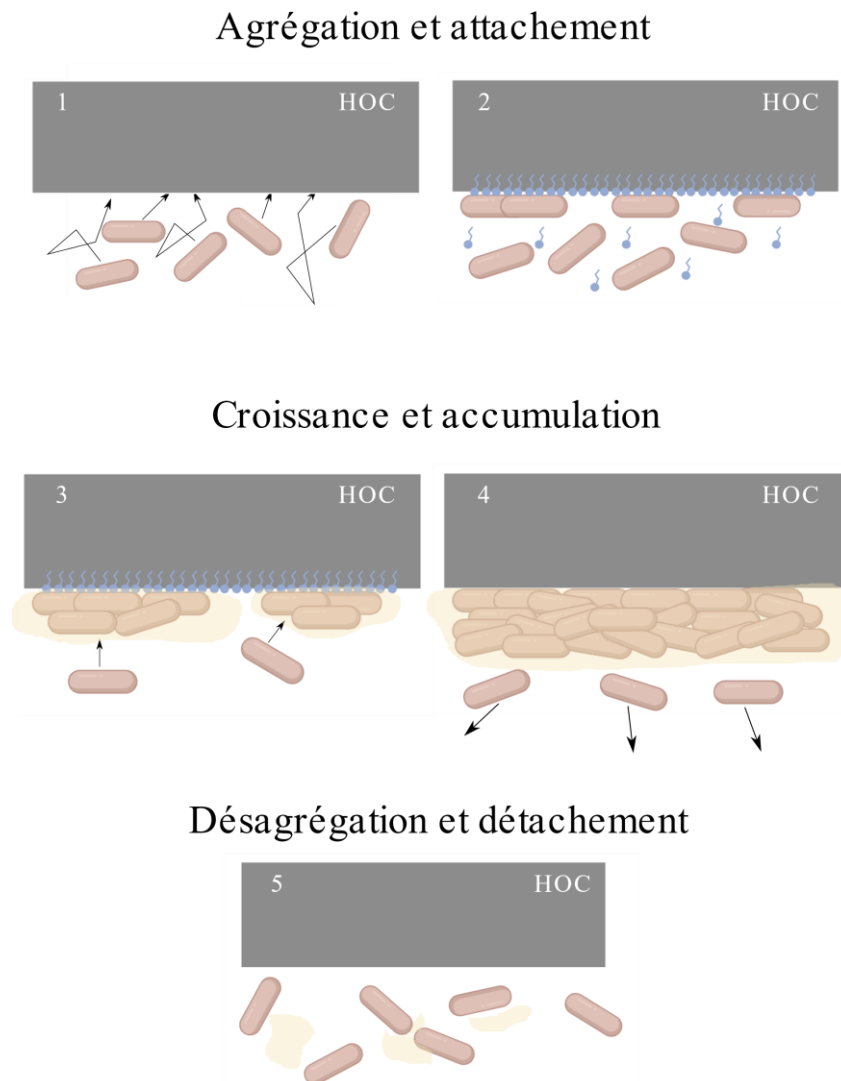


Figure I.17. Modèle de la formation de biofilm de *Mh* SP17 sur composé organique hydrophobe.

Durant la première étape, les cellules atteignent l'interface avec le substrat par diffusion brownienne (1). Elles libèrent ensuite des composés aux propriétés tensio-actives (en bleu), formant un film qui diminue la tension interfaciale (2). Les cellules s'attachent au substrat et commencent à s'agréger entre elles pour former les prémices du biofilm. A la deuxième étape, des microcolonies se créent suite au recrutement de nouvelles cellules et/ou à la division des cellules attachées (3). Les cellules commencent à produire une matrice (en jaune) structurant le biofilm. Le développement du biofilm lui permet alors de recouvrir la totalité du substrat (4). Quelques cellules peuvent commencer à se détacher du biofilm. Enfin, la dernière étape est la désagrégation du biofilm (5).

Les biofilms de *Mh* SP17 sont assez fins, d'une épaisseur d'environ 20 μm . Dans les premiers stades de développement, le biofilm n'est pas homogène car il ne recouvre pas toute la surface du substrat. Après 24h de croissance, seules des cellules adhérentes sont présentes et ce n'est qu'après 48h que les premières microcolonies se forment. A ce stade il n'y a pas encore d'évidence indiquant si ces microcolonies sont formées d'un amas de cellules migrant à l'interface eau-substrat et/ou si les cellules adhérentes se sont divisées. Le développement du biofilm se poursuit de manière hétérogène avec des microcolonies différentes en termes de taille et d'épaisseur. Néanmoins, après 120h, l'expansion de ces microcolonies permet aux cellules de recouvrir la totalité de l'eicosane. Au sein du laboratoire, il a été observé que le biofilm se désagrège au bout d'un certain temps et ce, quel que soit le substrat (Mounier, 2013).

Chez *Mh* SP17, une étude menée par Klein (2008) a démontré que la formation de biofilm est nécessaire pour la dégradation du substrat et donc par conséquent pour la croissance cellulaire (Klein *et al.*, 2008). Les mêmes auteurs ont également indiqué qu'une forte agitation conduisait à une quantité de biofilm plus faible et une dégradation de l'hexadécane plus lente que lorsqu'une agitation plus faible était appliquée (Klein *et al.*, 2008). Il a également été mis en avant le fait que les cellules planctoniques présentes dans le milieu proviennent uniquement d'un détachement du biofilm, indiquant que la croissance bactérienne n'a lieu que dans le biofilm (Klein *et al.*, 2008). Les mêmes auteurs ont aussi démontré que *Mh* SP17 forme préférentiellement des biofilms sur les substrats qu'elle peut métaboliser. En ajoutant de l'acétate comme source de carbone, la quantité de biofilm formé sur des substances inertes telles que le verre ou le plastique est très faible voire inexistante en comparaison des substrats qu'elle peut métaboliser (Klein *et al.*, 2008).

3.3. L'acquisition du fer dans le genre *Marinobacter*

Une étude menée par Amin en 2012 s'est intéressée aux systèmes de transports présents au sein du genre *Marinobacter*. En se basant sur ces travaux, ce paragraphe a pour but de résumer ces transporteurs.

L'étude menée par Amin et ses collègues en 2012 indique que quatre sidérophores au total sont produits au sein du genre *Marinobacter* : la vibrioferrine, la pétrobactine, la ferrioxamine et la marinobactine (Amin *et al.*, 2012). Les trois premiers contiennent un groupement citrate, les rendant ainsi photoréactifs. Cette même étude s'est également intéressée à savoir quels sidérophores, endogènes et exogènes, peuvent être utilisés par les membres du genre *Marinobacter*. D'après les auteurs, chaque espèce ne produit qu'un seul sidérophore, et il existe une corrélation entre le sidérophore produit et la phylogénie de ces espèces (en se basant sur des séquences ARN ribosomique 16S) (Amin *et al.*, 2012). *Mh* SP17 partage avec *Mh* VT8 (appelée *M. aquaeolei* dans cet article) la pétrobactine.

En plus de la production de sidérophore pour une grande partie des membres du genre *Marinobacter*, ces derniers sont également capables d'utiliser des sidérophores exogènes. Toujours dans l'étude menée par Amin (2012), les auteurs se sont intéressés aux génomes de ces organismes. Le système permettant le transport du citrate, FecABCD d'*E. coli* n'est uniquement retrouvé que chez *M. algicola* DG893. L'acquisition de sidérophores hydroxamate, correspondant à FhuABCD d'*E. coli*, permettant à cette dernière d'utiliser le ferrichrome, est retrouvé chez *M. algicola* DG893, *M. adhaerens* HP15 et *Mh* VT8. Également deux autres récepteurs TonB-dépendants de la membrane externe ont été retrouvés, LutA et FoxA impliqués respectivement dans l'acquisition de l'aérobactine et de la ferrioxamine et retrouvés chez *M. algicola* DG893 et *M. adhaerens* HP15 à la fois pour LutA et FoxA (Amin *et al.*, 2012).

Toujours dans l'étude menée par Amin (2012), il est mentionné qu'une voie de transport du fer, indépendante de l'utilisation de sidérophore, le système FbpABC est retrouvée dans tous les génomes. Aucun transport direct du fer ferreux, de type FeoAB de *V. cholera* et *E. coli* n'a été retrouvé. Les auteurs ont également remarqué la présence de boîte Fur à proximité des gènes de biosynthèse de la vibrioferrine, pétrobactine et citrate, suggérant leur régulation par Fur. En revanche, ils n'ont pas trouvé de boîte Fur concernant le transport du fer ferrique par FbpABC, alors que ces transporteurs ont déjà été décrits comme régulés par Fur (Amin *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 1996; Mey *et al.*, 2005).

L'étude menée par Amin (2012) a permis de mettre en avant tous les transports potentiels du fer au sein du genre *Marinobacter*. *Mh* SP17 produit donc la pétrobactine et possède également le système FbpABC, qui est une voie de transport du fer indépendante de l'utilisation de sidérophores. En revanche, *Mh* SP17 semble ne pas pouvoir utiliser de sidérophores exogènes. Il est également indiqué que la pétrobactine puisse être sous le contrôle du régulateur Fur car il est mentionné par les auteurs que chez *Mh* VT8 une boîte Fur serait située en amont des gènes homologues à *asbA*, *asbB*, *asbC*, *asbD*, *asbE* et *asbF*, suggérant que chez *Mh* SP17, une régulation par la protéine Fur pourrait également être présente. Bien que la séquence de la boîte Fur ne soit pas donnée dans l'étude menée par Amin (2012), il est mentionné que la séquence a été identifiée chez *M. algicola* DG893 et retrouvée à proximité de la vibrioferrine. Un article publié dans *BioMetals* indique qu'une séquence de 19 pb (TATAATTTAAATCTTAATC) retrouvée en amont de l'opéron de biosynthèse de la vibrioferrine pourrait être la séquence d'une boîte Fur (Barker *et al.*, 2015). Cette séquence n'est pas retrouvée chez *Mh* SP17.

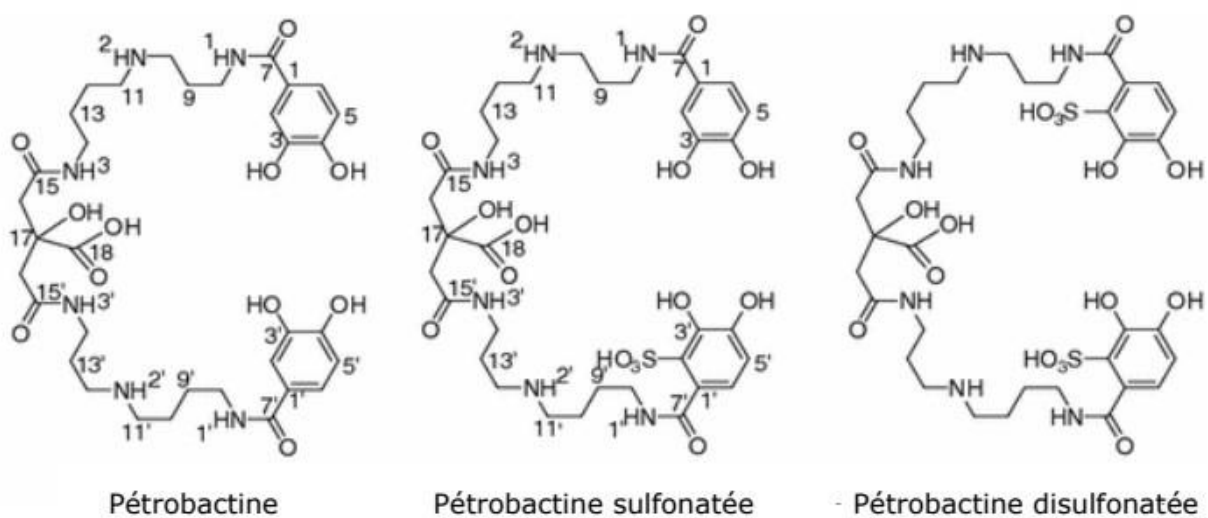


Figure I.18. Structures des différentes formes de la pétrobactine.

Adapté de (Homann *et al.*, 2009).

4. La pétrobactine

La pétrobactine est un sidérophore retrouvé chez différentes espèces, telles que *Mh* (Barbeau *et al.*, 2002), *B. anthracis* (Koppisch *et al.*, 2005), ou encore *Alteromonas macleodii* (Manck *et al.*, 2021). Une étude a démontré que la voie de biosynthèse de la pétrobactine, ou d'un dérivé proche, est retrouvée chez approximativement 2% des cellules procaryotiques de l'Atlantique Nord (Gärdes *et al.*, 2013; Manck *et al.*, 2021). Par conséquent, il n'est pas étonnant que la pétrobactine soit directement détectée dans des échantillons d'eau de mer (Manck *et al.*, 2021), soulignant son importance dans l'acquisition du fer.

4.1. Généralités

La pétrobactine, présentée en **Figure I.18**, est composée de deux groupements catécholates et d'un groupement acide α -hydroxycarboxylate (Barbeau *et al.*, 2002) et permet à *Mh* d'acquérir le fer dans le milieu extérieur en formant un complexe 1:1 avec le fer (III). C'est à ce jour le seul sidérophore connu produit par *Mh*. Les voies de biosynthèse et les systèmes de transport de la pétrobactine ont été élucidés chez *B. anthracis* (Koppisch *et al.*, 2005). À la différence de *B. anthracis*, plusieurs formes de pétrobactine ont été trouvées chez *Mh* VT8 et SP17 (**Figure I.18**). Il en existe trois chez *Mh* VT8, la pétrobactine disulfonatée, la pétrobactine sulfonatée et la pétrobactine (Homann *et al.*, 2009). En plus de la pétrobactine, seule la forme sulfonatée a été décrite chez *Mh* SP17 (Hickford *et al.*, 2004). D'après ces auteurs, le rôle de la sulfonation serait d'augmenter la solubilité du sidérophore ainsi que de protéger le noyau catéchol contre l'oxydation. Une autre possibilité, bien que non documentée, pourrait être que la sulfonation rende la pétrobactine spécifique à *Mh*. Ainsi, la pétrobactine sulfonatée ne pourrait plus être utilisée par les autres bactéries. En effet, de nombreuses bactéries sont capables d'utiliser des sidérophores exogènes. La sulfonation pourrait empêcher ce phénomène car les récepteurs ne reconnaîtraient pas la forme sulfonatée et ainsi éviter à *Mh* une perte d'énergie inutile.

Un sidérophore ayant une structure analogue à la pétrobactine a été décrit, la rhodopétrobactine (A et B), produite par *Rhodopseudomonas palustris*, une bactérie pourpre non sulfureuse (Baars *et al.*, 2018). Le site fixateur du fer est identique chez les deux sidérophores, la différence se situe au

niveau des molécules de spermidine qui sont remplacées par des groupements de 4,4'-diaminodibutylamine chez la rhodopérobactine dont l'un (pour la rhodopérobactine A) ou les deux (pour la rhodopérobactine B) groupements sont acétylés au niveau de l'amine centrale (Baars *et al.*, 2018).

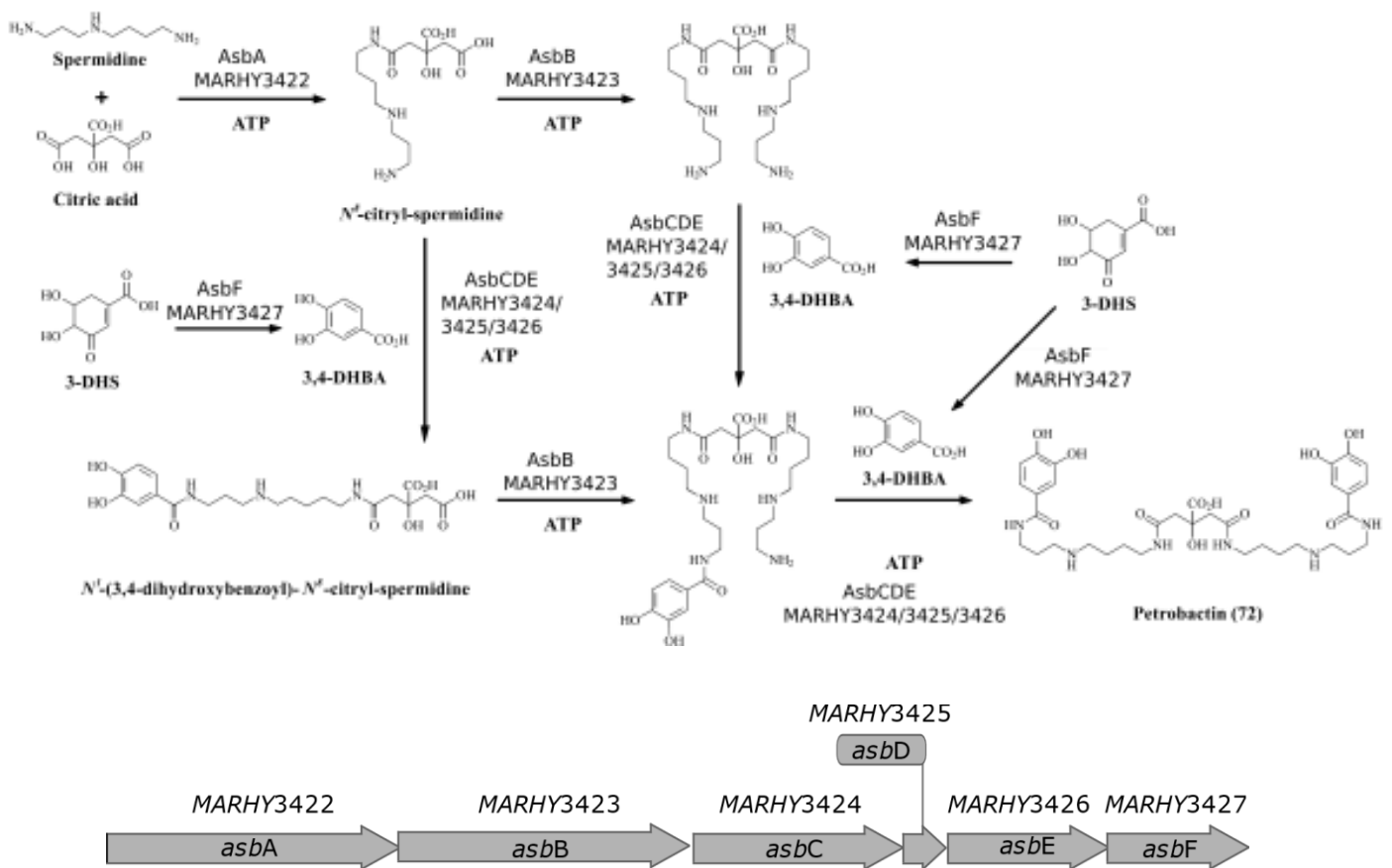


Figure I.19. Schéma de la biosynthèse de la pétrobactine et opéron de biosynthèse de la pétrobactine chez *Mh*.

En haut : Réactions et protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de la pétrobactine.

En bas : Gènes chez *B. anthracis* impliqués dans la voie de biosynthèse de la pétrobactine. Les gènes homologues chez *Mh* JM1 sont indiqués au-dessus.

Adapté de (Chen *et al.*, 2019).

4.2. La biosynthèse de la pétrobactine

Chez *B. anthracis*, six gènes, *asbA-F*, regroupés en un opéron sont nécessaires à la synthèse de la pétrobactine. La voie de biosynthèse de la pétrobactine est présentée en **Figure I.19**. Trois précurseurs, non spécifiques de cette synthèse sont utilisés : la spermidine, le citrate et l'acide 3-déshydroshikimique (3-DHS). AsbA catalyse la condensation de la spermidine avec l'acide citrique pour produire la N⁸-citryl-spermidine. AsbF catalyse la conversion du 3-DHS en acide 3,4-dihydroxybenzoïque (3,4-DHBA). AsbC active le 3,4-DHBA par l'addition d'un groupement AMP issu d'une molécule d'ATP. Le 3,4-DHBA est ensuite transféré sur la protéine AsbD. Le produit ainsi formé est le 3,4-dihydroxybenzoyl-AsbD. À ce stade, tous les composés mentionnés représentent les différents intermédiaires de la pétrobactine. Les deux étapes suivantes peuvent être réalisées dans n'importe quel ordre. La protéine AsbE transfère le N⁸-citryl-spermidine, qui remplace AsbD sur le 3,4-dihydroxybenzoyl-AsbD. La molécule ainsi formée est ensuite condensée avec de la spermidine par AsbB, donnant le dernier intermédiaire avant la pétrobactine. La dernière étape consiste en un transfert de 3,4-dihydroxybenzoyl-AsbD sur cet intermédiaire, sous l'action de AsbE, libérant ainsi AsbD et formant la pétrobactine (Chen *et al.*, 2019; Fox *et al.*, 2008; Koppisch *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Oves-Costales *et al.*, 2008; Pflieger *et al.*, 2007, 2008).

Bien que *Mh* et *B. anthracis* soient des espèces bactériennes très différentes, monoderme et bactérie du sol pour *B. anthracis* et diderme et bactérie marine pour *Mh*, l'organisation des gènes de biosynthèse de la pétrobactine est similaire chez ces deux organismes. *Mh* possède six gènes homologues à AsbA-F de *B. anthracis*, allant de *MARHY3422* à *MARHY3427*. Le **tableau I.1** a été obtenu en réalisant un alignement de séquences peptidiques et montre qu'il y a environ 40 % d'identité entre les protéines impliquées dans la biosynthèse de la pétrobactine de *B. anthracis* AMES et *Mh* SP17.

Certains précurseurs de la pétrobactine sont capables de capter un ion ferrique dans le milieu extérieur. Une étude a démontré qu'un mutant de *B. anthracis* ne pouvant plus exporter la pétrobactine maintient tout de même une croissance comparable à la souche sauvage dans un milieu pauvre en fer (Hagan *et al.*, 2017). De plus, bien que le mutant soit incapable d'exporter la pétrobactine, un taux de 3,4-DHBA (un des précurseurs de la pétrobactine) aussi élevé que pour la souche sauvage a été retrouvé dans le milieu extérieur. Enfin, l'ajout de citrate et de 3,4-DHBA dans le milieu extérieur permet d'augmenter significativement la croissance de la souche mutante. Ces deux précurseurs permettent donc à la bactérie de récupérer du fer nécessaire pour la croissance. Néanmoins leur affinité avec le fer est bien moins élevée que la pétrobactine. Les auteurs n'ont pas

pu démontrer si ces précurseurs provenaient d'une dégradation intracellulaire de la pétrobactine ou d'une voie de synthèse tronquée. Le fait que des précurseurs de sidérophores soient eux-aussi capables de capter du fer a déjà été démontré par le passé chez *E. coli* (Hantke, 1990).

Tableau I.1. Correspondance des protéines impliquées dans la biosynthèse de la pétrobactine chez *B. anthracis* AMES et *Mh* SP17.

Les pourcentages d'identité ont été obtenus en utilisant le logiciel blastp du NCBI.

Protéine chez <i>B. anthracis</i>	Numéro d'accès- sion	Pourcentage de recouvrement de la séquence protéique	E value	Pourcentage d'identité	CDS chez <i>Mh</i>	Numéro d'ac- cession
AsbA	AAP25873.1	98	3e ⁻¹³¹	39,14	MARHY3422	CCG96877.1
AsbB	AAP25874.1	92	2e ⁻¹⁰⁶	32,53	MARHY3423	CCG96878.1
AsbC	AAP25875.1	98	4e ⁻⁹⁹	38,31	MARHY3424	CCG96879.1
AsbD	AAP25876.1	60	4e ⁻⁰⁹	36,36	MARHY3425	CCG96880.1
AsbE	AAP25877.1	97	2e ⁻¹⁰³	42,41	MARHY3426	CCG96881.1
AsbF	AAP25878.1	96	3e ⁻⁷³	42,45	MARHY3427	CCG96882.1

4.3. L'export de la pétrobactine

Dans une étude menée par Hagan et ses collègues, afin d'identifier le système d'export de la pétrobactine chez *B. anthracis*, tous les gènes potentiels codants pour un système d'efflux ont été délétés un par un. Seule la délétion du gène *apeX* (*apo-petrobactin exporter*) appartenant à la famille des transporteurs RND a permis d'obtenir une accumulation intra cellulaire de la pétrobactine (Hagan *et al.*, 2017). Il a été également noté qu'en conditions limitantes en fer, la croissance du mutant *apeX* n'était pas altérée. Ce résultat a été expliqué par l'export de composés tels que le citrate ou le 3,4-DHBA capables de récupérer du fer, comme il en a été discuté précédemment. Comme mentionné dans la section 2.1.3, il est surprenant que *B. anthracis*, un organisme monoderme, sécrète la pétrobactine via un transporteur RND, qui est plus couramment utilisé par les bactéries didermes. De cette manière, il est possible que *Mh* JM1 exporte ce sidérophore avec ce type de transporteur. Un alignement de séquence protéique entre la protéine Apex de *B. anthracis* et *Mh* JM1 ne permet pas d'établir d'homologie. Lorsqu'un PSI-BLAST

(*Position-specific iterative Basic Local Alignment Search Tool*, c'est-à-dire que l'alignement n'est pas réalisé sur une séquence précise, mais sur une séquence consensus -cet outil est utile pour la recherche d'homologues éloignés-) est réalisé, le résultat indique quatre homologies au total, toutes faibles, mais dont l'une d'entre elles est associée à un gène impliqué dans un système d'efflux de type RND. Il peut par conséquent s'agir d'une première piste pour étudier le système impliqué dans l'export de la pétrobactine.

4.4. Import de la pétrobactine

B. anthracis étant une bactérie monoderme, l'import du complexe pétrobactine-fer fait intervenir un récepteur et un système de transport de type ABC (Jr *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2012). Les travaux menés par Carlson Jr et ses collègues en 2010 ont démontré que le gène *fpuA* code pour une protéine réceptrice, indispensable pour l'import de la pétrobactine. La protéine FpuA de *B. anthracis* partage environ 30 % d'homologie avec la protéine FhuD de *Mh* JM1, qui est une protéine périplasmique appartenant à un transporteur ABC. Il pourrait s'agir alors du système impliqué dans le transport de la pétrobactine une fois que celle-ci a atteint le périplasma. Outre cette protéine, le passage de la membrane cytoplasmique nécessite une perméase et une ATP-ase. Trois ATP-ases et deux perméases ont été décrites, formant trois systèmes d'import indépendants, chacun composé d'une perméase et d'une ATP-ase (Dixon *et al.*, 2012). L'ATP-ase FatE fonctionne avec la perméase composée de deux sous-unités, FatC et FatD. Ces trois gènes codant pour ces protéines sont d'ailleurs adjacents sur le chromosome. Les deux autres systèmes contiennent une même perméase, FpuB, qui s'associe avec une ATP-ase, FpuC ou FpuD. Ces systèmes de transport sont redondants, en effet si un seul des trois systèmes est complet, la cellule peut toujours importer la pétrobactine.

4.5. Dissociation du complexe pétrobactine-fer

Bien qu'encore non démontré, les deux systèmes de libération du fer : la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} ou le clivage de la pétrobactine sont envisageables. L'hydrolyse du sidérophore se ferait au niveau de la fonction amide aux jonctions citrate/spermidine (Hagan *et al.*, 2016).

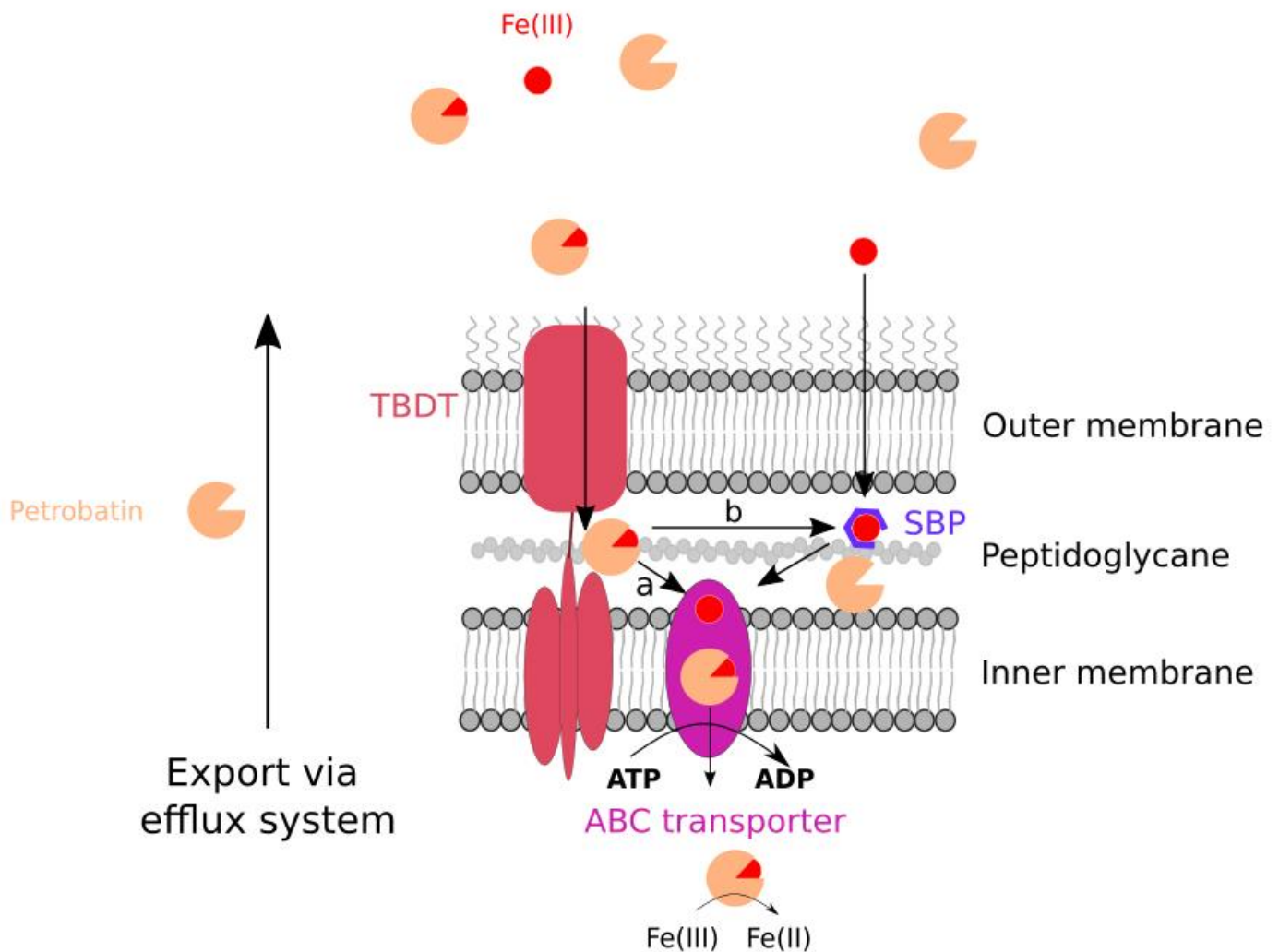


Figure I.20. Schéma hypothétique du transport du fer à travers les deux membranes de *Mh JM1*.

La pétrobactine (en orange) est probablement exportée via un système d'efflux, encore non déterminé, et chélate le fer (en rouge) dans le milieu extracellulaire. Le complexe est transporté à travers la membrane externe par un transporteur TonB-dépendant, tel que MARHY3432, CirA, FhuE, MARHY0217. Une fois dans le périplasme, le complexe entier peut traverser la membrane interne par un transporteur ABC (en violet) (a) ou le complexe peut être dissocié dans le périplasme et le fer pris en charge jusqu'à un transporteur ABC par une protéine de liaison périplasmique telle que FbpA ou MARHY1155 (en bleu) (b). Une autre possibilité est que le fer puisse traverser la membrane externe par un autre procédé encore non élucidé puis pris en charge par une protéine de liaison périplasmique.

4.6. Transport supposé de la pétrobactine chez *Mh* et gènes potentiels

Compte tenu des pourcentages d'identité entre les gènes *asbA-F* avérés être impliqués dans la biosynthèse de la pétrobactine chez *B. anthracis* et les gènes *MARHY3422-3427* (**Tableau I.1**), il est fortement probable que ces derniers correspondent bien à ceux de la voie de biosynthèse de la pétrobactine chez *Mh* SP17. Pour l'export de la pétrobactine, le gène *MARHY3420* est une piste envisageable chez *Mh* car il s'agit d'un système d'efflux MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) situé à proximité de l'opéron de biosynthèse de la pétrobactine. *Mh* étant une espèce diderme, il est très probable que l'import du complexe pétrobactine-fer soit réalisé par un transporteur TonB-dépendant en ce qui concerne la membrane externe et un système ABC ou éventuellement des perméases pour la membrane cytoplasmique. En comparant ces gènes de transport de *Mh* SP17 avec les résultats publiés par Amin *et al.*, 2012 concernant *Mh* VT8, les gènes supposés des ATP-ases chez *Mh* SP17 seraient *MARHY3428* et *MARHY3429*, qui sont situés en aval d'un gène de perméase putatif, *MARHY3430*, lui-même en aval du gène *MARHY3431*, qui serait un gène codant pour une protéine réceptrice. Le gène *MARHY3432* de *Mh* SP17, situé à proximité des gènes *MARHY3428-3431* semble être un transporteur TonB-dépendant. Autre aspect intéressant et qui pourrait confirmer ces hypothèses, tous ces gènes sont situés à proximité des gènes de biosynthèse de la pétrobactine. Toutefois, d'autres transporteurs ABC et TonB-dépendants sont présents dans le génome et peuvent être impliqués dans le transport du sidérophore. Les gènes concernant la biosynthèse, le récepteur TonB-dépendant et le transport de type ABC de la pétrobactine sont contigus chez *Mh*, ce qui n'est pas le cas chez *B. anthracis*. Bien qu'un transporteur ABC pour le passage de la membrane cytoplasmique du complexe fer-sidérophore ait été envisagé pour les raisons précédemment évoquées, il est également possible que la dissociation du complexe puisse avoir lieu dans le périplasme et que le fer soit pris en charge par une protéine de liaison périplasmique, type FbpA. Le transport du sidérophore et l'acquisition du fer sont résumés en **Figure I.20**.

Bien que la piste du sidérophore soit privilégiée, car il s'agit du moyen le plus utilisé par les microorganismes pour acquérir le fer dans les environnements marins, une autre hypothèse est que *Mh* soit capable de capter le métal sans utiliser la pétrobactine. Une réduction du fer à la surface de la cellule ou à distance dans le biofilm, comme évoqué dans ce chapitre est plausible. Le fer ainsi réduit en Fe^{2+} pourrait traverser facilement la membrane externe avant d'être capté par FbpA par exemple. Les systèmes de transport du fer chez *Mh* n'ayant pas encore été élucidés, il s'agit là d'un des fils conducteurs de mon travail de recherche.

5. Objectifs

L'objectif de ce travail est de mettre en lumière l'effet que peut avoir le mode de croissance sur les besoins en fer de la cellule. Le passage d'un mode de vie de planctonique à biofilm ainsi que la dégradation de composés différents a des conséquences sur les besoins des cellules. En effet, la matrice du biofilm séquestre les molécules et la diffusibilité du milieu est fortement modifiée. Le fer, par exemple peut se retrouver adhérent sur le biofilm. Cette proximité avec les cellules facilite-t-elle son acquisition par rapport à une croissance planctonique ? Pour répondre à ces premières questions, une souche modèle a été utilisée, *Mh* SP17, et la croissance à différentes concentrations en fer entre des cellules se développant en biofilm ou planctonique a été comparée.

La deuxième partie de cette thèse s'est concentrée sur les mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh*. Sont-ils dépendants du mode de vie ? La piste d'un sidérophore, la pétrobactine a été immédiatement privilégiée. Pour certaines espèces, les sidérophores sont importants pour le développement d'un biofilm. Chez *B. subtilis* et *M. smegmatis*, la production de sidérophore favorise la croissance en biofilm. En est-il de même pour *Mh* SP17 ? Car le biofilm permet potentiellement un contact direct avec le fer qui est insoluble. Comme vu précédemment, la taille des particules influence très fortement l'efficacité du sidérophore. Dans ces conditions, la pétrobactine est-elle indispensable pour acquérir le fer ? Ou au contraire un contact direct est-il plus profitable ? L'implication d'une *ferric binding protein*, FbpA, a également été envisagé. Pour mettre en avant les mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh* SP17, des mutants ont été créés, l'un ne produisant plus la pétrobactine et l'autre la protéine FbpA, bloquant ainsi la production de sidérophore et le transport du fer libre, respectivement. Les systèmes de transport de la pétrobactine ont également été étudiés. Pour cela, des récepteurs TonB-dépendant potentiellement impliqués ont été sélectionnés, et les mutants associés créés.

Chapitre II

Matériel & méthodes



1. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

1.1 Souches et plasmides

Les souches et les plasmides utilisés dans ce travail sont listés dans les **Tableaux II.1** et **II.2**, respectivement. Au cours de cette étude, la souche de référence est *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 (abrégée *Mh* JM1) et est considérée comme la souche sauvage.

Tableau II.1. Liste des souches utilisées au cours de cette étude.

Souche	Génotype/phénotype	Description	Référence
<i>E. coli</i>			
S17-1 (λ pir)	Tp ^R Sm ^R <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M ⁺ RP4: 2- Tc:Mu:Km Tn7 λ pir	Souche dérivée d' <i>E. coli</i> K12 ayant le gène <i>pir</i> , impliqué dans le maintien des plasmides ayant comme origine de réplication R6K γ ori. Souche donneuse dans la conjugaison avec <i>Mh</i> JM1	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
DH5 α (λ pir)	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ pir	Souche dérivée d' <i>E. coli</i> K12 ayant le gène <i>pir</i> , impliqué dans le maintien des plasmides ayant comme origine de réplication R6K γ ori	
KD9	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN78	Cette étude
FH31	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN78	Cette étude
FH23	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ <i>asbAB</i>	Cette étude
FH24	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ <i>asbAB</i>	Cette étude
FH25	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ <i>fbpA</i>	Cette étude
FH27	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ <i>fbpA</i>	Cette étude
FH32	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ <i>cirA</i>	Cette étude

FH37	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ cirA	Cette étude
FH33	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ fhuE	Cette étude
FH38	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ fhuE	Cette étude
FH54	TOP10 (<i>in vitro</i> gen), Gm ^R	<i>E. coli</i> TOP10 portant le plasmide pARA-ORFfbpA-GentaR	Cette étude
FH56	S17-1 (λ pir), Gm ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ fhuE	Cette étude
KD35	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pARA-ORFfbpA-GentaR	Cette étude
KD36	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) portant le plasmide pSN77- Δ MARHY3432	Cette étude
KD37	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) portant le plasmide pSN77	Cette étude
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>			
SP17	Sm ^S	Isolat original	(Gauthier <i>et al.</i> , 1992)
JM1	SP17 <i>rpsLK58T</i> , Sm ^R	Mutant de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 issu d'une mutation spontanée lui conférant la résistance à la streptomycine.	(Mounier <i>et al.</i> , 2014)
FH36- Δ a <i>sbF</i>	JM1, Δ MARHY3427, Sm ^R	Délétion du gène <i>asbF</i> par intégration et excision du plasmide pSN78	Cette étude
KD17- Δ 3 432	JM1, Δ MARHY3432, Sm ^R	Délétion du gène <i>MARHY3432</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- Δ MARHY3432	Cette étude
FH30- Δ asbAB	JM1, Δ MARHY3422 (<i>ΔasbA</i>), Δ MARHY3423 (<i>ΔasbB</i>), Sm ^R	Délétion des gènes <i>asbAB</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- Δ asbAB	Cette étude
FH29- Δ fbpA	JM1, Δ MARHY2192 (<i>ΔfbpA</i>), Sm ^R	Délétion du gène <i>fbpA</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- Δ fbpA	Cette étude
FH35- Δ asbABF	FH30, Δ MARHY3422-3423-3427 (<i>ΔasbF</i>), Sm ^R	Délétion du gène <i>asbF</i> par intégration et excision du plasmide pSN78.	Cette étude
FH34- Δ fbpA Δ 3432	FH29, Δ MARHY3432, Sm ^R	Délétion du gène <i>MARHY3432</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- Δ MARHY3432	Cette étude

FH42- $\Delta cirA$	JM1, $\Delta MARHY3135$ ($\Delta cirA$), Sm ^R	Délétion du gène <i>cirA</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- $\Delta cirA$	Cette étude
FH43- $\Delta fhuE$	JM1, $\Delta MARHY1035$ ($\Delta fhuE$), Sm ^R	Délétion du gène <i>fhuE</i> par intégration et excision du plasmide pSN77- $\Delta fhuE$	Cette étude
FH57	FH35 + pARA- ORFfbpA-GentaR, Gm ^R	$\Delta asbABF$ complémenté du gène <i>fbpA</i>	Cette étude
FH58	JM1 + pARA- ORFfbpA-GentaR, Gm ^R	JM1 complémenté du gène <i>fbpA</i>	Cette étude
FH59	$\Delta asbABF\Delta fbpA$ + pARA-ORFfbpA- GentaR, Gm ^R	$\Delta asbABF\Delta fbpA$ complémenté du gène <i>fbpA</i>	Cette étude

Kn^R : résistant à la kanamycine ; Sm^S : sensible à la streptomycine Sm^R : résistant streptomycine ; Tp^R : résistant au triméthoprime ; Gm^R : résistance à la gentamicine

Tableau II.2. Liste des plasmides utilisés au cours de cette étude.

Plasmide	Résistance aux antibiotiques	Description	Référence
pSEVA 211	Kn ^R	Origine de réplication : R6K γ <i>ori</i> .	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pSEVA237R	Kn ^R	Origine de réplication : pBBR1 <i>oriV</i> . Contient le gène <i>mCherry</i> codant pour une protéine fluorescente	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pARA	Kn ^R	pSEVA237R où P _{BAD} a été cloné en amont du gène <i>mCherry</i>	Cette étude
pSN77	Kn ^R	Plasmide dérivé du pSEVA 211. Contient le gène <i>rpsL</i> sauvage de <i>Mh</i> SP17, conférant la sensibilité à la streptomycine	Cette étude
pSN78	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>MARHY3427</i> , obtenu par restriction enzymatique et ligation	Cette étude
pSN77- Δ <i>MARHY3432</i>	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>MARHY3432</i> , obtenu par restriction enzymatique et ligation	Cette étude
pSN77- Δ <i>asbAB</i>	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion des gènes <i>MARHY3422</i> et <i>MARHY3423</i> , obtenu par Gibson Assembly	Cette étude
pSN77- Δ <i>fbpA</i>	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>MARHY2192</i> , obtenu par Gibson Assembly	Cette étude
pSN77- Δ <i>asbABF</i>	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion des gènes <i>MARHY3422</i> , <i>MARHY3423</i> et <i>MARHY3427</i>	Cette étude
pSN77- Δ <i>fbpA</i> Δ 3432	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion des gènes <i>MARHY2192</i> et <i>MARHY3432</i>	Cette étude
pSN77- Δ <i>cirA</i>	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>MARHY3135</i> , obtenu par POE-PCR	Cette étude

pSN77- $\Delta fhuE$	Kn ^R	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>MARHY1035</i> , obtenu par POE-PCR	Cette étude
pARA-ORFfbpA-GentaR	Gm ^R	Plasmide utilisé pour la complémentation de <i>fbpA</i> chez $\Delta asbABF\Delta fbpA$ et dont la cassette de résistance à la kanamycine a été remplacée par une à la gentamicine, obtenu par Gibson Assembly	Cette étude

Kn^R : résistance à la kanamycine.

1.2. Milieux de cultures et conditions de croissance

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées à 37°C à 200rpm dans du milieu LB pour *lysogeny broth* (tryptone 10 g.L⁻¹, extrait de levure 5 g.L⁻¹, NaCl 0,09 mol.L⁻¹ et pH 7) ou du milieu halo (NaCl 0,17 mol.L⁻¹, Na₃-citrate 11,6 mmol.L⁻¹, MgSO₄ 81,6 mol.L⁻¹, K₂HPO₄ 3,4 mmol.L⁻¹, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 0,17 mmol.L⁻¹, protéose peptone 5 g.L⁻¹, extrait de levure 1 g.L⁻¹, pH 7,5). Les milieux LB et halo solides contiennent 1,2 % (m/v) et 1,4 % d'agar (m/v), respectivement.

Mh JM1 a été cultivée à 30°C à 200rpm. Le milieu halo a été utilisé lors de la conjugaison. Pour la croissance sur boîte de Pétri et pour les cultures liquides dont la quantité de fer ne nécessitait pas d'être contrôlée, le milieu utilisé est de l'EMS pour eau de mer synthétique (NaCl 0,6 mol.L⁻¹, KCl 10 mmol.L⁻¹, Trizma Base 50 mmol.L⁻¹ pH 7,8, NH₄Cl 56 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 427 μmol.L⁻¹, FeSO₄ 7,2 μmol.L⁻¹, MgSO₄ 65 mmol.L⁻¹ et CaCl₂ 13 mmol.L⁻¹). La source de carbone soluble a été ajoutée en dernier, sous forme d'acétate 20 mmol⁻¹, de lactate 20 mmol⁻¹ ou de succinate 18,5 mmol⁻¹, stérilisée par filtration à 0,2 μm. 1,4 % d'agar (m/v) a été ajouté pour la croissance sur milieu solide.

La solution d'oligo éléments, SL12, est composée comme suit : CuCl₂ 88 μmol.L⁻¹, NiCl₂ 194 μmol.L⁻¹, Na₂MoO₄ 103 μmol.L⁻¹, ZnCl₂ 336 μmol.L⁻¹, MnCl₂ 505 μmol.L⁻¹, CoCl₂ 505 μmol.L⁻¹.

Lorsque mentionnés, les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : streptomycine (Sm) 100 μg.mL⁻¹ et kanamycine (Kn) 100 μg.mL⁻¹.

1.3. Matériel et milieu de culture pour croissance contrôlée en fer

Pour réduire la contamination en fer, les flacons et la verrerie nécessaires à la préparation des milieux ainsi qu'à la croissance de *Mh* JM1 ont été lavés à l'acide. Pour cela, la verrerie et les bouchons en plastique adaptés ont été remplis d'acide chlorhydrique 1N et laissés sous hotte une nuit. Le matériel a ensuite été lavé trois fois avec de l'eau milli Q. Pour l'équipement plastique, comme certains bouchons moins résistants, le même protocole a été effectué mais avec uniquement 1h de bain d'acide.

Le matériel a été stérilisé dans un four pendant 30 min à 170°C. Les bouchons des bouteilles n'ont pas été vissés totalement et ont été recouverts d'aluminium. Une fois la stérilisation terminée, les bouchons ont été rapidement serrés pour éviter toute contamination.

Afin de s'adapter aux conditions d'analyse chimique, différents tampons pour réduire ou remplacer le Trizma Base contenu dans l'EMS ont été testés : 5 mmol.L⁻¹ de Trizma Base, 20 mmol.L⁻¹ de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0,1 mmol.L⁻¹ de NaHCO₃/Na₂CO₃ ou encore la suppression totale de tampon. La composition du milieu a ensuite été modifiée afin de se rapprocher des conditions de l'eau de mer, et le milieu a été appelé MEM pour milieu eau de mer et a été utilisé dans les expériences où la quantité de fer était contrôlée. Il est composé comme suit : NaCl 0,38 mol.L⁻¹, KCl 10 mmol.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 26 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 2,9 μmol.L⁻¹, CaCl₂ 13 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 49 mmol.L⁻¹. Ce milieu a été réalisé à partir de quatre solutions : NaCl 0,475 mol.L⁻¹, KCl 12,5 mmol.L⁻¹ et (NH₄)₂SO₄ 32,5 mmol.L⁻¹, dont le pH a été ajusté à 7,8 avec du NaOH 2 mol.L⁻¹, puis K₂HPO₄ 270 μmol.L⁻¹, suivi de CaCl₂ 10mmol.L⁻¹ et enfin MgCl₂ 25 mmol.L⁻¹. A chaque solution, 5g de chelex pour 100 mL de solution ont été ajoutés. Les solutions ont été agitées une nuit à 200 rpm, filtrées sur un filtre d'acétate de cellulose de 0,2 μm préalablement lavé à l'acide nitrique 2 % puis rincé une fois avec de l'eau milli Q et stockées séparément. Le milieu MEM a été préparé extemporanément comme suit : pour 1 L de MEM, 2,7 mL de K₂HPO₄, 100 mL de CaCl₂ puis 100 mL de MgCl₂ ont été ajoutés à 800 mL de la première solution. Le fer a ensuite été ajouté aux concentrations désirées à partir d'une solution de FeCl₃ 7,15 μmol.L⁻¹. Le pH a ensuite été ajusté à 8 avec environ 7,6 mL d'HCl 1 mol.L⁻¹. La source de carbone soluble a été ajoutée au tout dernier moment, sous forme d'acétate 20 mmol⁻¹, de lactate 20 mmol⁻¹ ou de succinate 18,5 mmol⁻¹, stérilisée par filtration à 0,2 μm.

2. Croissance en condition contrôlée en fer

2.1. Préparation des précultures

Une première culture liquide, faite en triplicat à partir de trois réplicats biologiques (c'est-à-dire 3 clones isolés) a été réalisée dans 5 mL de MEM contenant 7200 nmol.L^{-1} de fer + Sm à 30°C et 200 rpm durant le week-end. Le lundi, une deuxième culture de 10 mL en MEM avec 720 nmol.L^{-1} de fer et Sm a été lancée à 30°C et 200 rpm jusqu'au lendemain matin à partir des cultures du week-end. Ainsi, pour chaque réplicat, une dilution au $1/100^{\text{e}}$ de la première préculture a été réalisée dans trois tubes de MEM à 720 nmol.L^{-1} de fer. Ce sont alors ces cultures qui serviront pour l'ensemencement des expérimentations en plaques 24 puits.

2.2. Suivi de la croissance planctonique en tubes en verre

Lors de la mise en place du nouveau milieu de culture, la croissance planctonique a été mesurée dans les différents milieux testés. Une culture de nuit en EMS + acétate + Sm dont la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ était comprise entre 0,3 et 0,6 a été centrifugée 10 minutes à 8000 rpm et le culot lavé dans le nouveau milieu sans fer et sans source de carbone. Une deuxième centrifugation a été effectuée et les culots repris dans un volume adéquat, de façon à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ proche de 1. Cette suspension cellulaire a ensuite été diluée à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,1 pour l'ensemencement des puits. L'acétate a enfin été ajoutée et les cellules ont été cultivées à 30°C et 200 rpm. Avant chaque prise de mesure la culture a été homogénéisée, puis la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a été lue au spectrophotomètre.

2.3. Quantification de la croissance en plaques 24 puits

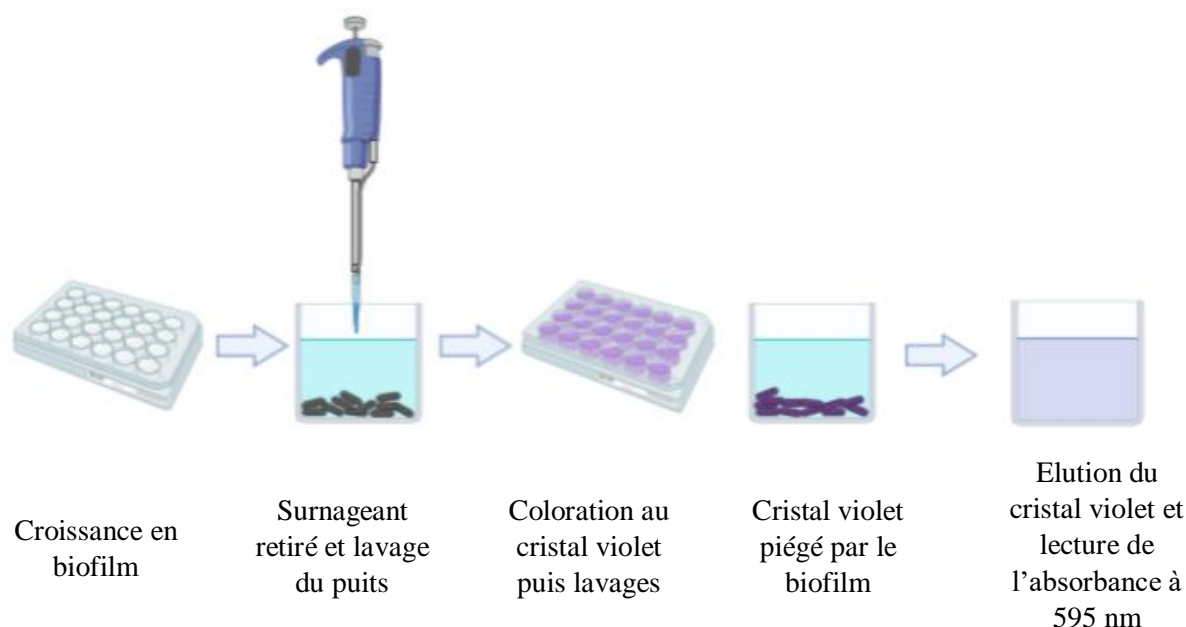


Figure II.1. Protocole de la coloration des biofilms au cristal violet en plaque 24 puits.

Les biofilms sont lavés avant d'être colorés au cristal violet 0,1 % (m/v) puis la quantité de cristal violet piégée par le biofilm est mesurée avec une solution de décoloration. La DO_{595nm} de cette solution est lue au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de biofilm. Figure réalisée à l'aide de Biorender.

Les cultures de biofilms sur les substrats lipidiques et alcanes ont été réalisées dans des plaques 24 puits (Evergreen®) dont le fond des puits était recouvert par le substrat. Pour cela, 0,2 g de substrat (paraffine, tristéarine, ester de cire, hexadecanol ou acide palmitique) a été introduit dans chacun des puits d'une plaque. Pour la condition acétate, aucun substrat solide n'a été ajouté dans les puits. Les plaques ont ensuite été recouvertes d'aluminium puis placées durant 1h à 85°C, afin de faire fondre et répartir les substrats dans les puits, avant de refroidir à température ambiante plusieurs minutes.

Les *inocula* (préparés comme indiqué dans le paragraphe 2.1) ont été lavés une fois avec du MEM sans fer et sans source de carbone, puis les culots ont été repris dans un volume adéquat, de façon à obtenir une DO_{600nm} de 10. Les cellules concentrées ont ensuite été réparties à raison d'une dilution au 1/100^e par puits, dans lesquels 1mL de MEM a été préalablement ajouté. Ainsi, la DO_{600nm} initiale est de 0,1. Les plaques ont été entourées de paraffilm pour éviter l'évaporation et placées à 30°C sans agitation, durant 24, 48 ou 120h. Après incubation, le milieu de chaque puits a été retiré et la DO_{600nm} lue. Les puits ont été lavés avec 2 mL d'eau milli Q et la DO_{600nm} a été de nouveau mesurée, pour vérifier si toutes les cellules planctoniques ont bien été retirées. Les puits ont ensuite été colorés avec 400 μ L d'une solution aqueuse de cristal violet 0,1 % (m/v) durant au moins 3 minutes. Le cristal violet a été retiré et chaque puits a été lavé deux fois avec 1 mL d'eau milli Q, en faisant en sorte de retirer les éventuelles gouttelettes de cristal violet restées sur la paroi. Les plaques ont été décolorées à l'aide d'une solution de décoloration composée d'éthanol 50 % (v/v) et d'acide acétique 10 % (v/v). 1 mL de cette solution a été ajouté dans les puits et le tout a été homogénéisé. La DO a alors été mesurée à 595 nm de longueur d'onde. La **Figure II.1** résume le protocole de quantification du biofilm.

La corrélation entre la DO_{600nm} et la DO_{595nm} a été obtenue comme suit : une culture de 15 mL de *Mh* JM1 a été réalisée en EMS jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} d'environ 1. Celle-ci a ensuite été diluée dans de l'EMS de façon à obtenir une DO_{600nm} de 0,75, 0,5, 0,25, dans des tubes de 1,5 mL. Chaque concentration en cellules a été réalisée en triplicat. Les tubes ont été centrifugés à 13000 rpm durant 10 minutes, puis le culot a été coloré avec 1 mL de cristal violet 0,1 % (m/v) durant 3 minutes. Une nouvelle centrifugation a été effectuée dans les mêmes conditions que la précédente, et le culot a été lavé avec 1 mL d'eau milli Q. Cette étape a été répétée trois fois au total. Une fois les lavages terminés, 1 mL de solution de décoloration (la même que celle utilisée pour la décoloration des biofilms mentionnées quelques lignes plus haut) a été ajouté au tube puis une dernière centrifugation identique aux précédentes a été effectuée. La DO de chaque tube a alors été mesurée à 595 nm.

3. Dosage du fer dans le milieu de culture, intracellulaire et dans les substrats de biofilms

3.1. Dosage des métaux dans les milieux de culture

La quantité de fer présent dans toutes les préparations de milieux MEM a été dosée par spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS). L'ICP-MS permet d'atomiser et d'ioniser les composés contenus dans un échantillon. La masse des ions atomiques ainsi obtenue est ensuite déterminée dans un spectromètre de masse. Ce dernier sépare les ions obtenus après passage dans la torche à plasma selon leur rapport masse/charge (m/z), permettant ainsi leur caractérisation et leur quantification. Les échantillons sont directement dosés par l'appareil après dilution. Toutefois, pour éviter une éventuelle précipitation si les échantillons de milieux ne peuvent pas être dosés immédiatement, 2 % d'acide nitrique (v/v) ont été ajoutés et les tubes ont été placés à 4°C au réfrigérateur jusqu'à leur dosage.

3.2 Dosage du fer intracellulaire

Des cultures de 5 mL de *Mh* JM1 en MEM 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté ont été réalisés sur la nuit. Elles ont ensuite été centrifugées à 10000 rpm durant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et conservés et les culots lavés dans une solution de 5 mL d'EDTA « trace metal grade » à 0,1 mol.L⁻¹ avant d'être centrifugés une nouvelle fois. Trois lavages au total ont été réalisés. Un contrôle avec des lavages à l'eau a été réalisé en parallèle. Les échantillons biologiques tels que les culots de *Mh* JM1 ou les surnageants ont été digérés dans 3 mL d'acide nitrique concentré avec un micro-ondes Milestone UltraWAVE en suivant le protocole pour une digestion d'échantillons biologiques. Ils ont alternativement été chauffés à 220 °C pendant 15 minutes, puis à 60°C 10 minutes toujours en contrôlant la pression à 40 bars de N₂. Les échantillons ont ensuite été analysés par spectroscopie à plasma à couplage inductif (ICP-OES).

Une autre expérience a été réalisée pour retirer le fer potentiellement adhérent à la surface des cellules. Pour cela, des cultures planctoniques de 24h et biofilms de 48h de *Mh* JM1 et $\Delta asbABF$ en MEM avec 200 et 7200 nmol.L⁻¹ de fer ont été effectuées en plaques 24 puits. Dans chaque plaque, les 24 puits correspondent à une seule et même condition. Ainsi, 11 puits ont été regroupés afin d'obtenir un volume suffisant pour les analyses, 2 puits ont servi à quantifier la croissance de ce même réplicat et les 11 autres puits serviront de contrôle et ne seront pas lavés. Chaque condition (200 et 7200 nmol.L⁻¹ de fer) pour chaque souche (*Mh* JM1 et $\Delta asbABF$) a été réalisée en triplicat.

Pour les cultures planctoniques, la DO_{600nm} a été mesurée puis les cultures ont été centrifugées 10 min à 8000 rpm. Le surnageant a été récupéré et les culots ont été repris une première fois avec 10 mL de MEM pH 8. Une deuxième centrifugation identique à la première a été réalisée. Le surnageant a été récupéré et le culot repris dans 10 mL de MEM pH 5,5. Une dernière centrifugation a été réalisée afin de séparer le culot du surnageant. Les culots ont alors été digérés comme indiqué précédemment. Pour les cultures en biofilm, 11 puits ont été regroupés et la DO_{600nm} des surnageants de culture a été mesurée. Ces surnageants regroupés ont ensuite été lavés avec du MEM pH 8 puis pH 5,5, exactement de la même manière que les cultures planctoniques. 0,5 mL d'acide nitrique à 1% a été ajouté à chaque puits contenant du biofilm afin de le dissoudre. Le contenu des 11 puits identiques a alors été mélangé puis digérés à l'acide tout comme les culots des cultures planctoniques. La quantité de fer a ensuite été mesurée par ICP-OES.

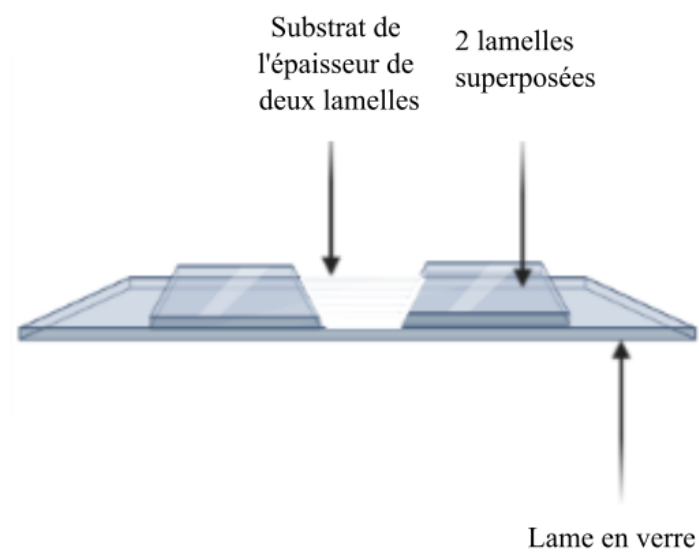


Figure II.2. Construction pour le dosage du fer dans les substrats par ablation laser.

Deux lamelles sont collées entre elles à deux endroits sur une lame de verre afin d'obtenir une couche de substrat plane permettant de réaliser de l'ablation laser en vue du dosage du fer dans ce même substrat.

3.3 Dosage du fer dans les différents substrats

Environ 100 mg de paraffine et de tristéarine ont été digérés dans 3 mL d'acide nitrique concentré avec un micro-ondes Milestone UltraWAVE en suivant le protocole pour une digestion pétrochimique. Les échantillons ont été alternativement chauffés à 110°C pendant 10 minutes, puis à 180°C 15 minutes et enfin à 230°C 15 minutes sous une pression maintenue à 40 bars de N₂. Ce même protocole a été utilisé avec des substrats incubés 120h dans du MEM 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté. Les échantillons ainsi digérés ont ensuite été dilués pour être analysés par ICP-OES à l'aide d'un appareil Thermo Scientific iCap 7000 series. Une analyse de routine a été effectuée en utilisant des standards de calibration pour Fe entre 2 et 400 ppb dans 2% v/v d'acide nitrique et de matrice. Toutes les analyses ont été accompagnées de « Certified Reference Material for rain water (CRM TM rain-95) » en guise de contrôle qualité.

Une autre technique a été utilisée pour essayer de doser la quantité de fer dans les substrats. Deux fois deux lamelles, séparées d'environ 1 cm, ont été collées l'une sur l'autre sur une lame de verre, comme représenté dans la **Figure II.2**. Le substrat a été fondu puis introduit dans le puits formé par l'espace entre les deux lamelles. Le tout a été aplani en posant délicatement une lame de verre puis en la retirant. Les échantillons ont été analysés par ablation laser couplée à un spectromètre de masse à plasma à couplage induit triple quadrupôle (LA-ICPMSMS) (ICPMS triple quadrupôle Agilent 8900). Le laser est un système d'ablation laser femtoseconde IR (1030 nm) (Novalase, France). La stratégie d'ablation a consisté à réaliser une ablation laser en carré scanné de 600 x 600 µm avec une cadence de tir de 200 Hz, une vitesse de scanner de 2,5 mm.s⁻¹, une énergie de 17 µJ.pulse⁻¹, une taille de faisceau de 15 µm et comme gaz porteur de l'hélium à un débit de 450 mL.min⁻¹. L'ICPMSMS était en mode MS/MS, avec comme gaz cellule collision/réaction de l'hélium à 9 mL.min⁻¹. Les masses et les temps d'analyse étaient comme suit : ¹²C (0,001 ms), ²⁸Si (0,001 ms), ⁵⁶Fe (0,1 ms) et ⁵⁷Fe (0,1 ms). Le gaz de nébulisation était de 0,93 L.min⁻¹ et le gaz auxiliaire de 0,1 L.min⁻¹.

4. Détection et quantification de la pétrobactine

4.1. Test CAS liquide

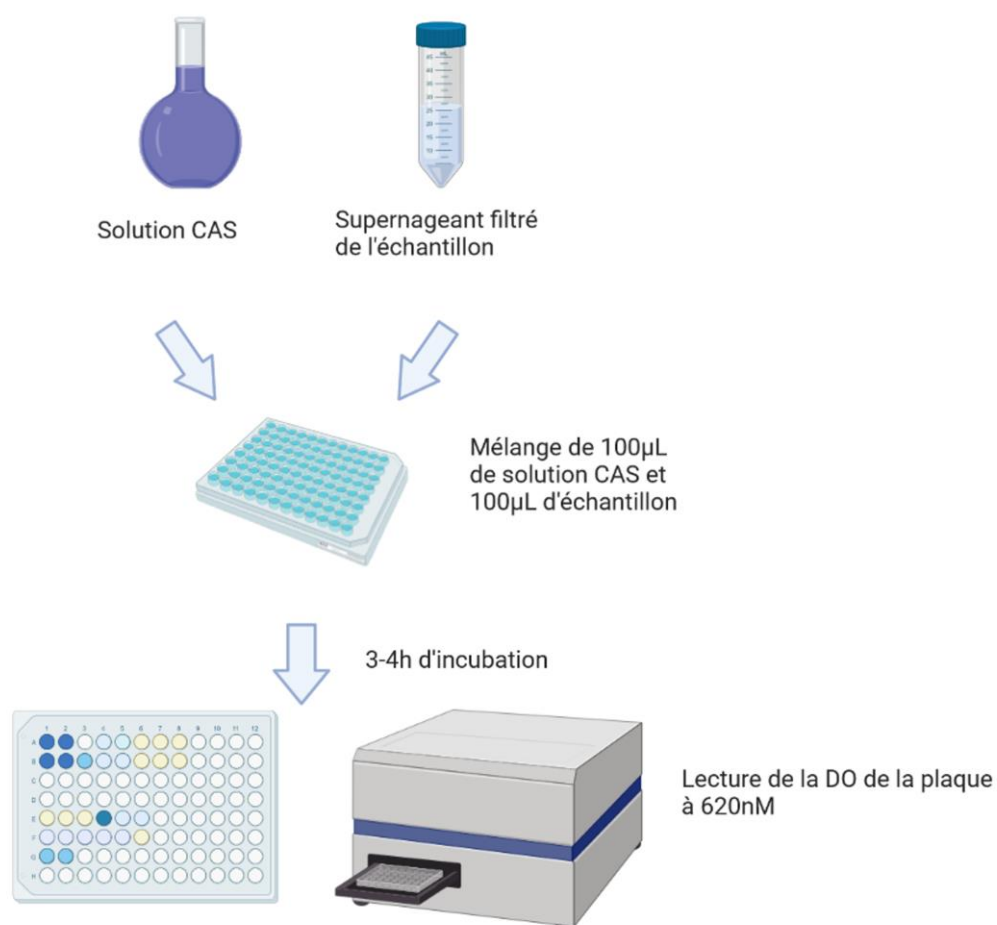


Figure II.3. Protocole du test CAS liquide.

Identique au protocole décrit par (Alexander and Zuberer, 1991). Figure réalisée à l'aide Biorender.

La présence et la quantification de pétrobactine dans le milieu de culture ont initialement été mesurées à l'aide d'un test universel de détection des sidérophores, le test CAS (*chrome azurol S*), dont le protocole est résumé dans la **Figure II.3**. Le réactif CAS a été réalisé comme indiqué par Alexander et Zuberer en 1991 (Alexander and Zuberer, 1991). Pour 100 mL de réactif, 25 mL d'une première solution à 2,4 mmol.L⁻¹ d'HDTMA a été réalisée sous agitation et chauffage. Une deuxième solution contenant 1,5 mL de FeCl₃ à 1 mmol.L⁻¹ dans de l'HCl 10 mmol.L⁻¹ et 7,5 mL de colorant CAS à 2 mmol.L⁻¹ a également été préparée. Celle-ci a été ajoutée lentement à la première d'HDTMA. Séparément, une solution tampon de MES à 1 mol.L⁻¹ dans 50 mL d'eau et dont le pH a été amené à 5,6 avec du KOH 50 % (m/v) a été réalisée. Cette solution tampon a été ajoutée à la précédente ainsi que de l'eau jusqu'à obtenir un volume final de 100 mL. Juste avant utilisation de cette solution finale, 87,3 mg d'acide 5-sulfosalicylique ont été ajoutés à la réaction afin d'accélérer le processus.

Le ferrichrome a été utilisé pour obtenir une courbe de standard, en utilisant des concentrations différentes : 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 µmol.L⁻¹. Dans des plaques 96 puits, 100 µL de réactif ont ensuite été mélangés à 100 µL de solution standard ou à 100 µL d'échantillon. 3h30 d'incubation dans le noir ont été réalisées avant de mesurer la DO au lecteur de plaque. Une agitation à 425 cpm par la machine a été réalisée avant lecture de la DO à 620 nm. Un « area scanning » de 5x5 a été demandé pour estimer au mieux la DO des puits.

4.2 Purification et quantification de la pétrobactine

Une culture de 2,5 L de *Mh* JM1 en milieu Hickford (NaCl 0,5 mol.L⁻¹, MgSO₄ 1,6 mmol.L⁻¹, NH₄Cl 18 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 17 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 1,3 mmol.L⁻¹, succinate de sodium 18 mmol.L⁻¹) sans ajouter de fer dans le milieu a été incubée à 30°C et 150 rpm durant 6 jours. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 7000 rpm durant 30 min à 10°C. Le surnageant a été récupéré et acidifié à pH 5 avec de l'HCl 1 mol.L⁻¹ et de la résine amberlite® XAD-2 a été ajoutée à raison de 50 g.L⁻¹. La mixture a été mélangée à 50 rpm dans le noir durant 4h. La résine a ensuite été chargée sur une colonne en verre puis lavée avec 3 volumes morts d'eau milliQ précédant une élution de deux volumes morts de méthanol grade HPLC et a été de nouveau lavée avec 2 volumes morts d'eau milliQ. La présence de pétrobactine a été vérifiée par test CAS (voir section 4.1 de ce même chapitre) dans les fractions de méthanol. Le méthanol des fractions positives a été évaporé à l'aide d'un speedvaq à 35°C, 150 rpm et 200 mBar de pression, avant d'ajouter 5 mL d'eau milliQ dans les tubes. Ces derniers ont ensuite été congelés jusqu'à leur purification. La purification a été réalisée

par un système HPLC (*high pressure liquid chromatography*) Sephasil Protein C4 (4,5x250 mm, 12 μm) avec une taille de pore de 300 Å et un gradient de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique et un volume d'injection de 50 μL . Les fractions de sidérophores ont été déterminées par test CAS et les fractions positives ont été analysées par ESI-MS.

4.3 Quantification de la pétrobactine par LC-ESI-MS dans le milieu de culture

A partir d'*inocula*, *Mh* JM1 et la souche ne produisant plus de pétrobactine ΔasbABF ont été incubés en plaques 24 puits avec de l'acétate ou de la paraffine ou de la tristéarine comme source de carbone durant 24h et 120h avec 100 et 7200 nmol.L^{-1} de fer. Les surnageants ont alors été récupérés, centrifugés 10 minutes à 8000 rpm puis filtrés avec un filtre 0,025 μm . Les biofilms (conditions paraffine et tristéarine) ont également été grattés avec une oeuze en plastique, puis 1 mL de MEM sans fer a été ajouté, le tout récupéré puis filtré de la même manière que les surnageants. La quantité de pétrobactine a alors été mesurée dans les échantillons par LC-ESI-MS. La quantification a été possible avec la mesure en parallèle des standards de pétrobactine purifiée (voir section 4.2 de ce même chapitre). Les analyses de LC-ESI-MS ont été réalisées avec un système Thermo LC. La préparation de l'échantillon a consisté en une extraction de type SPE (*solid phase extraction*) On line, en utilisant une colonne SPE Oasis HLB Direct Connect HP 20 μm , 2,1x300mm On-Line, Waters (Ireland). La phase mobile SPE était composée de formiate d'ammonium 5 mmol.L^{-1} et d'acide formique 0,3 %, le volume d'injection était de 2 mL et le flux de 1 mL.min^{-1} . La séparation chromatographique a été réalisée par HPLC en utilisant une colonne en phase inverse Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 2,1x150mm, Waters (Ireland). La phase mobile A de l'HPCL était composée de formiate d'ammonium 5 mmol.L^{-1} et d'acide formique 0,3 % et la phase mobile B était composée d'un ratio 90:10 d'acétonitrile:méthanol et d'acide formique 0,3 %. Le flux de la colonne était de 0,3 mL.min^{-1} et le gradient utilisé était : 0-5, 5-5, 7-50, 8-50, 10-95 (temps, min - % acétonitrile), à 40°C.

4.4 Détection de la pétrobacine intracellulaire

Une culture de 750 mL avec du MEM à 500 nmol.L⁻¹ de FeCl₃ a été réalisée à partir d'une dilution au 1/100^{ème} d'un *inocula* d'une culture à 720 nmol.L⁻¹ de FeCl₃. Cette culture a été incubée durant environ 24h à 30°C et 75 rpm jusqu'à ce que la DO_{600nm} atteigne 0,4. 30 minutes avant d'arrêter la croissance des cellules, un tiers de la culture a été prélevé (après homogénéisation) et du FeCl₃ a été ajouté à une concentration de 20 µM. Le mélange a été incubé le temps restant à 30°C et 75 rpm. Cette même étape a été réalisée 5 minutes avant la fin de la croissance sur un deuxième tiers de la culture. Une fois les cultures arrêtées, les cellules ont été centrifugées 15 minutes à 10000 rpm à 4°C. Les culots ont été repris dans du MEM 0 nmol.L⁻¹ FeCl₃ et de l'EDTA citrate à 0,05 mol.L⁻¹, du citrate de sodium à 0,05 mol.L⁻¹ ainsi que de l'oxalate de sodium à 0,01 mol.L⁻¹. Une deuxième centrifugation de 15 minutes à 10000 rpm à 4°C a été réalisée. Les culots ont été repris dans du MEM 0 nmol.L⁻¹ FeCl₃. Une dernière étape de lavage a été effectuée en centrifugeant les cellules 15 minutes à 10000 rpm à 4°C. Les culots ont de nouveau été repris dans du MEM 0 nmol.L⁻¹ FeCl₃. Une dernière centrifugation de 15 minutes à 10000 rpm à 4°C a été réalisée. Les culots ont été repris dans 5 mL de tampon ammonium acetate pH 6,5-7 à 50 mmol.L⁻¹. Les cellules ont été lysées à l'aide d'une presse de French. Une centrifugation du contenu intracellulaire a été effectuée durant 15 minutes à 11000 rpm et 4°C. Les surnageants ont été récupérés puis congelés avant analyse par LC-ESI-MS (*Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*), comme décrit dans paragraphe 4.3.

5. Construction des plasmides et des souches

5.1. Extraction et purifications d'ADN

L'ADN génomique de *Mh* JM1 a été extrait avec le kit DNeasy® UltraClean® de Qiagen. Les plasmides ont été obtenus en utilisant le kit QIAprep® Spin Miniprep Kit de QIAGEN. Enfin, les purifications d'ADN, correspondant aux inserts, ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de MACHEREY NAGEL à partir des produits PCR ou en purifiant sur gel lorsque des bandes non désirées étaient présentes.

5.2. PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

Les PCRs ont été réalisées avec les enzymes EUROBIOTAQ à 5 u.µL⁻¹ (Eurobio Scientific) ou GoTaq® à 5 u.µL⁻¹ (Promega) en suivant les préconisations du fournisseur. Chaque PCR,

digestion, insertion ou délétion a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. La teneur en agarose du gel varie entre 1 et 2 % en fonction de la taille des fragments et le gel est préparé dans du tampon TAE 1X (40 mmol.L⁻¹ Tris, 20 mmol.L⁻¹ d'acide acétique, 1 mmol.L⁻¹ EDTA à pH 8,3) contenant du BET à 0,5 µg.mL⁻¹. Les ADN sont mélangés à du tampon de charge 6X de chez NEB (*New England BioLabs*) puis déposé sur le gel d'agarose baignant dans du tampon TAE 1X. La migration a généralement été effectuée à 100V jusqu'à ce que les fragments soient correctement séparés.

5.3 Construction plasmidique pour la délétion d'un gène cible

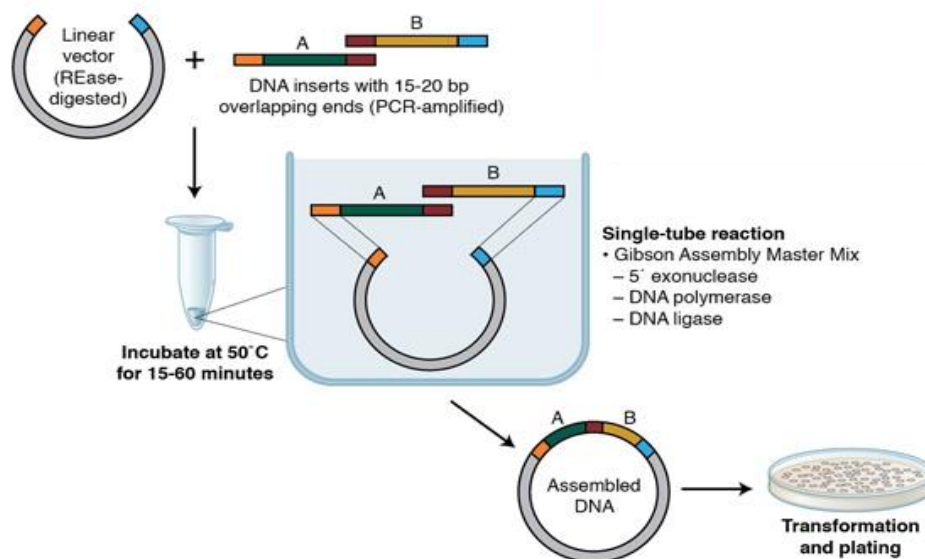


Figure II.4. Schéma de clonage par Gibson Assembly.

Une PCR permet d'amplifier les inserts (régions en amont et en aval des gènes à déléter) ainsi que le vecteur. Les oligonucléotides contiennent également des séquences « *overlapping* », c'est-à-dire qu'aux extrémités de chaque fragment, des séquences d'ADN identiques sont ajoutées (symbolisées en orange, bleu et rouge). Ces séquences permettent ensuite par une seule réaction contenant des 5' exonucléases, une DNA polymérase et une DNA ligase d'assembler le vecteur qui sera ensuite transférés dans *E. coli* par transformation. D'après NEB.

Toutes les amorces utilisées au cours de cette étude sont listées dans le **Tableau II.3**. Les plasmides pSN77, pSN78 et pSN77- Δ MARHY3432 ont été construits par restriction enzymatique et ligation. Le plasmide pSN77, utilisé ensuite pour la délétion des gènes *MARHY3427* (pSN78) et *MARHY3432* (pSN77- Δ MARHY3432), est un plasmide pSEVA211 auquel le gène *rpsL* de *Mh* SP17 a été intégré, à l'aide des oligonucléotides OL97 et OL98, par digestion enzymatique puis ligation. Le gène *rpsL* sauvage permet de compléter les mutants résistants à la streptomycine (*Mh* JM1).

Pour les plasmides pSN78 et pSN77- Δ MARHY3432 utilisés pour la construction de FH36 et KD17, respectivement, les régions bordantes du gène *asbF* pour FH36 et *MARHY3432* pour KD17 ont été clonées. Les inserts ont été obtenus par PCR, en utilisant l'enzyme Phusion (ThermoScientific F-530L 2 u. μ L⁻¹) en suivant les recommandations du fournisseur, avec 0,5 μ L d'ADN génomique comme matrice. Des sites de restriction ont été ajoutés aux oligonucléotides. Les produits PCR ainsi que les vecteurs ont été digérés durant 1h à 37°C dans une solution contenant les enzymes de restriction adaptées (*SalI* HF, *BamHI* HF, *EcoRI* HF, *SacI*, *SacII*, ou *SwaI*) à 20 U pour 50 μ L de réaction et du tampon cutsmart 1X. Toutes les enzymes proviennent de NEB. Le vecteur digéré a été déphosphorylé avec 1 μ L de phosphatase alcaline à 1 mg.mL⁻¹ et 2000 unités.mg⁻¹ de protéine à 37°C durant 1h. Les inserts et le vecteur ont été purifiés puis élués dans 30 μ L d'eau milli Q et enfin quantifiés. La ligation a été réalisée dans un volume de 10 μ L, contenant un ratio 3:1 (insert:vecteur), 3U d'ADN ligase T4 (Promega) et du tampon T4 1X et incubée à 16°C sur la nuit. Le plasmide pSN77- Δ *asbF* ainsi obtenu a été dialysé 1h30 sur filtre d'ester de cellulose à pores de 0,025 μ m puis utilisé pour transformer par électroporation *E. coli* DH5- α .

Les autres plasmides ont été obtenus par Gibson Assembly (Gibson Assembly Cloning Kit, NEB), présentée en **Figure II.4** ou POE-PCR (présenté en **Figure II.5**). L'amplification des inserts, ainsi que celle du vecteur pSN77 a été réalisée à l'aide de l'enzyme Prime Star (Takara) en suivant le protocole du fournisseur, à partir d'ADN génomique. Comme indiqué sur le protocole, une digestion enzymatique du vecteur par *DpnI* a été faite afin de digérer le plasmide matrice pour la Gibson Assembly. La réaction a ensuite été réalisée selon les instructions du fournisseur, dans 20 μ L à 50°C durant 15 minutes avant d'être stockée à -20°C jusqu'à son utilisation pour transformer par électroporation les cellules d'*E. coli* DH5- α .

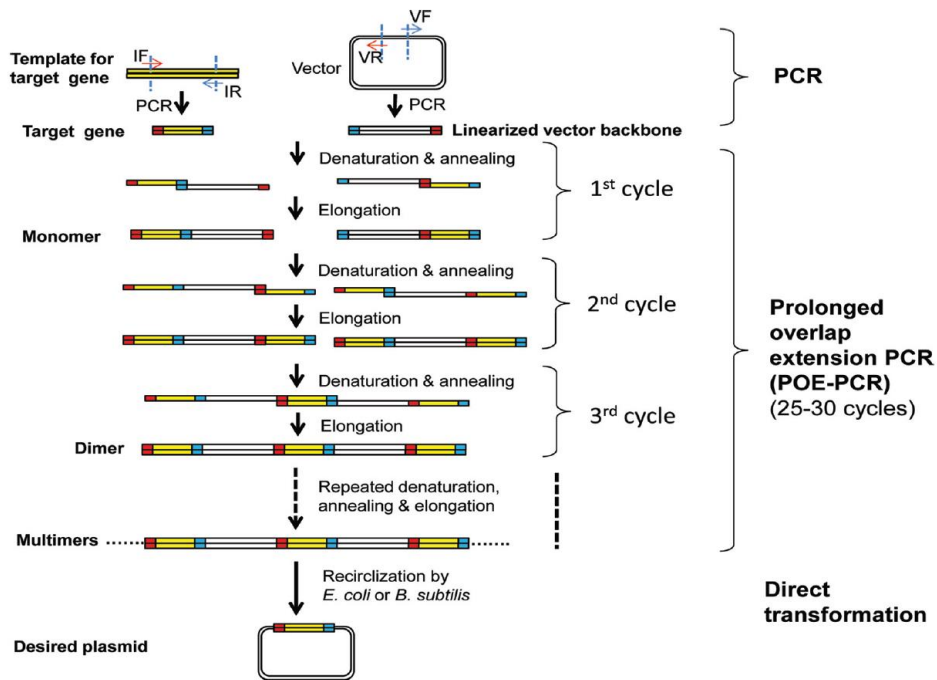


Figure II.5. Schéma de clonage par POE-PCR.

Par une première étape de PCR, les inserts (régions en amont et en aval des gènes à déléter) ainsi que le vecteur sont amplifiés. Les oligonucléotides contiennent également des séquences « *overlapping* », c'est-à-dire qu'aux extrémités de chaque fragment, des séquences d'ADN identiques sont ajoutées (symbolisées en bleu et rouge). Une deuxième étape, la POE-PCR permet de former des multimères d'ADN (enchaînement d'inserts et de vecteurs) sans primers avec un temps prolongé d'extension (POE). Ces multimères sont ensuite transférés dans *E. coli* par transformation où ils seront linéarisés. D'après (You *et al.*, 2012).

5.4. Transformation *E. coli* DH5- α λ pir et selection des plasmides recombinants

Les plasmides (listés dans le **Tableau II.2**) ont été introduits dans *E. coli* DH5- α λ pir par électro-transformation. 100 μ L de cellules électro-compétentes d'*E. coli* DH5- α λ pir ont été incubés 20 minutes avec l'ADN sur de la glace. Le protocole de préparation des cellules électrocompétentes est indiqué en annexe dans la partie **supplément du Matériel & méthodes**. Le mélange a été transféré dans des cuvettes d'électroporation de 2 mm de largeur d'interstice. L'électroporation a été réalisée à l'aide d'un électroporateur Biorad pulse controller plus avec une tension initiale de 2,5 kV.cm⁻¹, une résistance de 200 Ω et une capacité de 25 μ F. Après la décharge électrique, 450 μ L de milieu LB ont été immédiatement ajoutés. Les cellules ont été transférées dans des tubes de 1,5 mL et l'expression phénotypique a été réalisée à 30°C durant 1h30 puis les cellules ont été centrifugées à 5000 rpm pendant deux minutes, reprises dans 50 μ L de milieu LB et enfin étalées sur boîtes LB + Kn 50 μ g.mL⁻¹. Les boîtes ont été incubées 48h à 30°C puis les transformants vérifiés par PCR sur colonie avec les oligonucléotides correspondants (**Tableau II.3**) à l'aide de l'enzyme GoTaq de Promega en suivant le protocole du fabricant. Les clones ayant une bande à la taille correspondante ont ensuite été mis en culture dans du LB + Kn 50 μ g.mL⁻¹ une nuit à 30°C puis les plasmides ont été extraits et vérifiés par séquençage. Tous les séquençages de cette étude ont été réalisés en LightRun Tube, par eurofins Genomics.

5.5. Transformation *E. coli* S17-1 λ pir et conjugaison

Les plasmides ont ensuite été introduits dans *E. coli* S17-1 λ pir par transformation au TSS en suivant le protocole proposé par (Chung *et al.*, 1989) ou par transformation chimique comme indiqué ci-après. Le protocole de préparation des cellules chimiocompétentes est indiqué en annexe dans la partie **supplément du Matériel & méthodes** Pour cela, 100 μ L de cellules chimiocompétentes ont été incubés 30 minutes avec l'ADN sur de la glace. Un choc thermique a été réalisé en plaçant les cellules et l'ADN à 42°C durant 30 secondes avant de les laisser sur glace 2 minutes. 1 mL de LB préchauffé à 37°C a été ajouté puis l'expression phénotypique a été réalisée durant 1h d'incubation à 37°C. Les cellules ont ensuite été étalées de la même manière que pour la transformation par électroporation. Les transformants ont été vérifiés par PCR sur colonies avec la même enzyme que pour la transformation par électroporation. Les clones ayant une bande à la taille correspondante ont ensuite été mis en culture dans du LB + Kn 50 μ g.mL⁻¹ une nuit à 30°C puis les plasmides ont été extraits et vérifiés par séquençage.

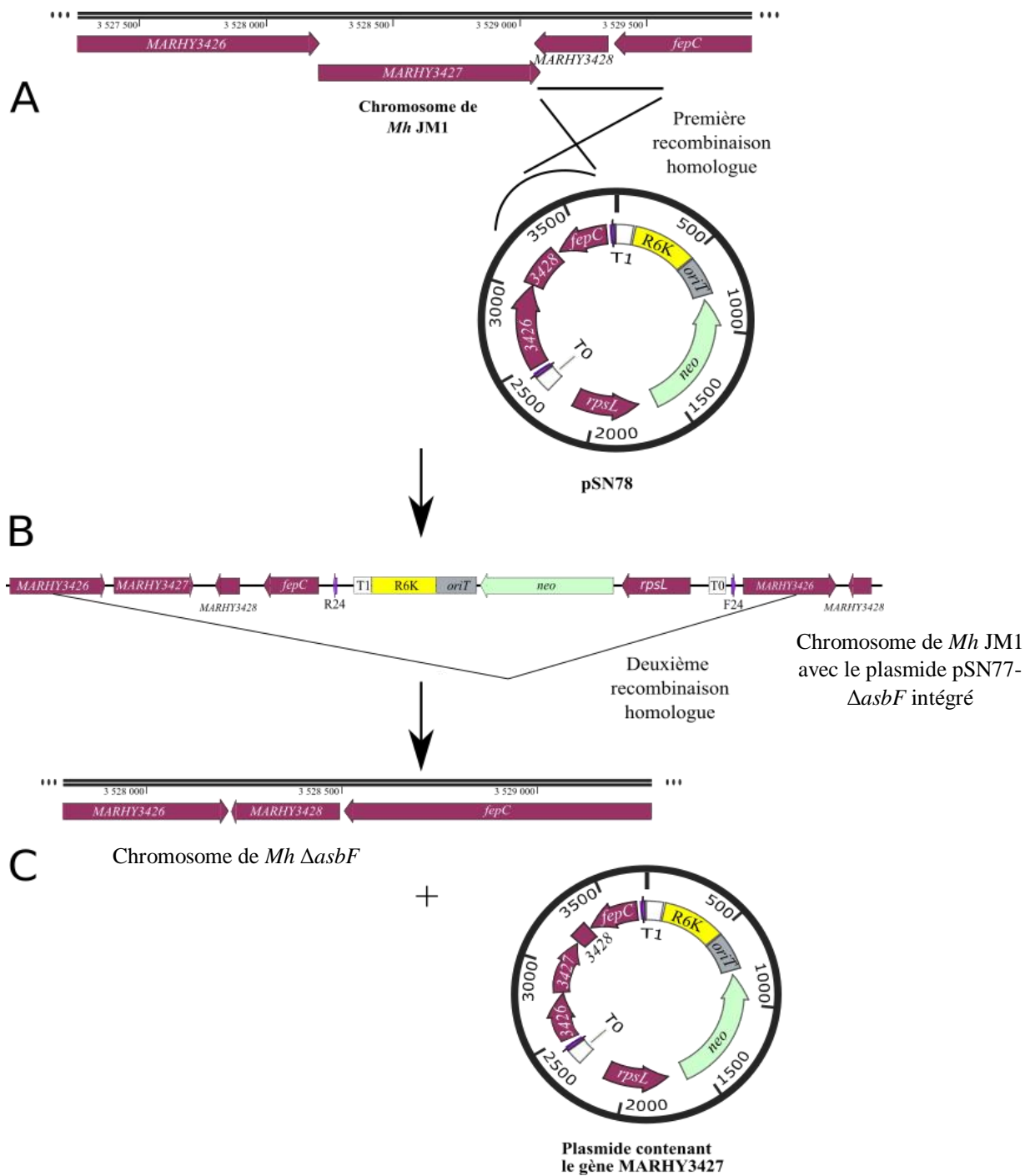


Figure II.6. Schéma de construction du mutant délété du gène *MARHY3427* (*asbF*).

Après construction du plasmide pSN77- Δ asbF (vecteur pSN77 dans lequel les séquences adjacentes du gène *MARHY3427* ont été clonées) et intégration dans les cellules de *Mh* JM1, un premier évènement de recombinaison (A) permet d'intégrer le plasmide dans le chromosome bactérien (B), puis un deuxième évènement de recombinaison (B) permet d'exciser le plasmide (C). Les gènes *MARHY3426* et *MARHY3428* sont les gènes adjacents à *MARHY3427*.

5.6. Conjugaison entre *E.* et *Mh* et obtention des mutants par recombinaisons homologues

Les délétions sont réalisées par recombinaisons homologues à partir d'une conjugaison entre *Mh* JM1 ou une autre souche déjà délétée d'un gène et *E. coli* S17-1 λ pir portant le plasmide correspondant. Des cultures de 5 mL de *Mh* JM1 et *E. coli* S17-1 λ pir ont été réalisées dans du Halo supplémenté de 20 mmol.L⁻¹ de lactate et avec l'antibiotique correspondant. 100 μ L de cellules issues de chaque culture ont été mélangés à 800 μ L de Halo. Le tout a été centrifugé à 8000 rpm pendant 2 min. Les culots ont été resuspendus dans 1 mL de Halo avant d'être centrifugés une nouvelle fois puis repris dans 30 μ L de Halo. Ces 30 μ L ont ensuite été déposés sur filtre de nitrocellulose 0,45 μ M sur boîte Halo + lactate 20 mmol.L⁻¹. Les boîtes ont été incubées 5h à 30°C puis laissées à température ambiante la nuit. Le lendemain les filtres ont été récupérés et les cellules suspendues dans 1 mL de milieu EMS-L avant d'être centrifugées 2 min à 8000 rpm. Les culots ont été repris dans 500 μ L d'EMS-L. 150 et 350 μ L ont été étalés sur boîtes EMS-L + Kn 100 μ g.mL⁻¹ et NaCl 0,2 mol.L⁻¹. Les boîtes ont été incubées 48h. Une fois les clones obtenus, ceux-ci ont été testés par PCR pour vérifier que le premier événement de recombinaison a bien eu lieu. Si c'est le cas, le clone a été mis en culture liquide d'EMS-L + Kn 100 μ g.mL⁻¹ et NaCl 0,2 mol.L⁻¹ durant une nuit. Une dilution au 1/100^{ème} de cette culture a ensuite été réalisée dans de l'EMS-L NaCl 0,2 mol.L⁻¹ sans antibiotique pour favoriser le 2^{ème} événement de recombinaison. Le lendemain, une dilution 10⁻⁴ de cette culture a été réalisée et 150 μ L ont été étalés sur une boîte EMS-L + Sm 100 μ g.mL⁻¹ et NaCl 0,6 mol.L⁻¹. La boîte a été incubée 48h et les clones obtenus ont été testés par PCR pour vérifier que la délétion a bien eu lieu. Les PCR positives ont été purifiées et envoyées à séquencer. La **Figure II.6** résume le processus de construction des mutants.

Tableau II.3. Liste des amorces utilisées au cours de cette étude.

Amorce	Séquence cible	Cible
Amplification d'inserts		
OL97/OL98	tgagcgccgaactaacc/acaacaggacttgggtcg	<i>rpsL</i> de <i>Mh</i> SP17
OL60/OL61	ctctggatccacctcatccacctcatcg/attccgcgggtactggtacgtcagacg	
OL93/OL94	gtacggatcctcatggcaatacctccagg/ gtcagagctcccaaagaccggattctggaa	<i>MARHY3427 (asbF)</i>
OL168/OL169	acacttaacggctgacatgggcccgtttatgggctgtg /gatggtgatcaatgaagggcagtcgacgctccaaattcc	<i>MARHY3422/MARHY3423</i>
OL170/OL171	ggaatttgagcgtcgactgccttcattgatcaccatc/ gatctatcaacaggagtcgaagccgggtcaagctcatgg	<i>(asbAB)</i>
OL181/OL182	acacttaacggctgacatggaaatccggatgcagcagtac/ gactgccccaccctgtgactaacggctccttgggtg	<i>fhuE</i>
OL183/OL184	caaccaaggagccgtagtcacaggggtgggagcagtc/ gatctatcaacaggagtcgaagcagatgcaagactggtac	
OL189/ OL190	acacttaacggctgacatggcatcatccctgggtggatctg /cattgaagtcattggtactatccgatgatcagtttctgcatttgc	<i>cirA</i>
OL191/OL192	gcaaatgcgaaaactgatacatcggatagtaacctgacttcaatg/ gatctatcaacaggagtcgaagctgccgaagtgaaaagttc	
OL160/OL161	acacttaacggctgacatggcaggtgaactcatcaggc/ ggttgggtgaggctgaagtggtgatcctttctgtcg	<i>fbpA</i>
OL162/OL163	cgacagaaaggatcaccacttcagcctcacaccaacc/ gatctatcaacaggagtcgaaggaactgcacatggtcac	
OL117/OL118	gccgagctgaaccgatggccaggc/ acacttaacggctgacatggggtcaaggacaacgatgatcag	<i>MARHY3432</i>
OL121/OL120	ggatctatcaacaggagtcgaagccaccacattcatgggc/ tctacaataaggcccgtgatgttgc	
Amplification du vecteur pour la Gibson Assembly		
OL109/OL110	cttgactcctgtgatagatccagt/ccatgtcagccgtaagtgttcc	Vecteur pSN77

Vérification du clonage

OL103/OL104	agcggataacaatttcacac/agggtttcccagtcacg	Sans Gibson Assembly
OL115/OL116	ggaacacttaacggctgac/actggatctatcaacaggagt	Après Gibson Assembly
OL99/OL100	cgactagtcttgactcc/agacgcaccatttcacg	Insertion <i>rpsL</i> sur pSEVA211

Vérification de la délétion du gène sur le chromosome de la souche mutée

OL137/OL138	ctggcgattgaagaggtt/actacgtgatgttgaagc	<i>MARHY3427 (asbF)</i>
OL172/OL173	accgtcccggctaattg/ggttgcgtgaaggcatg	<i>MARHY3422-</i> <i>MARHY3423 (asbAB)</i>
OL174/OL175	gactcattcgcggttagc /tggtgatgagaagtgttgcg	<i>fbpA</i>
OL187/OL188	gccagagtccactccag/cagttcaaatgcgaggcc	<i>fhuE</i>
OL195/OL196	cggtcatcagtaccaatcctg/ctcatcccggcagttttc	<i>cirA</i>
OL139/OL140	agctgttgcgtgtagaac/ccatcagttgcgtagagg	<i>MARHY3432</i>

6. Imagerie moléculaire de la pétrobactine dans un biofilm de *Mh* JM1

Une culture de nuit liquide de *Mh* JM1 en milieu MEM + 7200 nmol.L⁻¹ de FeCl₃ + Sm a été réalisée à partir d'un clone isolé. Avant incubation, de l'eicosane a été fondu puis versé dans le fond d'une boîte de Pétri sur une épaisseur d'environ 0,5 cm tout en tachant d'avoir un aspect le plus plat possible. Une fois le substrat refroidit, deux protocoles ont été essayés. La première condition a consisté en l'ajout d'un volume de MEM sans fer avec une DO_{600nm} de 0,1 de cellules de *Mh* JM1 puis le tout a été placé à 30°C durant une nuit sans agitation. La deuxième condition a été d'ajouter cette même suspension de cellules, mais uniquement durant 2h de façon à ce que les cellules adhèrent au substrat. Une fois le temps écoulé (2h ou la nuit selon la condition), le milieu liquide a été retiré puis du MEM-agar (contenant 1,5 ou 2 %) sans ajout de fer a été fondu à la plus faible température possible et a ensuite été versé sur l'eicosane contenant le biofilm (condition 1) ou les cellules adhérentes (condition 2). Pour la condition 1, la boîte contenant l'eicosane et le milieu

gélifié a été placée durant 2h à 4°C. Pour l'autre condition, la boîte a été incubée sur la nuit à 30°C et 0 rpm, puis placée à 4°C le lendemain durant 2h. Une fois les 2h au réfrigérateur écoulées, l'agar a délicatement été séparé de l'eicosane. Le biofilm se retrouve sur la partie agar. Ce transfert a été vérifié par coloration au cristal violet de la partie agar et la partie eicosane, et quelle que soit la condition, le biofilm se retrouve dans l'agar. Des tranches d'agar contenant le biofilm ont été réalisées à l'aide d'un scalpel puis introduites dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide afin d'être immédiatement congelées. Ces tranches ont ensuite été conservées à -80°C jusqu'à être coupées au cryomicrotome. Des coupes longitudinales du biofilm ont ensuite été réalisées d'une épaisseur de 50 µm avec le porte objet refroidit à -15°C avec une lame à la température de -20°C. Ces coupes ont ensuite été déposées sur des lames de verre recouvertes de *copper tape*, du scotch cuivré permettant de rendre la lame conductrice pour une analyse FT-ICR MS (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*). Une fois l'échantillon déposé, les lames ont été placées dans un dessiccateur. Lorsque les échantillons étaient totalement séchés, la matrice de MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) a été vaporisée sur toute la surface. Les matrices ont été préparées comme suit : 20 mg.mL⁻¹ de chaque composé dans une solution de 50 % acétonitrile et 0,1 % d'acide acétique. Les matrices étaient CHCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique), DHB (acide 2,5-Dihydroxybenzoïque), SA (acide sinapinique) et 1,5-DAN (1,5-diaminonaphtalène). Des analyses en SALDI ont également été effectuées, et dans ce cas, la matrice était composée d'une suspension de nanoparticules d'or à saturation dans du tampon de citrate de sodium. Les échantillons mélangés à la matrice ont été introduits dans un Bruker Solarix XR FT-ICR MS 9,4 Tesla Bruker équipé de sources d'ions ESI et MALDI pour être analysés.

7. Analyses statistiques

Les boxplots ont été obtenus à l'aide de la fonction `boxplot` du package `ggplot2` sur le logiciel Rstudio. Pour les calculs des différences significatives, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé, et les résultats obtenus à l'aide de la fonction `dunn.test` du package `dunn.test`.

Le triangle plot a été obtenu avec la fonction `ggtern` et les packages `rstudioapi`, `this.path()`, `dplyr` et `ggtern`.

Chapitre III

Constitution d'un milieu de culture pour l'étude de l'assimilation du fer chez *Mh JM1*

1. Contexte

Au démarrage de cette étude, le milieu EMS utilisé en routine pour la culture de *Mh* JM1 a été modifié car le tampon tris interfère avec la détection des sidérophores par spectrométrie de masse. De plus, la composition de ce milieu est assez éloignée de celle de l'eau de mer proposée par Millero *et al.*, 2008. Deux étapes ont été réalisées successivement : la suppression du tampon et la modification de la composition du milieu. Afin de vérifier si ces changements étaient compatibles avec la culture de *Mh* JM1, des suivis de croissance planctonique et biofilm ont été réalisés. Comme la biomasse de ces deux modes de croissance a été quantifiée par deux méthodes différentes, mesure de la DO_{600nm} pour les planctoniques et dosage du cristal violet retenu par les biofilms à DO_{595nm} pour les biofilms, un facteur de corrélation entre les deux mesures a été établi permettant la conversion des valeurs de DO_{595nm} en DO_{600nm} (voir paragraphe 2.3 du chapitre 2 Matériel & méthodes). La courbe de corrélation obtenue est présentée en **Figure III.1**. Les croissances sont donc ci-après exprimées en DO_{600nm} pour les cultures planctoniques et biofilms.

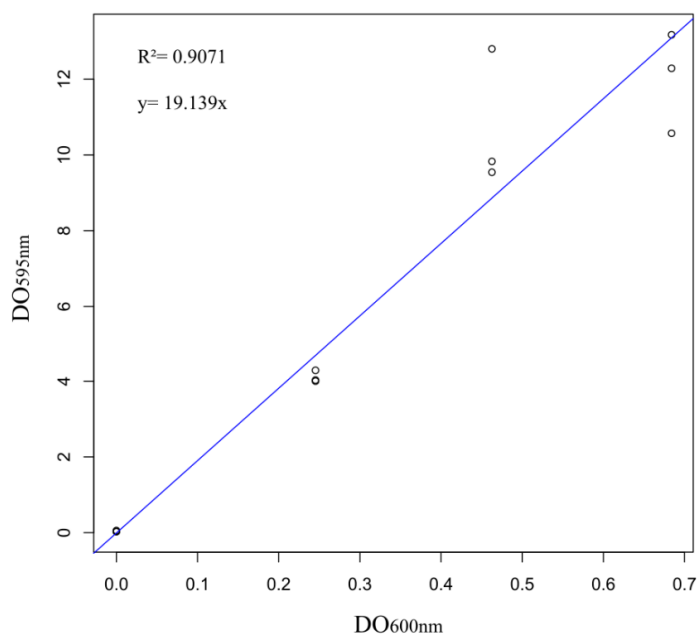


Figure III.1. Courbe de corrélation entre la DO_{600nm} des cellules planctoniques et la DO_{595nm} des cellules en biofilm.

Les cellules ont été cultivées 48h sous forme planctonique en milieu EMS. Le R² et l'équation de la pente sont indiqués sur la figure. Réalisé sur trois répliqués.

2. Suppression du tampon

La première étape a été de modifier le tampon présent dans l'EMS. Plusieurs alternatives ont été testées : réduction à 5 mmol.L^{-1} de la concentration en Trizma base au lieu de 50 mmol.L^{-1} , le remplacer par un tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) à 20 mmol.L^{-1} ou un tampon carbonate ($\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$) à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ou encore la suppression totale de tampon. Des expérimentations de suivi de croissance planctonique et biofilm durant 24h de *Mh JM1* ont alors été réalisées afin de trouver la meilleure alternative. Les résultats sont présentés dans les **Annexes 1** et **2** des Annexes. Tant en croissance planctonique que biofilm, les meilleures alternatives sont de réduire la quantité de Trizma base à 5 mmol.L^{-1} ou de retirer totalement le tampon. Dans les deux cas la croissance de *Mh JM1* est identique à celle obtenue en EMS normal. La solution la plus simple a alors été retenue : ne pas ajouter de tampon pour éviter toute interférence avec les analyses chimiques. Le fait de retirer le tampon permet également de s'approcher des conditions environnementales. Le pH a toutefois été mesuré en fin de culture pour vérifier si l'absence de tampon ne conduit pas à une acidification ou une basification du milieu durant la croissance. Il se situait à chaque fois entre 7 et 8, soit proche du pH de l'EMS (7,8).

3. Modification de la composition ionique du milieu de culture

Tableau III.1. Concentration des principaux ions dans l'eau de mer, l'EMS et le MEM.

Élément	Eau de mer		EMS		MEM	
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹
Na ⁺	10,78	0,47	16,10	0,70	10,95	0,48
Cl ⁻	19,35	0,55	24,28	0,68	18,13	0,51
SO ₄ ²⁻	2,72	0,028	6,25	0,065	2,54	0,026
Mg ²⁺	1,28	0,053	1,58	0,065	1,30	0,054
K ⁺	0,40	0,010	0,42	0,011	0,41	0,010
Ca ²⁺	0,41	0,010	0,40	0,010	0,40	0,010
NH ₄ ⁺ *	3,61x10 ⁻⁶ - 14,43x10 ⁻⁶	0,2x10 ⁻⁶ - 0,8x10 ⁻⁶ *	1,01	0,056	1,0	0,055

* Les concentrations en NH₄⁺ sont variables dans l'océan. Les valeurs sont issues de (Bianchi *et al.*, 1997).
Les concentrations des autres ions sont issues de (Millero *et al.*, 2008).

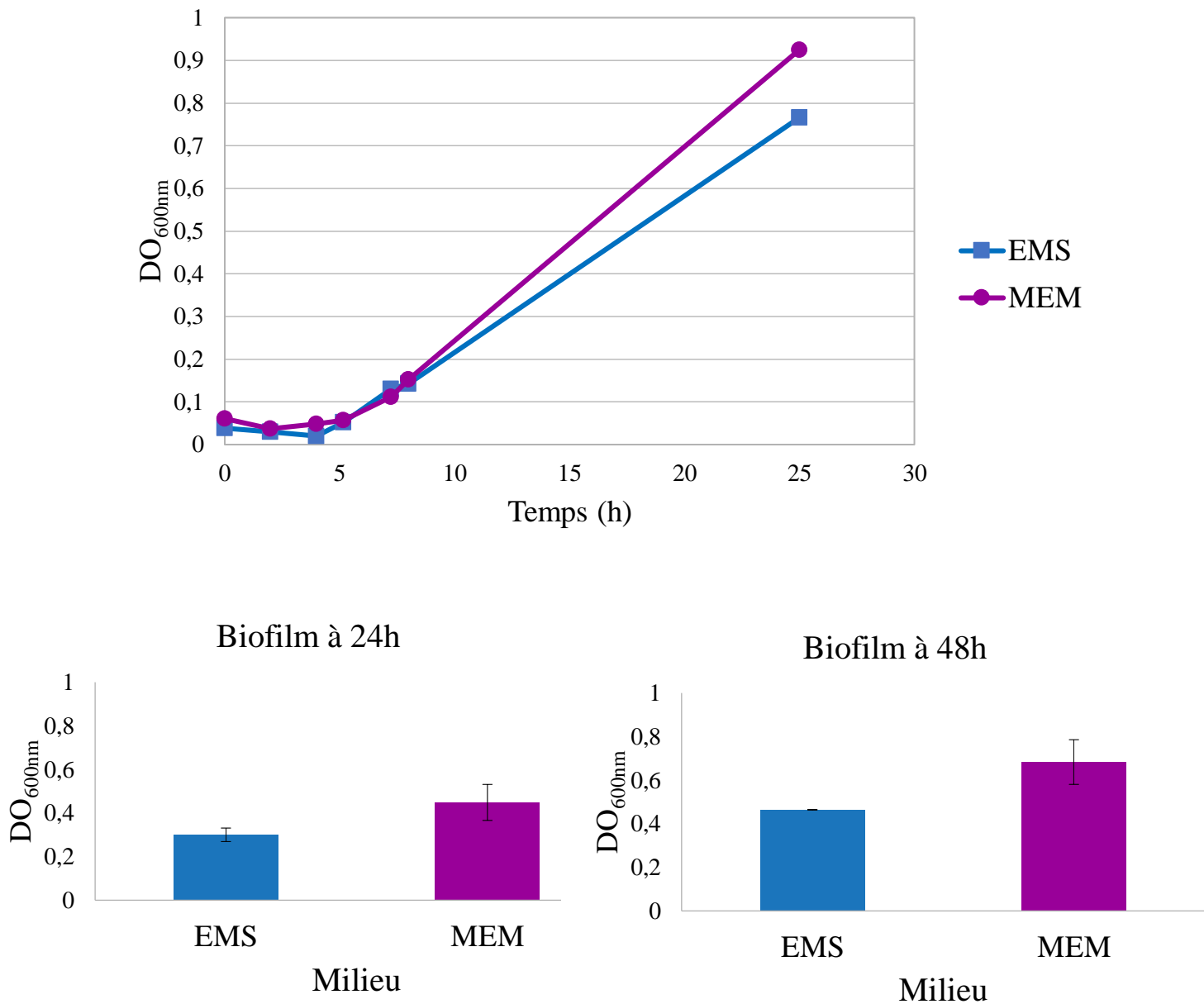


Figure III.2. Comparaison de la croissance de *Mh JM1* en EMS et MEM.

Suivi de croissance de *Mh JM1* en condition planctonique (en haut) et quantification du biofilm formé à 24h et 48h en EMS et MEM (en bas).

Les cultures planctoniques ont été réalisées avec un seul réplicat et les cultures de biofilm avec trois réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

La deuxième étape a consisté en une modification de l'EMS pour s'approcher au maximum de la composition ionique de l'eau de mer. Ainsi, un nouveau milieu appelé milieu eau de mer (abrégé MEM), a été élaboré. Pour cela, les concentrations de plusieurs sels ont été modifiées comme indiqué dans le **Tableau III.1**, qui compare les concentrations des éléments majeurs contenus dans les milieux EMS et MEM à la composition de référence de l'eau de mer (Millero et al., 2008). De la même manière que lors de la modification du tampon, des mesures de la croissance planctonique à 24h et biofilm à 24h et 48h ont été réalisées. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus en milieu EMS pour vérifier si le MEM permettait de cultiver *Mh JM1* de manière satisfaisante. Les résultats sont présentés dans la **Figure III.2**. En condition planctonique (**Figure III.2** en haut), les courbes de croissance en EMS et MEM sont très similaires, avec une biomasse finale proche : 0,76 et 0,92 de DO_{600nm} , respectivement. La **Figure III.2** (en bas), qui présente la quantification des biofilms au bout de 24 et 48h, montre que *Mh JM1* produisait plus de biofilm en MEM qu'en EMS. En effet, à 24h la quantité de biofilm formé en MEM était de 0,45 contre environ 0,3 de DO_{600nm} pour l'EMS. À 48h il y avait toujours plus de biofilm en MEM qu'en EMS, environ 0,65 contre 0,45 de DO_{600nm} , respectivement. Le pH a été mesuré après les expérimentations et se situait entre 7 et 8.

Pour conclure, le milieu MEM est donc bien adapté à la culture de *Mh JM1* et est plus proche de la composition de l'eau de mer. Les analyses d'ICP-MS sont désormais possibles, à la différence du milieu EMS. L'objectif de ce travail est d'étudier les besoins en fer de *Mh JM1* dans différentes conditions. Par conséquent, il est primordial de pouvoir contrôler la concentration en fer.

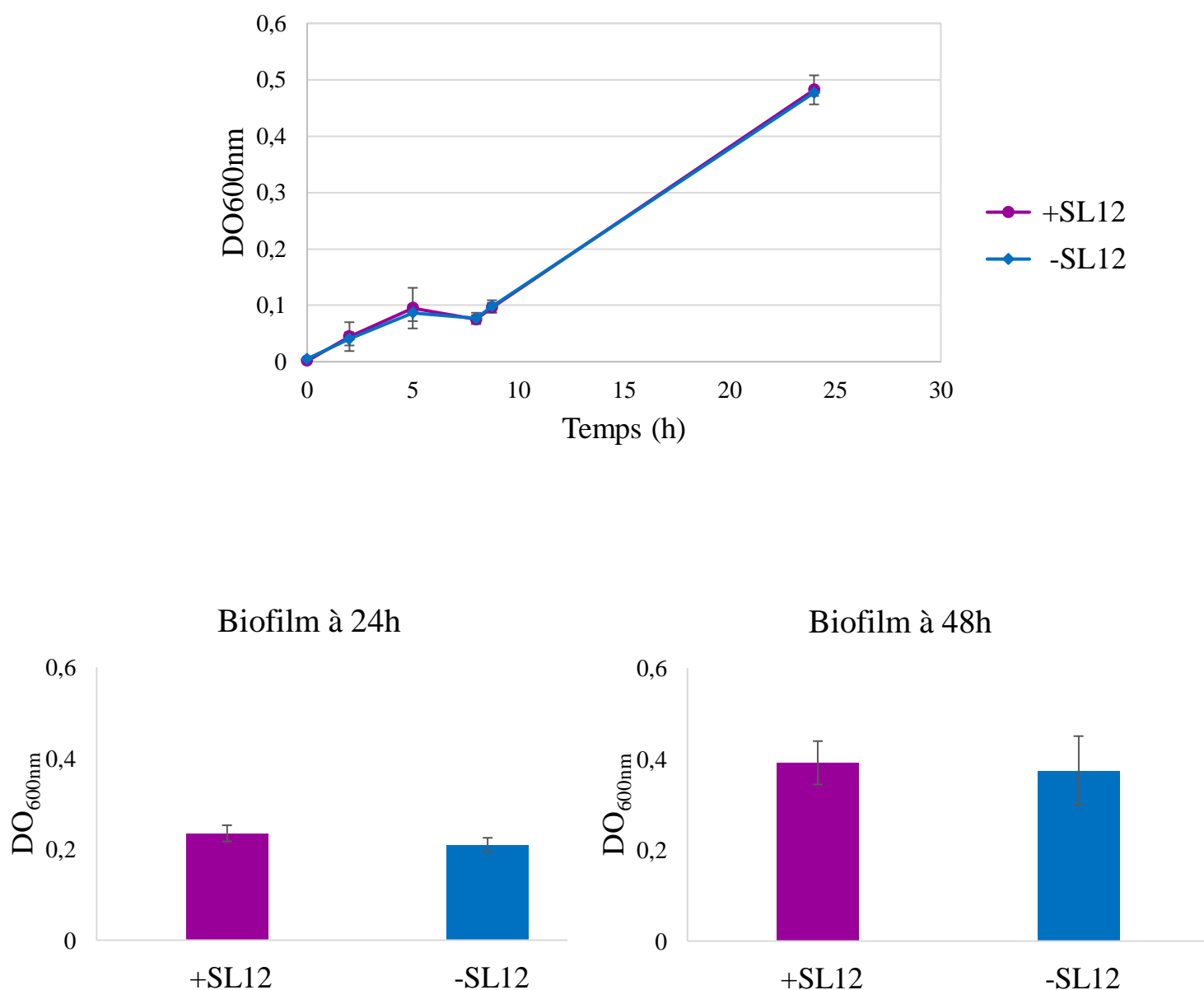


Figure III.3. Croissances de *Mh JM1* avec ajout ou non de solution SL12 après élimination des résidus de fer dans le milieu de culture par la résine Chelex-100.

Suivi de croissance de *Mh JM1* en milieu MEM avec ajout ou non de la solution SL12 dans le milieu de culture en condition planctonique (en haut) et quantification du biofilm formé à 24h et 48h (en bas).

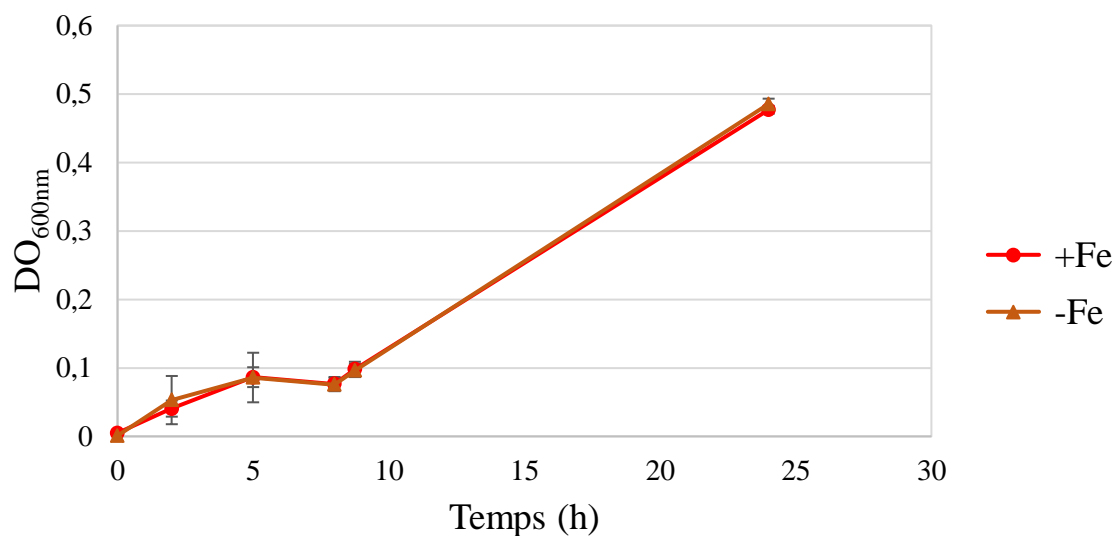
Les barres verticales représentent les barres d'erreur. Réalisé sur trois réplicats.

4. Mise au point des conditions de carence en fer

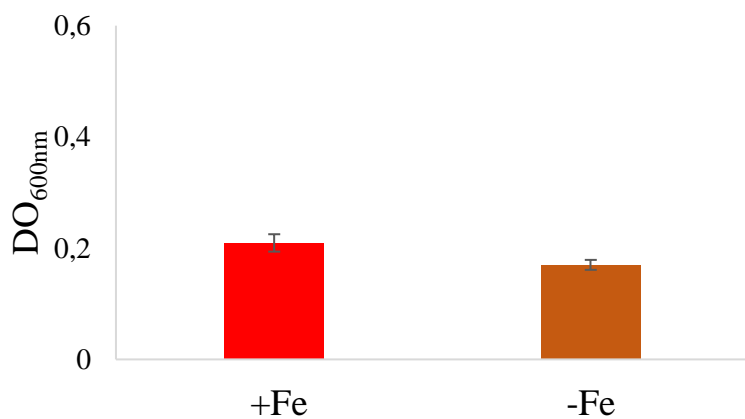
Afin de contrôler la concentration en fer, la contamination en cet élément issue de la vaisselle ou des impuretés dans les produits chimiques commerciaux a été éliminée à l'aide de la résine Chelex-100. Cette dernière a une grande affinité avec les cations divalents et du fait de cette forte affinité, les métaux se lient à la résine et sont ainsi supprimés du milieu. Toutefois, il est possible qu'en plus du fer, cette résine retire également les oligo-éléments présents dans le milieu, indispensables pour la croissance de *Mh JM1*.

4.1. Étude de la déplétion en oligo-éléments par la résine Chelex-100

Pour vérifier si la résine Chelex-100 retire les oligo-éléments présents dans le milieu, la croissance de *Mh JM1* a été suivie avec ajout ou non de la solution SL12 (CuCl_2 $88 \mu\text{mol.L}^{-1}$, NiCl_2 $194 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Na_2MoO_4 $103 \mu\text{mol.L}^{-1}$, ZnCl_2 $336 \mu\text{mol.L}^{-1}$, MnCl_2 $505 \mu\text{mol.L}^{-1}$, CoCl_2 $505 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dans la culture. Cette solution SL12 contient tous les oligo-éléments nécessaires à *Mh JM1*. Les croissances sous forme planctonique et biofilm sont présentées dans la **Figure III.3**. Tant en mode planctonique que biofilm, le développement de *Mh JM1* était identique que la solution SL12 soit ajoutée ou non dans le milieu de culture, indiquant que les organismes n'étaient pas carencés en oligo-élément, malgré l'utilisation de la résine Chelex-100. Par conséquent, la solution SL12 n'a plus été ajoutée au milieu de culture durant le reste de ce travail.



Biofilm à 24h



Biofilm à 48h

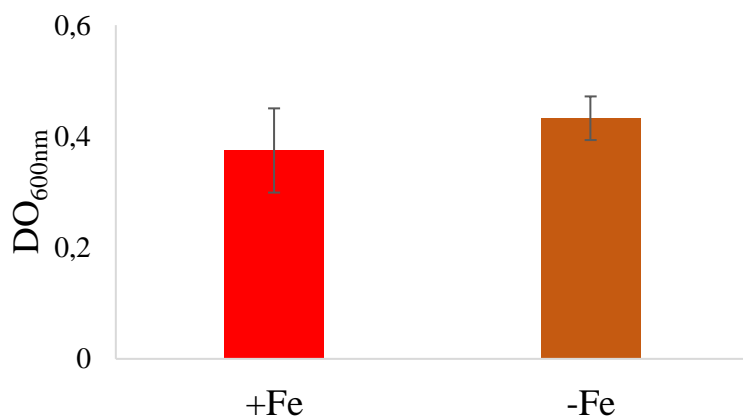


Figure III.4. Croissance de *Mh JM1* avec et sans ajout de fer.

Croissance de *Mh JM1* en milieu MEM avec ajout ou non de fer dans le milieu de culture en condition planctonique (à gauche) et en condition biofilm à 24 et 48h (à droite).

Les barres verticales représentent les barres d'erreur. Réalisé sur trois réplicats. +Fe = 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fer. -Fe = 0,027 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fer.

L'étape suivante a été de vérifier si la résine Chelex-100 permet de retirer efficacement la contamination en fer issue de la verrerie ou des sels. Ainsi, après passage des différentes solutions composants le MEM sur la résine Chelex-100, des suivis de croissances planctonique et biofilm ont été réalisés. Pour préparer les échantillons, une préculture dans du milieu riche en fer ($7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fer ajouté) a été diluée au $1/100^{\circ}$ pour la culture planctonique et diluée de façon à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de départ de 0,1 pour la croissance en biofilm. Les résultats sont présentés en **Figure III.4**. De manière surprenante, les croissances planctonique (**Figure III.4** à gauche) et biofilm de *Mh JM1* (**Figure III.4** à droite) étaient identiques, que du fer soit ajouté au milieu ou non. Ce résultat semble indiquer que ce métal était toujours présent dans le milieu. Pour vérifier cette hypothèse, le fer contenu dans les différents milieux de culture a été quantifié. Lorsque le fer est ajouté dans le milieu de culture, à une concentration théorique de $7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la concentration réelle est d'environ $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. En revanche, sans ajout de fer, la concentration du métal est de 27nmol.L^{-1} . Plusieurs remarques sont à prendre en compte. Lorsque du fer est ajouté au milieu de culture, la concentration attendue est de $7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ or la concentration réelle est environ deux fois plus faible, à $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Une solution de référence dont la concentration exacte en fer est connue a été utilisée pour chaque dosage, les quantités détectées dans les échantillons sont donc fiables. Cette différence entre la concentration théorique et réelle peut s'expliquer par le fait que la poudre de FeCl_3 utilisée pour obtenir la solution mère de fer soit hydratée, faussant ainsi la masse de fer pesée, et de manière logique, la concentration. Néanmoins, une concentration en fer de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ reste largement supérieure celle retrouvée dans les milieux marins, qui est inférieure à 1nmol.L^{-1} (Butler, 1998). Il serait donc peu probable que *Mh JM1* soit carencée en fer à une telle concentration. C'est pourquoi ce résultat ne pose pas de problème majeur pour la suite des expérimentations. Dans la condition où aucun fer n'est ajouté au milieu de culture, la concentration mesurée en fer est de 27nmol.L^{-1} , et même si la **Figure III.4** a indiqué que cette concentration en fer ne limite pas le développement de *Mh JM1*, nous avons tout de même supposé que cette concentration puisse être suffisamment faible pour réduire la croissance des cellules. Une hypothèse pour expliquer que les organismes ne soient pas carencés en fer dans ces conditions est que durant les cultures de nuit les cellules puissent le stocker, par le biais de protéines telles que les bactério-ferritines (Arosio *et al.*, 2017; Honarmand Ebrahimi *et al.*, 2015), qu'elles pourraient ensuite utiliser lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu qui en est carencé. Ces bactério-ferritines sont d'ailleurs retrouvées chez *Mh JM1*.

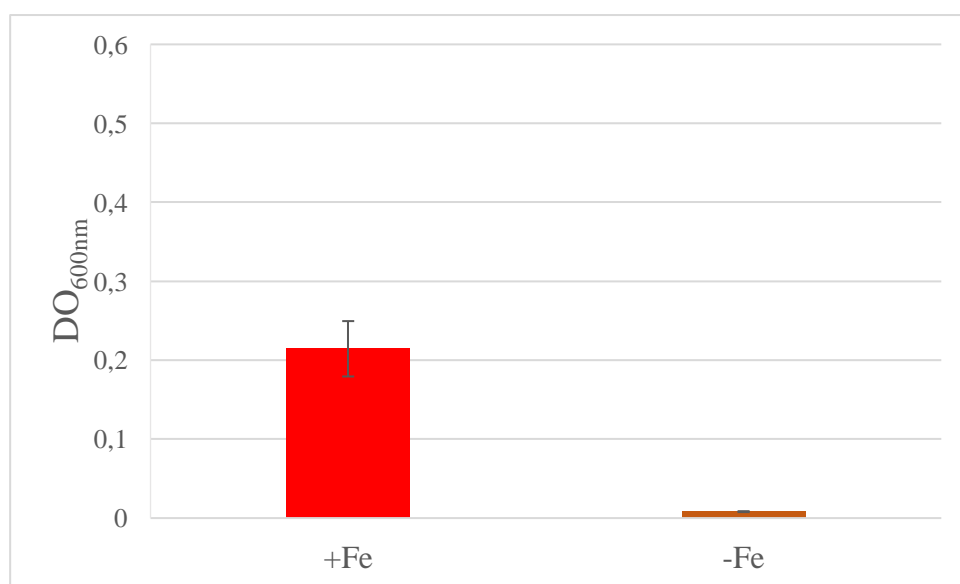
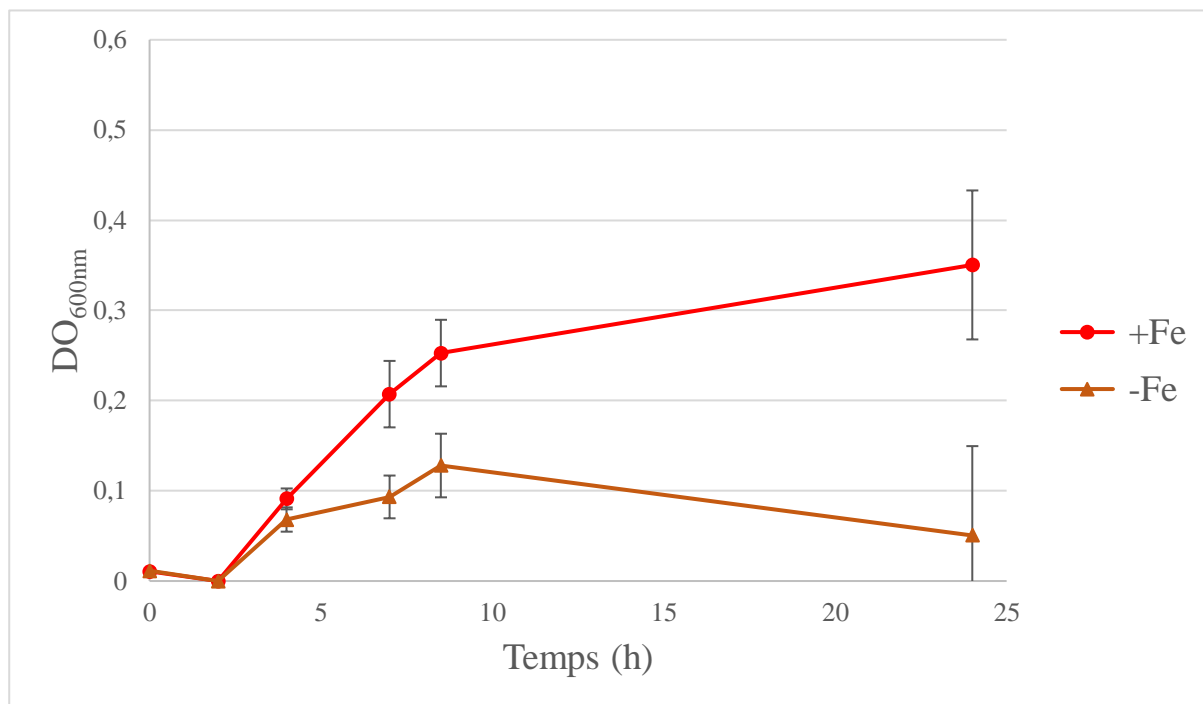


Figure III.5. Croissance de *Mh JM1* avec et sans ajout de fer après avoir réduit la concentration en fer dans la préculture.

Comparaison de la croissance planctonique (en haut) et de la croissance en biofilm (en bas) de *Mh JM1* avec ajout ou non de fer dans le milieu de culture.

Les barres verticales représentent les barres d'erreur. Réalisé sur trois réplicats.

4.2. Préparation de l'*inoculum* pour éviter le stockage du fer par *Mh JM1*

Pour vérifier si *Mh JM1* est capable de stocker du fer lors d'une culture dans un milieu où la concentration en fer est élevée, des cultures de nuit inoculées à partir d'une colonie sur boîte EMS ont été réalisées dans du MEM avec une concentration réduite en fer, à 720 nmol.L⁻¹ ainsi qu'à 72 nmol.L⁻¹. Les DO_{600nm} des cultures de nuit ont été mesurées et sont de 0,2 pour la culture avec 720 nmol.L⁻¹ de fer, et 0,03 pour la culture avec 72 nmol.L⁻¹ de fer (données non présentées), contre 0,6 pour une culture en MEM avec 7200 nmol.L⁻¹ de fer. A 72 nmol.L⁻¹, la concentration en fer est trop faible, il n'y a pas de croissance. En revanche, à 720 nmol.L⁻¹, la croissance est satisfaisante, bien que ralentie par rapport à une concentration de 7200 nmol.L⁻¹. Pour vérifier si cette préparation de l'*inoculum* permet de limiter la croissance de *Mh JM1* en absence de fer, après avoir réalisé une préculture dans du MEM contenant 720 nmol.L⁻¹ de fer, des suivis de croissance planctonique et biofilm ont été réalisés et sont présentés dans la **Figure III.5**. Après cette préculture appauvrie en fer, les cellules sont lavées une fois afin de ne pas apporter de fer lors de l'inoculation des milieux de culture destinés aux expérimentations. Le taux de croissance de la culture planctonique dans le milieu sans fer ajouté (0,027 µmol.L⁻¹) (**Figure III.5** en haut) est bien plus faible que celui de la croissance dans le milieu avec fer ajouté (3 µmol.L⁻¹), avec une valeur de 0,09 DO.h⁻¹, contre 0,23 DO.h⁻¹, respectivement. Le constat est identique avec la biomasse finale. Dans la culture où le fer n'a pas été ajouté, au bout de 24h, la DO_{600nm} atteint uniquement 0,05 contre 0,35 dans la condition avec fer. Ainsi, concernant la croissance planctonique, la réduction en fer de la préculture permet de limiter la croissance lorsque le milieu est carencé en fer.

La quantification de biofilm à 24h de *Mh JM1* sur paraffine (**Figure III.5** en bas) montre que le biofilm est fortement impacté par l'absence de fer lorsque la pré-culture a été réduite en fer, avec des valeurs de DO_{600nm} de 0,01 dans la condition déplétée en fer contre 0,2 pour la condition avec fer. Il est important de noter qu'une préculture appauvrie en fer engendre une diminution de la quantité de biofilm formé par la suite. En comparant les **Figures III.2** et **III.5**, la quantité de biofilm avec une préculture riche en fer est d'environ 0,45 contre 0,2 avec une préculture réduite en fer. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les cellules n'accumulent probablement plus de fer durant leur préculture et lorsqu'elles sont introduites dans un nouveau milieu, même si celui-ci est riche en fer, elles ont besoin de plus de temps pour se développer car elles doivent acquérir du fer. Néanmoins, bien que cette quantité de biofilm soit moins élevée, limiter l'apport en fer dans la culture de nuit permet ensuite de limiter considérablement la croissance lors de l'expérimentation dans la condition d'absence de fer. C'est pourquoi pour le reste de cette étude, les *inocula* ont tous été préparés

de cette manière. Par la suite, dans chaque expérimentation, pour obtenir des concentrations en cellules satisfaisantes, deux cultures de nuit ont été réalisées, comme indiqué dans le chapitre 2 Matériel & méthodes paragraphe 2.1. La première, en inoculant un clone dans du MEM riche en fer (7200 nmol.L^{-1}), permet d'obtenir un nombre élevé de cellules ayant probablement stocké du fer. Une deuxième préculture, obtenue à partir d'une dilution de la précédente est réalisée dans du MEM avec une concentration réduite en fer (720 nmol.L^{-1}). Le fait de réaliser deux précultures permet d'augmenter de manière significative la concentration cellulaire de la deuxième préculture, sans toutefois permettre aux cellules de stocker du fer et de fausser ensuite les résultats de cultures dans du MEM carencé en fer.

Pour conclure sur cette partie d'ajustement du milieu de culture, ce dernier est désormais plus proche de la composition de l'eau de mer et permet de cultiver *Mh JM1* en de bonnes conditions. Limiter la concentration en fer à 720 nmol.L^{-1} dans l'*inoculum* a permis d'éviter que les cellules puissent, probablement, réaliser des réserves de fer et de les utiliser plus tard, faussant ainsi les études de l'influence du fer sur la croissance. Il est désormais possible de réaliser des milieux avec différentes concentrations en fer afin d'obtenir la concentration limitante pour la croissance.

Chapitre IV
Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes
d'acquisition de ce métal selon le substrat
chez *Mh* JM1

Préambule

Ce chapitre contient les résultats principaux de ce travail de recherche concernant l'importance du fer en fonction du mode de croissance et l'étude des mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh* JM1. Des expérimentations ont été menées dans le but de comparer les besoins en fer en fonction de différentes sources de carbone. Ces dernières sont soit solubles, impliquant une croissance planctonique, soit insoluble, auquel cas les cellules se développent en biofilm. Ainsi, *Mh* JM1 a été cultivée sur ces substrats à différentes concentrations en fer. Les systèmes d'acquisition chez cet organisme ont également été recherchés. Deux ont été mis en avant, l'un impliquant l'utilisation d'un sidérophore, la pétrobactine, et l'autre, faisant intervenir une protéine de transport membranaire. Des mutants incapables d'utiliser l'un de ces deux mécanismes ont été créés et leur phénotype comparé à celui de la souche sauvage.

La partie présentée ci-dessous inclue des mesures de biomasse de mutants ne produisant plus la pétrobactine ($\Delta asbABF$) ou FbpA ($\Delta fbpA$). Les valeurs indiquées sont uniquement celles après 120h de croissance, alors qu'elles ont également été relevées à 24h et 48h. Ces données ne seront pas reprises dans ce manuscrit, mais les résultats sont présentés dans les **Annexes 6, 7 et 8**.

Le but de cet article est de fournir une première approche des mécanismes mis en jeu dans l'acquisition du fer chez *Mh* JM1. La soumission de nos travaux n'a pas encore été faite au jour où ces lignes sont écrites, mais le sera très prochainement. Une partie de résultats complémentaires, qui ne seront pas ajoutés à cet article sont également présentés dans ce chapitre.

The nature of the carbon source modulates the iron requirement and the acquisition systems of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Kilian Ducos, Florence Hakil, Francisco Calderon, Katarzyna Kinska, Isaura Caceres, Laurent Ouerdane, Sophie Nolivos, Ryszard Lobinski and Régis Grimaud.

CNRS/Université de Pau et des Pays de l'Adour/E2S UPPA, IPREM UMR5254, Pau, 64000, France.

Abstract: Iron concentration in seawater is low and not directly available. Consequently, iron availability controls, in part, the microbial activity and the cycling of major elements like carbon. The use of siderophores by marine bacteria to acquire iron has been recognized now for decades as a way to overcome the poor availability of this metal. In contrast, much less is known about the impact of iron limitation on cell physiology especially in regard of the growth mode: planktonic or biofilm. We used as a model *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, that grows on acetate as planktonic population and on alkanes and triglycerides through biofilm formation. We observed that planktonic growth requires higher iron concentration than biofilm growth, which could be due to differences in iron demand and/or in the efficiency of iron uptake. The siderophore was purified, allowing its quantification in the extracellular medium and mutants unable to produce the siderophore or to transport free iron were constructed. Thereby, the siderophore is mainly produced at low iron concentration, and the two mutants are able to grow, although to a lower extent than the wildtype. In conclusion, the substrate nature modulates the iron concentration requirement and several mechanisms are involved in iron transport.

Keywords: Iron; siderophore; marine bacterium.

1. Introduction

In oceans, remineralization of the organic carbon into CO₂ occurs mostly through the respiration of heterotrophic bacteria that degrade the organic matter released by lysed or decaying phytoplankton cells [1]. The greatest part of the heterotrophic activity resides in the particulate fraction of the organic matter consisting of aggregated compounds (mostly proteins, polysaccharides and lipids). To take advantage of these transient occurrences of high-nutrient niches, some heterotrophic bacteria adhere and colonize the organic particles that constitute nutritive surfaces [2]. Metal availability, particularly iron, is expected to have a strong impact on organic carbon remineralization [3], for instance since respiration is a highly iron demanding process, the respiratory chain alone containing approximately 94% of the cellular iron [4,5]. Furthermore, iron concentration in seawater is characteristically very low (i.e., 0.02 to 1 nmol.L⁻¹) [6], and iron is generally considered as a limiting micronutrient for the growth of microorganisms. In this study, we explore the impact of iron limitation on marine bacteria that feed on nutritive surface through biofilm formation using *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (*Mh*) as a model.

Bacteria of the genus *Marinobacter*, have been detected in a variety of marine habitats, including the deep ocean, coastal seawater and sediment [7]. A genomic analysis of *Mh* VT8 points to a trophic strategy enabling to take advantage of high nutrient niches within a bulk low-nutrient environment, such as in marine snow particles [8]. *Mh* SP17 exhibits a remarkable ability to form biofilms on nutritive surfaces made of nearly water-insoluble compounds like long-chain alkanes (up to 32 carbons atoms), triglycerides, fatty acids and wax esters [9,10]. In these conditions, cells growth occurs only in biofilm. Although some cells are able to detach during biofilm formation and form a planktonic fraction, detached cells are in a particular physiological state and do not divide [9]. This indicates that adhesion to the substrate is an efficient strategy for cells to access all the nutrients required for growth and can be opposed to the exclusive planktonic growth when all the nutrients, particularly carbon source, are water-soluble. In this work, we used biofilm of *Mh* SP17 on alkanes (paraffin) or on a triglyceride (tristearin) as models of biofilm feeding on nutritive surfaces to simulate feeding on organic particles. A proteomic study of biofilm formation by *Mh* SP17 on n-hexadecane revealed that four proteins related to iron acquisition were overexpressed in biofilm on n-hexadecane when compare to planktonic cell growing on acetate [11]: three TonB-dependent siderophore receptor (encoded by *MARHY1035*, *MARHY3135* and *MARHY3432*) and the ferric ion binding protein FbpA (encoded by *MARHY2192*). This observation suggested that iron acquisition is critical for the formation of biofilm on nutritive surface.

Within the *Marinobacter* genus, chemical and genomic analysis evidenced, for all the strains examined, the existence of two types of iron uptake pathway. One pathway involves the production and utilization of native siderophores as well as siderophores produced by other organisms (exo-siderophores). In addition to the siderophore-mediated pathway, all the studied strains possess genes encoding for putative inorganic Fe³⁺ ATP Binding Cassette (ABC) transport systems. Genes of inorganic Fe²⁺ transport systems were not present in the investigated *Marinobacter* genomes [12]. Concerning more specifically the strain *Mh* SP17, it was shown that petrobactin that belongs to the mixed hydroxycarboxylates/catecholates group, is the only known siderophore produced [13]. The biosynthesis pathway of petrobactin was originally characterized, in *Bacillus anthracis*. The enzymes of this pathway are encoded by the six genes *asbA-F* that are organized into one operon [14]. Homologues of *asbA-F* are present in the genome of *Mh* SP17 in the same organization as in *B. anthracis* (**Figure S1**). The particularity of the petrobactin produced by *Mh* is that one or two sulfonate groups can be added to the catechol rings [15,16]. *Mh* SP17 was shown to produce petrobactin and the mono-sulfonated derivative [15] and *Mh* VT8 was shown to produce also di-sulfonated derivative petrobactin [16]. Although it was proposed that sulfonation could affect petrobactin solubility and/or the Fe³⁺ affinity constant, there are actually no clues about its physiological role [16]. FeIII-siderophore complexes across the outer membrane is performed by TonB-dependent transporters (TBDT) that are generally specific of one siderophore [17]. In the periplasm, FeIII-complexes are bound by a substrate binding protein and delivered to the permease component of the cognate ABC transporter [18]. *Mh* SP17 genome contains four putative siderophore TBDTs with one in proximity of the *asbA-F* petrobactin biosynthesis genes cluster, representing thus a good candidate for the petrobactin transporter. In addition to siderophore transport related proteins, *Mh* SP17 produces an *FpbA* protein sharing 85 % of identity with *FpbA* from *M. algicola* DG893 that was shown experimentally to bind Fe³⁺ ions [19]. It is therefore very likely that *FpbA* from *Mh* SP17 possesses the same activity and is part of an inorganic Fe³⁺ transport pathway, possibly siderophore independent.

In this study, we examined the effect of iron limitation on growth in biofilms on nutritive interface and investigated the iron acquisition pathways involved in *Mh* SP17. Our results showed that growth on acetate and alcane required a lower iron concentration in the medium growth on tristearin suggesting that the carbon source modulates the iron needs. We also showed that petrobactin production is regulated by iron concentration and that the ratio petrobactin / petrobactin sulfonate is modulated by the growth conditions. Finally, both petrobactin and *FpbA* pathway have

complementary roles in inorganic iron acquisition in *Mh* SP17, with a slight specificity depending on the growth mode.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and culture conditions

Strains and plasmids used in this study are listed in **Table S1** and **S2**. *E. coli* strains were cultivated at 37°C under shaking at 200 rpm in LB medium or Halo medium (0.17 mol.L⁻¹ NaCl, 11.6 mmol.L⁻¹ Na₃-citrate, 81.6 mol.L⁻¹ MgSO₄, 3.4 mmol.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.17 mmol.L⁻¹ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 5 g.L⁻¹ proteose peptone and 1 g.L⁻¹ yeast extract) supplemented with the appropriate antibiotic when necessary. For maintenance and genetic construction, *Mh* strains were cultivated in Halo medium or SSW medium (NaCl 0.6 mol.L⁻¹, KCl 10 mmol.L⁻¹, Trizma Base 50 mmol.L⁻¹ pH 7.8, NH₄Cl 56 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 427 μmol.L⁻¹, FeSO₄ 7.2 μmol.L⁻¹, MgSO₄ 65 mmol.L⁻¹ and CaCl₂ 13 mmol.L⁻¹). All experiments, requiring a controlled iron concentration, were performed in MEM medium (0.475 mol.L⁻¹ NaCl, 12.5 mmol.L⁻¹ KCl and 32.5 mmol.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 270 μmol.L⁻¹ K₂HPO₄, 10 mmol.L⁻¹ CaCl₂, 25 mmol.L⁻¹ MgCl₂ and 0 to 7200 nmol. L⁻¹ FeCl₃). Glassware and caps were washed in 1 N HCl for one night, rinsed three times with milliQ water and then sterilized in an oven at 170°C for 30 min. Before adding the iron solution, the medium was stirred with Chelex-100 resin (5 g/100 mL) at RT and 80 rpm overnight, filtered on 0.2 μm cellulose acetate filter and iron was added at the wanted concentration. pH was adjusted at 8 with HCl 1 N. Ionic composition of MEM is comparable to that of seawater [20]. SSW and MEM media were supplemented with 20 mmol.L⁻¹ Na-acetate, 20 mmol.L⁻¹ Na DL-lactate or 18.5 mmol.L⁻¹ succinate and 100 μg.mL⁻¹ streptomycin just before experiments. Agar was added to a final concentration of 1.2 % (m/v) for all solid media.

2.2. Biofilm assays

Biofilm and planktonic culture in controlled iron concentration were carried out in 24 wells plates from Evergreen© filled with one mL of MEM medium. Culture of biofilms on solid substrates, paraffin and tristearin, were carried out in wells with the bottom coated with the substrate. 0.2 g of substrate per well was melted at 85°C for 1h and then cooled down at room temperature for solidification. *Mh* strains were grown overnight in MEM medium with 7.2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of iron. This culture was used to inoculate, at a 1/100 dilution, a second overnight culture in MEM at 0.72 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of iron. The second culture was centrifuged at 8000 rpm for 10 min, the pellet was washed in one volume of MEM medium and resuspended in the volume of MEM required to reach an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 10. The cell suspension was used to inoculate to a final $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.1 the wells containing 1mL of MEM at different iron concentrations. Plates were incubated at 30°C (static) during 120 h. After incubation, culture medium from each well was carefully withdraw and the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was read. Then, wells were washed with 2 mL of milliQ water and 400 μL of 0.1% (m/v) crystal violet was added and incubated at room temperature for 3 min. The crystal violet solution was discarded and the wells were washed twice with 1 mL milliQ water. Crystal violet was eluted from the wells with a 50% ethanol and 10% acetic acid solution. The absorbance of the elute was read at 595 nm.

2.3. Construction of mutants

Mutant constructs were performed in *Mh* JM1 carrying the mutation *rpsLK58T*, conferring resistance to streptomycin, via homologous recombination using pSN77, derivated of pSEVA 211, as suicide vector where the *rpsL* gene from *Mh* SP17 was added [21]. The mutant construction is detailed in the supplementary materiel & methods.

2.4. Petrobactin detection and quantification by LC-ESI-MS

LC-ESI-MS (Liquid-Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) analysis were performed using Thermo LC system. The sample preparation was performed by SPE (solid phase extraction) type extraction on line, using a SPE column Oasis HLB Direct Connect HP 20 μm , 2.1x300 mm On-Line, Waters (Ireland). SPE mobile phase was 5 mmol.L^{-1} ammonium formate and 0.3 % formic acid. The injection volume was 2 mL and the flow rate 1 mL.min^{-1} . Chromatographic separation was realized by HPLC using a reverse phase column Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 x 150 mm, Waters (Ireland). Mobile phase A was 5 mmol.L^{-1} ammonium formate and 0.3 %

formic acid 0.3%. Mobile phase B was composed of a 90:10 ratio of acetonitril:methanol and 0.3 % formic acid. Flow rate was $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the gradient was: 0-5, 5-5, 7-50, 8-50, 10-95 (time, min -% acetonitrile). The temperature of the column was 40°C .

For petrobactin quantification, the purified samples containing the siderophore were dried and then weighted before and after adding MQ water (I. Caceres, K. Kinska *et al.*, unpublished data). The standards obtained were then analyzed in the same way as the samples.

2.5. Statistical analysis

Graphs and statistical analysis were done using RStudio software. Boxplots were realized with the `boxplot` function and ternary plot with the `ggtern` function of the R package `ggplot2`. Statistical analyses were done with the functions `Kruskal.test` and the results generated with the function `dunn.test` of the package `dunn.test`.

3. Results

3.1. Carbon source and lifestyle modulate the expression of genes encoding iron-containing proteins

In a previous transcriptomic study using the DNA-microarray technology, Mounier *et al.* [10] compared the gene expression profile of *Mh* SP17 planktonic cells growing on acetate to that of biofilm cells growing on an alkane (*n*-hexadecane) or a triglyceride (trioleine). Triolein and *n*-hexadecane being liquid at 30°C, biofilms developed at liquid-liquid interfaces. In this study, iron was provided as FeCl₃ at the concentration of 7200 nmol.L⁻¹. We used a subset of the original data to gain insight into the relative expression of iron containing protein genes, hereafter called iron genes, in acetate, triolein and *n*-hexadecane conditions. Iron containing proteins of *Mh* SP17 were retrieved from the Uniprot database using a keyword search and in addition, iron-sulfur proteins were identified using in the ISPH database [22]. Annotations of all retrieved proteins were manually checked to ensure that they were iron containing proteins including heme proteins, iron-sulfur proteins and iron ion binding proteins. A total of 142 iron-containing proteins were selected for expression analysis (**Table S4**). Using a bioinformatic approach Andreini *et al.* [23] found that, in bacteria, non-heme iron binding proteome constitutes on average 4 % of the entire proteome. In a systematic analysis of enzymes with known structure, the same authors estimated that about 10% of the enzymes rely on iron for their activity [24]. The number of iron containing proteins identified in *Mh* SP17 proteome is consistent with the above prediction taking into account that *Mh* SP17 genome contains 3802 CDSs (coding sequences) among them 1 263 are annotated as enzyme.

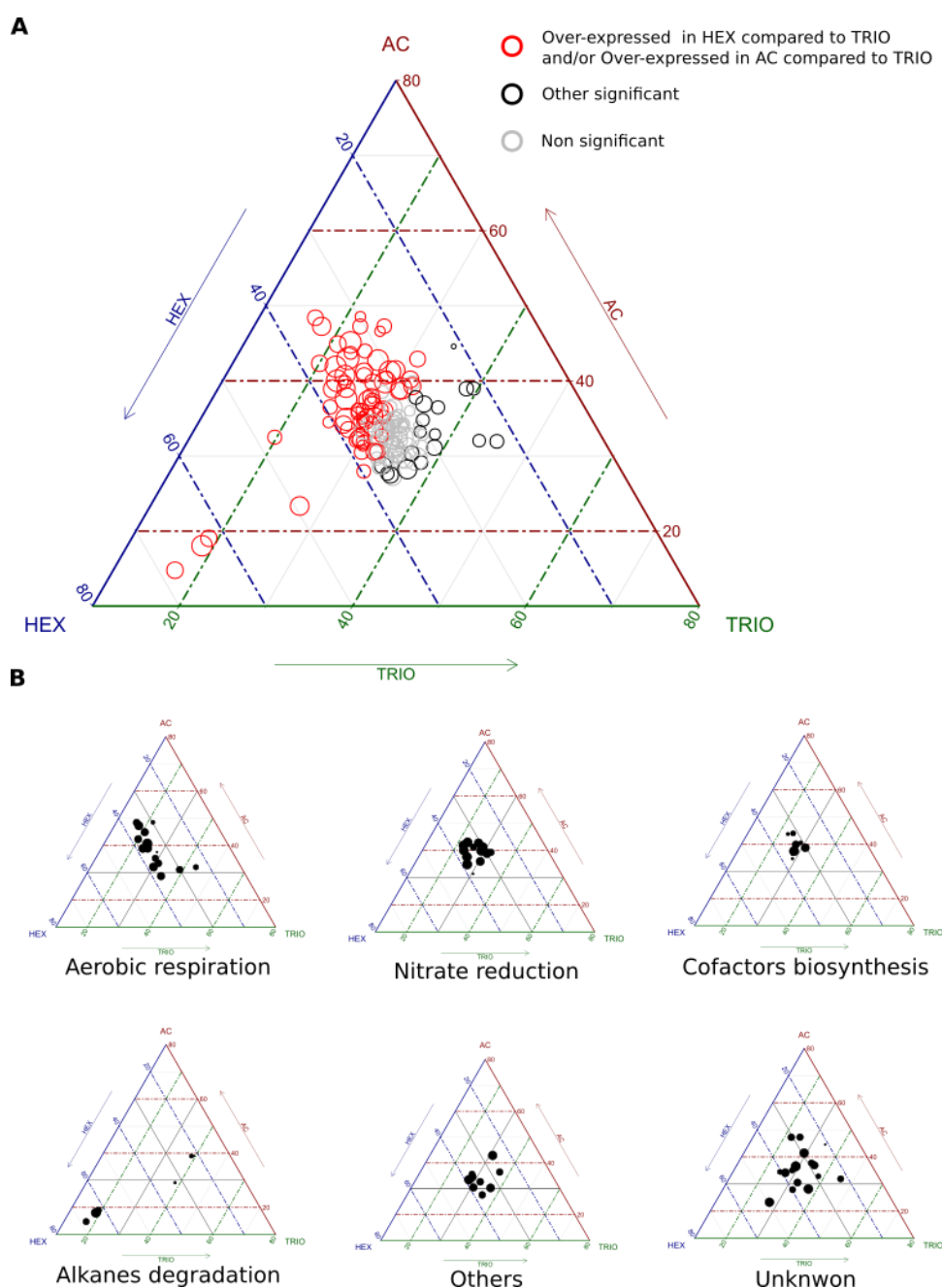


Figure 1. Relative expression of genes encoding iron-containing protein in acetate, n-hexadecane and triolein conditions.

Triangle plots display the relative ratios of the expression of iron genes in the three culture conditions: acetate (Ac), n-hexadecane (HEX) and triolein (TRI). The three expressions values of each gene were normalized in order to sum 100 %. Genes are represented by a circle and positioned in the triangle according to their relative expressions between the three conditions. Triangle vertices represent 100 % of expression in one condition. Genes overexpressed in one condition are close to the corresponding corner. Circle size is proportional to the

mean of the expression values of the three conditions. **(A)** Triangle plot of the 142 iron genes identified. Red circles: genes that are over-expressed in hexadecane and/or in acetate compared to triolein. Black circles: genes with significant differential expression in at least one condition. Grey circles: genes with no significant differential expression (p value > 0.05). **(B)** Triangles plots of subsets of functional categories of iron genes. Only genes with significant differential expressions are shown.

The relative ratio of iron genes expression between the three different conditions: acetate, *n*-hexadecane and triolein are represented in a triangle plot (**Figure 1A**). In this graph, genes more expressed in one condition compared to the two others are positioned close to the corresponding triangle corner. Genes that are overexpressed in two conditions are close to the triangle sides. Genes in the center had balanced expression levels between the three conditions. On the 142 irons genes, 94 had a biased expression in favor of one or two conditions. This showed that the culture conditions chosen in this study had a significant impact on the expression of most of the iron genes. The conditions that led to greatest number of genes overexpressed were acetate and *n*-hexadecane (56 genes in acetate and 62 in *n*-hexadecane overexpressed compared to at least one other condition). In other words, in triolein most of the genes were underexpressed compared to the hexadecane and acetate conditions (**Figure 1A**). The function of the genes that contributed the most to the biased expression in favor of acetate and *n*-hexadecane were aerobic and nitrate respiration, and cofactors biosynthesis which include [Fe-S] assembly ubiquinone and heme biosynthesis that are required in the respiratory functions (**Figure 1B, Table S4**). As expected, alkanes degradation genes were more expressed in *n*-hexadecane condition.

Transcriptomic analysis showed that expression of genes coding for iron containing proteins were more pronounced in biofilm on *n*-hexadecane and in planktonic cell growing on acetate than in biofilm on triolein, indicating that the carbon source and/or the mode of growth affect the expression of iron containing protein and hence could have an impact on the iron demand. This prompt us to investigate the iron demand in these different growth conditions.

3.2. Biofilm on paraffin or tristearin can grow at lower iron concentration than planktonic cells growing on acetate.

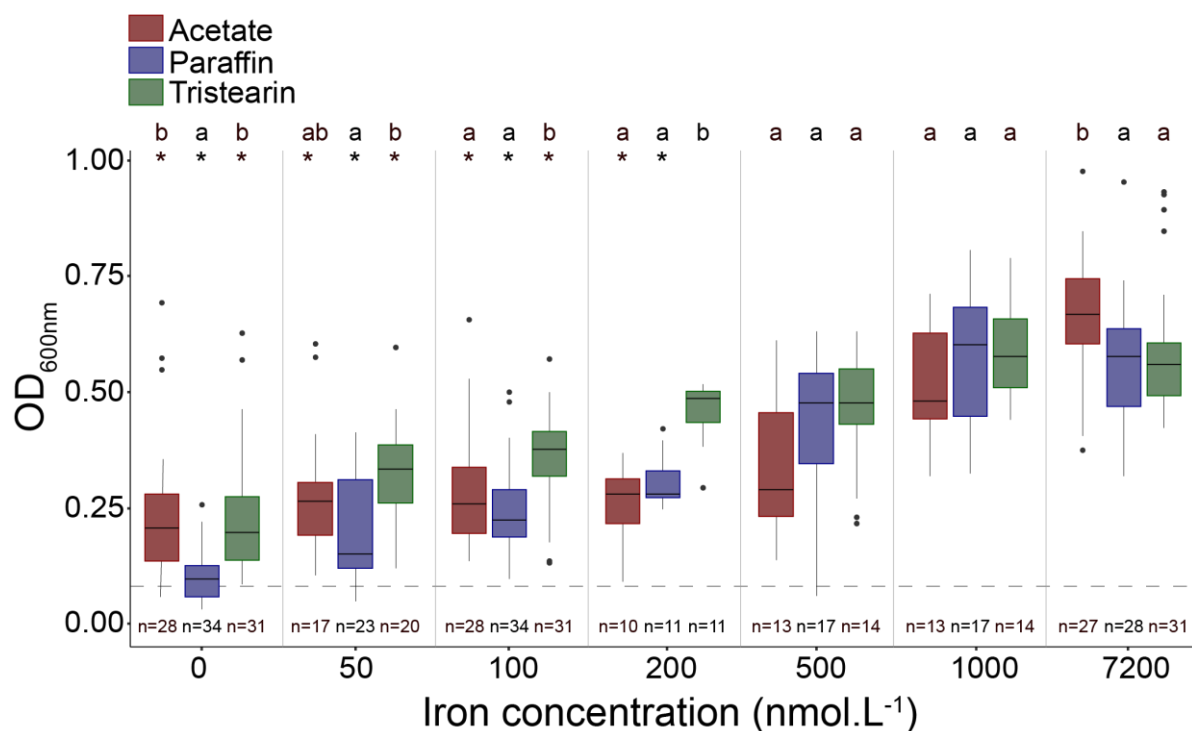


Figure 2. *Mh* JM1 growth yield depending on the iron concentration and the carbon sources.

Box plots represent the total biomass (biofilm and planktonic fractions) at 120h at different iron concentrations in acetate, paraffin and tristearin conditions. A black line indicates the median value and dots indicate outliers. The iron concentrations indicated correspond to the theoretical iron concentrations added to the culture medium. Without iron addition, the iron concentration in the medium was about 20 nmol.L⁻¹. For each experiment, the iron concentration was measured in the culture media to ensure comparable results. The dashed line at an OD_{600nm} of 0.1 represents the starting inoculum. The number of replicates (n=) is indicated for each experiment above the iron concentrations. Asterisks indicate significant difference compared to the value at 7200 nmol.L⁻¹, within each growth condition (Dunn test p < 0.05). For each iron concentration, different letters (a and b) indicate values that are statistically different, ab indicates values that are not statistically different to a nor to b (Dunn test p < 0.05).

The study of the iron demand was carried out in the medium MEM, that had an ionic composition close to that of seawater with iron added as FeCl₃ (**Table S5**, **Figure S3**). The physical state of the iron added in the culture medium was determined. In aerobic condition at pH = 8, Fe³⁺ ions form polymeric ferric hydroxide species that can aggregate to give particles [25]. The particulate fraction (> 0.2 μm) of iron in MEM medium containing 7200 nmol.L⁻¹ of FeCl₃ was determined by filtration at 0.2 μm and quantification of the iron in the filtrate (**Table S6**). About 80 % of iron was present in MEM as particles bigger than 0.2 μm. The 20 % of iron that goes through the filter are likely colloidal because Fe³⁺ ions are nearly insoluble in water in the conditions of MEM medium. Large particles or colloids are believed to be not directly assimilated by bacteria.

To determine the effect of the carbon source and/or the lifestyle on the iron demand, *Mh* JM1 was cultivated as a biofilm on solid nutritive surfaces, paraffin (a mixture of alkanes) or tristearin (a triglyceride) and as planktonic cells on acetate (water soluble) with additions of different FeCl₃ concentrations (**Figure 2**). All the growths were performed in microplates without shaking to ensure that only the growth mode differed between the conditions. The growth yield was measured by quantification of the total biomass after 120h of incubation, which corresponds to the stationary phase in all conditions. In the case of biofilm cultures, the measured biomass included the cells detached from the biofilm. The growth yield was chosen to assess the growth because the growth rate of biofilms was technically difficult to determine, as it requires one culture for each time point.

In the three growth conditions, the growth yield increased with the iron concentration to reach a plateau at a maximum (**Figure 2**). In tristearin condition, the plateau was attained at the iron concentrations of 200 nmol.L⁻¹ since growth yields above this iron concentration were not statistically different from the highest iron concentration. In the cases of paraffin and acetate conditions, the maximum growth yield was attained at iron concentrations above 500 nmol.L⁻¹. Thus, the iron concentration limiting the growth yield was below 200 nmol.L⁻¹ in tristearin condition whereas it was below 500 nmol.L⁻¹ in acetate and paraffin conditions.

At the highest iron concentration, i.e. 7200 nmol.L⁻¹, cultures in paraffin and tristearin accumulated a similar total biomass while in acetate condition the growth yield was significantly higher. At 1000 and 500 nmol.L⁻¹ of iron, the growth yield was not significantly different between the three conditions. The most striking differences between the growth conditions were revealed at lower iron concentrations. At 200 and 100 nmol.L⁻¹ of iron, the growth yields were higher in tristearin than in acetate and paraffin whereas at 50 and 0 nmol.L⁻¹ (no added iron, corresponding to

about 20 nmol.L⁻¹), the growth yield in tristearin was higher than on paraffin with acetate displaying intermediate growth yields.

The variation of the growth yield as function of iron concentration reflects the iron requirement of the cells that results from the demand of the cellular processes and the uptake ability. Taken all together, the above results made emerge the general trend that the iron requirement was the lowest in tristearin. Iron requirement in paraffin and acetate were more alike although slightly higher in paraffin. However, we acknowledge that the observed differences of the growth yields between the different growth conditions, despite being statistically significant, remained modest.

3.3. Petrobactin is produced at low iron concentration and the proportion of the sulfonated form is lower in biofilms on paraffin and tristearin.

In order to apprehend the reasons for the different effects of the iron concentration variation on biofilm growing on nutritive surfaces and on planktonic cells growing on acetate, we undertook an investigation of the iron acquisition mechanisms. *Mh* JM1 produces the siderophore petrobactin, that is likely to be the only one produced by this bacterium since the result of an ANTISMASH search [26] of the genome did not show any others secondary metabolite biosynthetic genes clusters than that of petrobactin (**Figure S4**).

The petrobactin concentration in culture supernatants was measured by Electro Spray Ionization (ESI) at the two iron concentrations of 100 and 7200 nmol.L⁻¹, hereafter mentioned as iron deplete and iron replete conditions, respectively. The iron replete condition is the iron concentration where the growth yield was maximum whatever the carbon source (**Figure 2**). The iron deplete condition corresponds to an iron limitation allowing for at least one doubling of the population with all the substrates. Both petrobactin and sulfonated petrobactin were detected under all growing conditions, with however, great differences between the iron depleted and iron replete conditions (**Figure 3**). In iron replete condition and whatever the substrate, the mean concentration of the total petrobactin (sulfonated and nonsulfonated forms) was very low ranging from 88 to 358 nmol.L⁻¹. In deplete iron condition, the petrobactin concentrations were higher ranging from 2518 to 4428 nmol.L⁻¹, indicated that petrobactin biosynthesis is regulated by the concentration of iron.

In regard of the carbon source, more of the total petrobactin was produced in culture on acetate, with 4428 nmol.L⁻¹ than in cultures on paraffin or tristearin, which contained 3879 and 2518 nmol.L⁻¹ respectively. Interestingly, the ratio of non-sulfonated to sulfonated forms of petrobactin

varied with the conditions of growth. Cultures of biofilms on n-hexadecane or tristearin contained less than 5 % of sulfonated petrobactin while in culture on acetate the sulfonated form accounted for more than 75 % of the petrobactin. The increase of the amount of petrobactin produced in response to low iron concentration and the modulation of proportion of the sulfonated form according to the growth condition argue in favor of a regulation depending on the iron concentration and on the growth mode, with a major role of non-sulfonated petrobactin in iron acquisition in biofilms on nutritive surfaces.

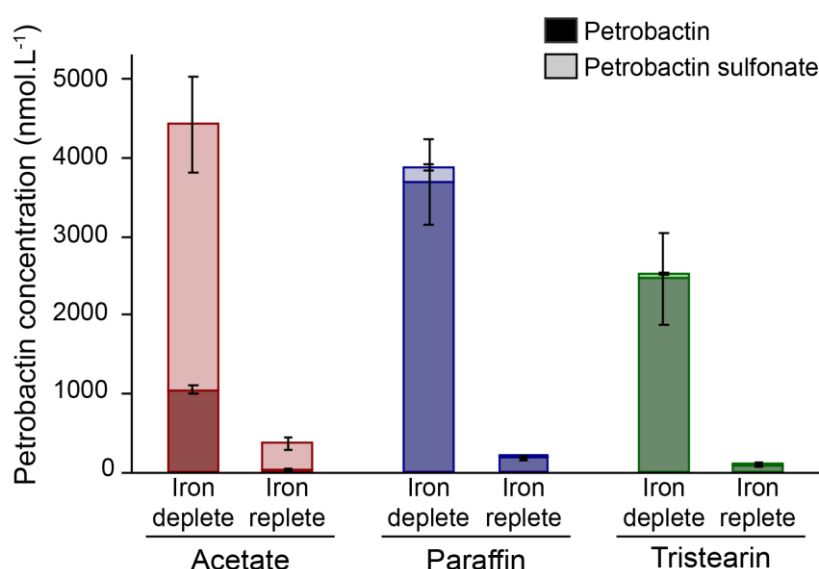


Figure 3. Quantification of petrobactin and petrobactin sulfonate in culture supernatants.

Petrobactins was quantified using ElectroSpray Ionization after 120h of growth with acetate, paraffin or tristearin as carbon source, in iron deplete and iron replete conditions. For each stacked column, the mean concentration of petrobactin is represented in dark colour (bottom) and the mean concentration of sulfonated petrobactin in light colour (top). The bars represent the standard deviations of 5 to 6 replicates.

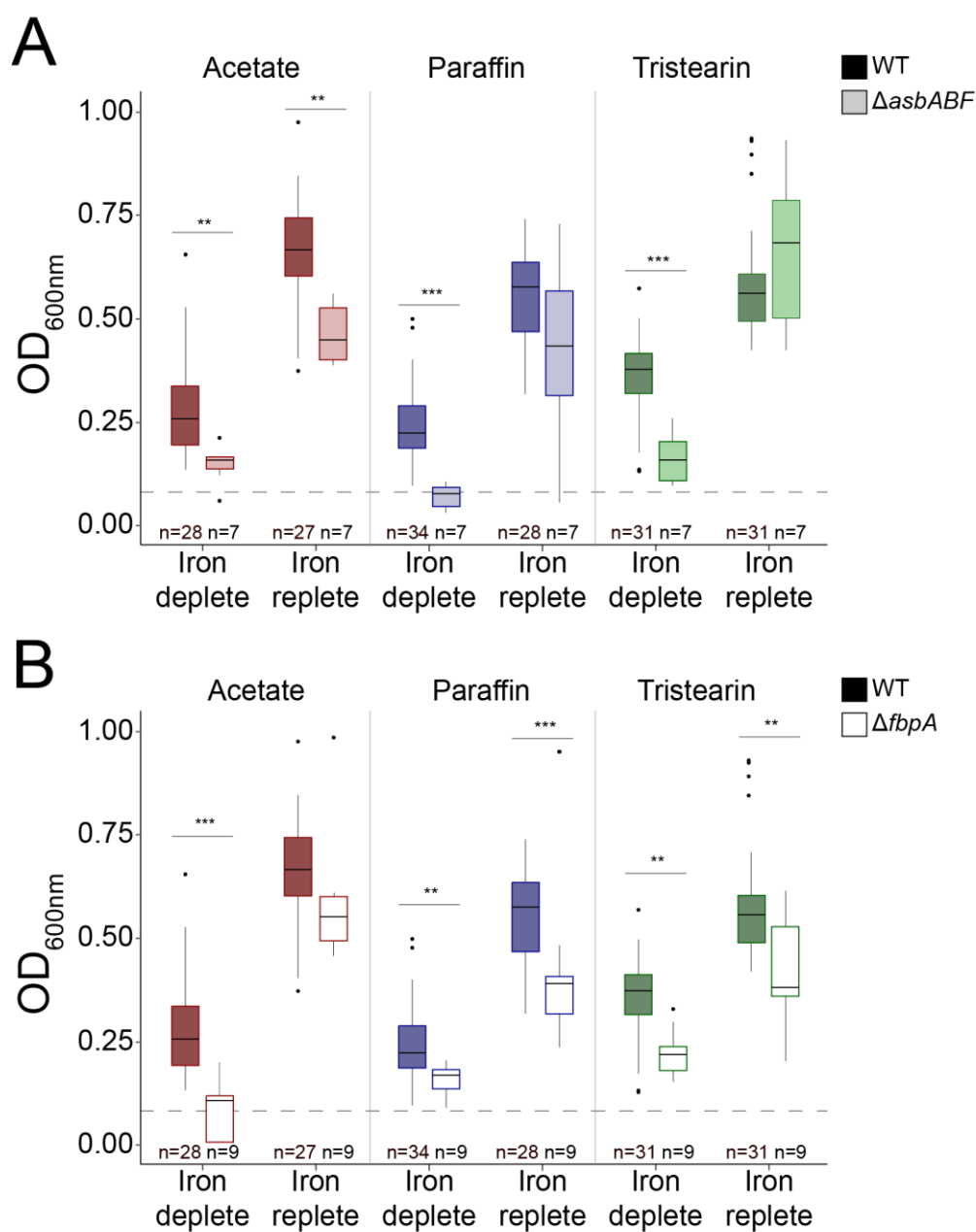


Figure 4. Growth yield of iron acquisition defectives mutants.

Mh JM1 (WT) and derivated mutants, petrobactin non producer $\Delta asbABF$ (A) and FbpA non producer $\Delta fbpA$ (B) were grown for 120h in MEM, medium in iron deplete or replete condition, with acetate (left panel), paraffin (middle panel) or tristearin (right panel) as carbon source. The OD_{600nm} corresponds to the total fractions of biomass (addition of biofilm fraction and planktonic fraction). Dashed line represents the inoculum (starting OD_{600nm} of 0.1). The total number of replicates is indicated below each boxplot. Asterisks show a statistically difference (Dunn test) between the growth of the wildtype and the mutant. ***, $P \leq 0.0001$; **, $0.0001 < P \leq 0.005$; *, $0.005 < P < 0.05$.

3.4. At low iron concentration, petrobactin is involved but not essential in iron acquisition in biofilms on paraffin or tristearin

To further determine in which conditions petrobactin was required, a mutant unable to produce petrobactin was constructed. To ensure that no intermediate of the petrobactin biosynthesis that could have a siderophore activity was produced, three genes of petrobactin biosynthesis cluster, *asbA*, *asbB* and *asbF* were deleted. The absence of petrobactin and its intermediates was controlled by LC-ESI-MS (**Figure S5**).

In iron deplete condition, the growth yield of the $\Delta asbABF$ mutant was lower than the wild type in the three growth conditions, indicating that petrobactin is involved in iron acquisition in all iron depleted conditions (**Figure 4A**). However, petrobactin did not appear essential, as the growth of the mutant was not completely abolished in biofilm on tristearin and in acetate culture. In iron replete conditions, the $\Delta asbABF$ mutant exhibited a significant lower growth yield than the wild type only in the acetate condition. This indicates that in iron replete condition petrobactin is involved in iron uptake only in acetate and not in paraffin and tristearin conditions. It is to note that the $\Delta asbABF$ mutant growing in biofilm produced few detached cells compared to the wild type (**Figure S6**). This suggested that the lack of petrobactin could at least partially be compensated by adapting the mode of growth and is in accordance with a role of petrobactin during planktonic growth in replete conditions. The ability of $\Delta asbABF$ mutant to grow, suggested also the existence of a petrobactin independent iron uptake pathway.

3.5. The ferric ion binding protein, FbpA is involved in iron acquisition in biofilms on paraffin and tristearin conditions

The genome of *Mh* JM1 contains four putative siderophore TBDTs, indicating that this bacterium is able to use others native or exo-siderophores (**Figure S7**). Exo-siderophores are certainly not involved in the experiments of this work since they were carried out with a pure strain. Native siderophores, other than petrobactin are unlikely since no other siderophore biosynthetic gene cluster could be identified and during petrobactin purification only one compounds with a siderophore activity was detected (unpublished results). This led us to hypothesize the existence of a siderophore independent pathway. The ferric ion binding protein, FbpA, constituted a good candidate for a protein involved in an alternative pathway to petrobactin. To test this hypothesis, a mutant deleted of the *fbpA* gene was constructed. In iron deplete conditions, the $\Delta fbpA$ mutant

exhibited a lower growth yield in all the conditions while in iron replete conditions, the mutant was affected on paraffin and tristearin but presented a growth yield similar to the wild type on acetate (**Figure 4B**). The phenotype of the $\Delta fbpA$ mutant indicated that FbpA is involved in iron acquisition in all the conditions excepted in acetate at high iron concentration. However, the *fbpA* gene is not essential as the deleted mutant was still able to grow.

These results combined to those obtained with the $\Delta asbABF$ mutant suggested that both FbpA and petrobactin play roles in iron acquisition during growth of *Mh* SP17 at low iron concentration, whereas at high iron concentration petrobactin is important for planktonic growth while FbpA is important for biofilm growth. To determine if the petrobactin and FbpA were involved in two different but complementary iron acquisition pathways, the construction of a double mutant $\Delta asbABF, \Delta fbpA$ was undertaken. Despite numerous attempts in various conditions, the double mutant could not be isolated, suggesting that the double mutation is lethal and that consequently, the two pathways are independent and complementary. However, this require further investigation to be demonstrated.

4. Discussion

4.1. Iron requirement is modulated by the nature of growth substrate

In seawater, bacteria that feed on particulate substrates have to face to the low substrate and iron availabilities. To get insight into the iron requirement in biofilm on particulate substrate, the expression of genes encoding iron containing proteins was compared in cells growing in conditions that differed by the carbon source and the life style: planktonic growth on acetate and biofilm growth on triolein or n-hexadecane. It appeared that the growth conditions affected the expression of most of iron genes and more particularly genes of the aerobic and nitrate respiration that were overexpressed in planktonic cultures on acetate and in biofilm on n-hexadecane when compared to biofilm on triolein. This observation suggests that in acetate and n-hexadecane conditions the iron requirement is greater than in tristearin condition. This assumption is supported by the growth yields at low iron concentration that were higher in tristearin than in paraffin and acetate conditions. Although the two substrates, tristearin and paraffin, differed from those used in transcriptomic experiment, they are comparable since tristearin and triolein are both triglycerides differing by one insaturation and paraffin is a mixture of alkanes. Genes expression data and growth yields point to higher iron

requirement in alkane and acetate condition compared to the triglyceride condition. This suggests that the nature of the carbon affects the iron requirement rather than the life style. A high iron requirement in cell growing on alkane is expected as catabolism of alkanes involves several iron-containing proteins like alkanes monooxygenase and the electron transporters ferredoxin and rubredoxin [27,28]. In *Mh* JM1, the genes of the ferredoxin (*fdx*, *MARHY2837*), the terminal alkane-monooxygenase (*alkM*, *MARHY2735*) and the cytochrome P450 alkane hydroxylases (*ahpG2*, *MARHY2838* and *ahpG1*, *MARHY3773*) are overexpressed in n-hexadecane (**Figure 1B** and **Table S4**). High iron demand during alkane metabolism in *Mh* SP17 is further supported by the observation of the overexpression of iron transporters in biofilm on n-hexadecane [11]. However, *alkB* (*MARHY2847*) coding for an alkane-monooxygenase and *alkG* (*MARHY2846*) coding for rubredoxin were under-expressed in n-hexadecane (**Figure 1B** and **Table S4**). Possibly, these two genes could be involved in alkanes metabolism with different chain length specificity. The low iron requirement in biofilm on triglyceride relative to acetate and paraffin remains enigmatic and difficult to interpret in the light of the data obtained here alone.

4.2. Petrobactin is involved in growth in iron deplete condition

The phenotype of the $\Delta asbABF$ mutant (**Figure 4A**), that is unable to produce the petrobactin, showed that the siderophore is involved in growth in all iron deplete conditions. This is consistent with the petrobactin quantification, showing that the siderophore production is much higher (ranging from 2500 to 4400 nmol.L⁻¹) in deplete iron condition than in replete iron condition. As in the case of the cultures on paraffin and tristearin the growth defect of the $\Delta asbABF$ mutant was alleviated by a higher iron concentration, it is very likely that petrobactin is involved in iron uptake when the iron concentration is low. In iron replete conditions, the petrobactin did not appear involved in iron uptake at the exception in acetate condition where the $\Delta asbABF$ exhibited a lower growth yield than the wild type. The involvement of petrobactin in iron replete, acetate condition was unexpected as in this condition the petrobactin concentration was low (358 nmol.L⁻¹). Nevertheless, this petrobactin concentration was two and four times higher than in paraffin and tristearin where the mutation of *asbABF* has no effect on the growth yield. It is therefore, probable that petrobactin plays a role even at low concentration.

Petrobactin is produced under two forms: sulfonated and not sulfonated. The petrobactin sulfonate is the major form in planktonic culture on acetate while it represents only few percent in

biofilm on tristearin or paraffin. The mode of formation of petrobactin sulfonate is unknown. The fact that the amount of petrobactin sulfonate depend on the mode of growth argues in favor of a physiological process rather than a fortuitous reaction of petrobactin with sulfur metabolites present in the cell. Although, sulfonation of siderophore was reported for heterobactin and pyoverdine, the role of this siderophore modification is still unknown [29,30].

Sulfonated petrobactin is more hydrophilic which could be important for its physiological function [15]. For example, a more hydrophilic petrobactin would interact less with aggregated organic matter avoiding thus to be trapped. The catechol siderophore enterobactin has been shown to act as an antioxidant [31]. A such function is conceivable for petrobactin. Sulfonation makes catechol ring more difficult to oxidize [32]. The role of sulfonation could be to make petrobactin more resistant to oxidation and preserve the siderophore activity at the expense of the antioxidant activity. Sulfonation could also impact the affinity of petrobactin for iron. Clearly, determination of the role of sulfonation requires further research to characterize physico-chemical properties of the sulfonated petrobactin, elucidate the mechanism of petrobactin sulfonation with its regulation and investigate the *in vivo* role of sulfonated petrobactin.

The petrobactin quantification (**Figure 4**) in the culture medium indicated that the siderophore is overproduced in iron limiting condition, suggesting its regulation. It is described that the siderophore production is a well regulated system, generally under the Fur (ferric uptake regulator) control [33]. Generally, there is a Fur box close to the gene which is recognized by a complex Fur-Fe²⁺ which binds to the promoter region in order to block the transcription [34] of the siderophore synthesis genes for example. However, there is no obvious Fur box in *Mh* JM1 genome, suggesting it is relatively different from the consensus Fur Box sequence.

As mentioned previously, during a biofilm growth, the cells can be found in biofilm or in planktonic form where the planktonic cells are detached from the biofilm [9]. For the wildtype in paraffin, that population is not majority and in tristearin condition, there is a ratio 1:1 between planktonic and biofilm fractions. It is possible that a growth on tristearin promotes the detachment or that the tristearin degradation releases more soluble compounds which can be degraded by planktonic cells. However, the planktonic fraction of the mutant $\Delta asbABF$ is null (in both paraffin and tristearin conditions), indicating that there were no detached cells (**Figure S4**). For the mutant, the lack of petrobactin limited the planktonic growth, and might reduce dramatically the planktonic population after their detachment.

4.3. FbpA is involved in iron replete and deplete conditions

Although petrobactin is probably the only siderophore produced by *Mh* JM1, the $\Delta asbABF$ mutant was able to grow even in iron deplete condition, indicating that the petrobactin is not the only iron acquisition pathway of *Mh* JM1. As mentioned in the literature [19], we supposed that FbpA, a ferric binding protein, could be involved in the iron acquisition and a mutant unable to produce FbpA was created. The growth defect of the $\Delta fbpA$ mutant suggest that FbpA, in biofilm, is indeed implicated in iron acquisition in iron replete and deplete conditions. FbpA is involved in planktonic growth on acetate only in iron deplete condition. Although both petrobactin and FbpA play a role in iron acquisition, it remains unclear why one or the other is favored depending on the growth mode. The petrobactin pathway would be more involved in low limiting iron concentrations. In iron deplete condition, both are important whatever the lifestyle. However, in iron replete condition, it seems that petrobactin is mainly involved in iron acquisition during a planktonic growth where there is no direct contact between cell surface and iron particles. Petrobactin could be involved for the iron dissolution and transport. FbpA would be a more general pathway for iron acquisition that is involved in many growth conditions iron deplete and replete. Nevertheless, the two pathways petrobactin and FbpA could be connected as FbpA is periplasmic and could be an intermediate of the petrobactin pathway, if the Fe-petrobactin complex is dissociated in the periplasm, as it is the case for *Pseudomonas aeruginosa* [35].

5. References

1. Buchan, A.; LeClerc, G.R.; Gulvik, C.A.; González, J.M. Master Recyclers: Features and Functions of Bacteria Associated with Phytoplankton Blooms. *Nature Reviews Microbiology* **2014**, *12*, 686–698, doi:10.1038/nrmicro3326.
2. Sivadon, P.; Barnier, C.; Urios, L.; Grimaud, R. Biofilm Formation as a Microbial Strategy to Assimilate Particulate Substrates. *Environmental Microbiology Reports* **2019**, *11*, 749–764, doi:10.1111/1758-2229.12785.
3. Tagliabue, A.; Bowie, A.R.; Boyd, P.W.; Buck, K.N.; Johnson, K.S.; Saito, M.A. The Integral Role of Iron in Ocean Biogeochemistry. *Nature* **2017**, *543*, 51–59, doi:10.1038/nature21058.
4. Tortell, P.D.; Maldonado, M.T.; Price, N.M. The Role of Heterotrophic Bacteria in Iron-Limited Ocean Ecosystems. *Nature* **1996**, *383*, 330–332, doi:10.1038/383330a0.
5. Tortell, P.D.; Maldonado, M.T.; Granger, J.; Price, N.M. Marine Bacteria and Biogeochemical Cycling of Iron in the Oceans. *FEMS Microbiology Ecology* **1999**, *29*, 1–11, doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00593.x.
6. Vraspir, J.M.; Butler, A. Chemistry of Marine Ligands and Siderophores. *Ann Rev Mar Sci* **2009**, *1*, 43–63, doi:10.1146/annurev.marine.010908.163712.
7. Handley, K.; Lloyd, J. Biogeochemical Implications of the Ubiquitous Colonization of Marine Habitats and Redox Gradients by *Marinobacter* Species. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*.
8. Singer, E.; Webb, E.A.; Nelson, W.C.; Heidelberg, J.F.; Ivanova, N.; Pati, A.; Edwards, K.J. Genomic Potential of *Marinobacter aquaeolei*, a Biogeochemical “Opportunitroph.” *Appl Environ Microbiol* **2011**, *77*, 2763–2771, doi:10.1128/AEM.01866-10.
9. Klein, B.; Grossi, V.; Bouriat, P.; Goulas, P.; Grimaud, R. Cytoplasmic Wax Ester Accumulation during Biofilm-Driven Substrate Assimilation at the Alkane–Water Interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Research in Microbiology* **2008**, *159*, 137–144, doi:10.1016/j.resmic.2007.11.013.

10. Mounier, J.; Camus, A.; Mitteau, I.; Vaysse, P.-J.; Goulas, P.; Grimaud, R.; Sivadon, P. The Marine Bacterium *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus* SP17 Degrades a Wide Range of Lipids and Hydrocarbons through the Formation of Oleolytic Biofilms with Distinct Gene Expression Profiles. *FEMS Microbiology Ecology* **2014**, *90*, 816–831, doi:10.1111/1574-6941.12439.
11. Vaysse, P.-J.; Sivadon, P.; Goulas, P.; Grimaud, R. Cells Dispersed from *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus* SP17 Biofilm Exhibit a Specific Protein Profile Associated with a Higher Ability to Reinitiate Biofilm Development at the Hexadecane–Water Interface. *Environmental Microbiology* **2011**, *13*, 737–746, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02377.x.
12. Amin, S.A.; Green, D.H.; Al Waheeb, D.; Gärdes, A.; Carrano, C.J. Iron Transport in the Genus *Marinobacter*. *Biometals* **2012**, *25*, 135–147, doi:10.1007/s10534-011-9491-9.
13. Barbeau, K.; Zhang, G.; Live, D.H.; Butler, A. Petrobactin, a Photoreactive Siderophore Produced by the Oil-Degrading Marine Bacterium *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 378–379, doi:10.1021/ja0119088.
14. Lee, J.Y.; Janes, B.K.; Passalacqua, K.D.; Pflieger, B.F.; Bergman, N.H.; Liu, H.; Håkansson, K.; Somu, R.V.; Aldrich, C.C.; Cendrowski, S.; et al. Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, 1698–1710, doi:10.1128/JB.01526-06.
15. Hickford, S.J.H.; Küpper, F.C.; Zhang, G.; Carrano, C.J.; Blunt, J.W.; Butler, A. Petrobactin Sulfonate, a New Siderophore Produced by the Marine Bacterium *Marinobacter Hydrocarbonoclasticus*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1897–1899, doi:10.1021/np049823i.
16. Homann, V.V.; Edwards, K.J.; Webb, E.A.; Butler, A. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: Petrobactin and Its Sulfonated Derivatives. *Biometals* **2009**, *22*, 565–571, doi:10.1007/s10534-009-9237-0.
17. Noinaj, N.; Guillier, M.; Barnard, T.J.; Buchanan, S.K. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 43–60, doi:10.1146/annurev.micro.112408.134247.
18. Schalk, I.J.; Guillon, L. 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* **2013**, *44*, 1267–1277, doi:10.1007/s00726-013-1468-2.
19. Weerasinghe, A.J.; Amin, S.A.; Barker, R.A.; Othman, T.; Romano, A.N.; Siburt, C.J.P.; Tisnado, J.; Lambert, L.A.; Huxford, T.; Carrano, C.J.; et al. Borate as a Synergistic Anion for Marinobacter Algalic Ferric Binding Protein, FbpA: A Role for Boron in Iron Transport in Marine Life Available online: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja406609s> (accessed on 5 October 2020).
20. Millero, F.J.; Feistel, R.; Wright, D.G.; McDougall, T.J. The Composition of Standard Seawater and the Definition of the Reference-Composition Salinity Scale. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **2008**, *55*, 50–72, doi:10.1016/j.dsr.2007.10.001.
21. Mounier, J.; Hakil, F.; Branchu, P.; Naïtali, M.; Goulas, P.; Sivadon, P.; Grimaud, R. AupA and AupB Are Outer and Inner Membrane Proteins Involved in Alkane Uptake in Marinobacter Hydrocarbonoclasticus SP17. *mBio* **2018**, *9*, e00520-18, doi:10.1128/mBio.00520-18.
22. Estellon, J.; Ollagnier de Choudens, S.; Smadja, M.; Fontecave, M.; Vandenbrouck, Y. An Integrative Computational Model for Large-Scale Identification of Metalloproteins in Microbial Genomes: A Focus on Iron–Sulfur Cluster Proteins†. *Metallomics* **2014**, *6*, 1913–1930, doi:10.1039/c4mt00156g.
23. Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Elmi, S.; Rosato, A. Non-Heme Iron through the Three Domains of Life. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2007**, *67*, 317–324, doi:10.1002/prot.21324.
24. Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G.L.; Thornton, J.M. Metal Ions in Biological Catalysis: From Enzyme Databases to General Principles. *J Biol Inorg Chem* **2008**, *13*, 1205–1218, doi:10.1007/s00775-008-0404-5.
25. Kosman, D.J. Iron Metabolism in Aerobes: Managing Ferric Iron Hydrolysis and Ferrous Iron Autoxidation. *Coordination Chemistry Reviews* **2013**, *257*, 210–217, doi:10.1016/j.ccr.2012.06.030.

26. Blin, K.; Shaw, S.; Kloosterman, A.M.; Charlop-Powers, Z.; van Wezel, G.P.; Medema, M.H.; Weber, T. AntiSMASH 6.0: Improving Cluster Detection and Comparison Capabilities. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, W29–W35, doi:10.1093/nar/gkab335.
27. Austin, R.N.; Kenney, G.E.; Rosenzweig, A.C. Perspective: What Is Known, and Not Known, about the Connections between Alkane Oxidation and Metal Uptake in Alkanotrophs in the Marine Environment†. *Metallomics* **2014**, *6*, 1121–1125, doi:10.1039/c4mt00041b.
28. Austin, R.N.; Groves, J.T. Alkane-Oxidizing Metalloenzymes in the Carbon Cycle. *Metallomics* **2011**, *3*, 775–787, doi:10.1039/c1mt00048a.
29. Budzikiewicz, H.; Fuchs, R.; Taraz, K.; Marek-kozaczuk, M.; Skorupska, A. Dihydropyoverdin- 7-Sulfonic Acids - Unusual Bacterial Metabolites. *Natural Product Letters* **1998**, *12*, 125–130, doi:10.1080/10575639808048280.
30. Bosello, M.; Zeyadi, M.; Kraas, F.I.; Linne, U.; Xie, X.; Marahiel, M.A. Structural Characterization of the Heterobactin Siderophores from *Rhodococcus Erythropolis* PR4 and Elucidation of Their Biosynthetic Machinery. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2282–2290, doi:10.1021/np4006579.
31. Peralta, D.R.; Adler, C.; Corbalán, N.S.; Paz García, E.C.; Pomares, M.F.; Vincent, P.A. Enterobactin as Part of the Oxidative Stress Response Repertoire. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157799, doi:10.1371/journal.pone.0157799.
32. Maier, G.P.; Bernt, C.M.; Butler, A. Catechol Oxidation: Considerations in the Design of Wet Adhesive Materials. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 332–339, doi:10.1039/C7BM00884H.
33. Kramer, J.; Özkaya, Ö.; Kümmerli, R. Bacterial Siderophores in Community and Host Interactions. *Nature Reviews Microbiology* **2020**, *18*, 152–163, doi:10.1038/s41579-019-0284-4.
34. Escolar, L.; Pérez-Martín, J.; de Lorenzo, V. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6223–6229.
35. Ganne, G.; Brillet, K.; Basta, B.; Roche, B.; Hoegy, F.; Gasser, V.; Schalk, I.J. Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas Aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, 1056–1065, doi:10.1021/acscchembio.6b01077.

6. Supplementary Materials and Methods

6.1. Correlation between OD_{600nm} for planktonic biomass quantification and OD_{595nm} for biofilm biomass quantification

In order to compare the planktonic biomass measured by absorbance at 600nm to the biofilm biomass measured by crystal violet staining at 595nm, a plot of the absorbance at 595 nm versus OD_{600nm} of cell suspension of various concentration was established. 1 mL of *Mh* JM1 cell suspension with known OD_{600nm} (0.25, 0.50 and 0.75) was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. The pelleted cells were stained with 400 µL of 0.1 % crystal violet and incubated at room temperature for 3 minutes. The cells were washed twice with 1 mL Milli-Q water and crystal violet was eluted with 1 mL solution of 10 % acetic acid and 50 % ethanol. The absorbance of the extracted crystal violet was read at 595 nm. The correlation curve obtained is presented in **Figure S2** in the supplementary data.

6.2. Procedure for mutant obtention

The $\Delta asbABF$ was constructed in two steps. Firstly, for the $\Delta asbF$ mutant construction, approximatively 500bp fragments were obtained by PCR, using the enzyme Phusion (ThermoScientific F-530L 2U/µL), amplifying upstream and downstream regions of the gene. The upstream fragment was digested by *Bam*HI and *Sac*II. The other fragment was digested by *Bam*HI and *Sac*I. These two fragments were ligated into the vector pSN77. For the deletion of *asbA* and *asbB* and *fbpA* ORF, a suicide vector containing upstream and downstream regions of the *asbA* and *asbB* or *fbpA* genes, obtained through a three-piece Gibson Assembly using a Gibson assembly kit from NEB following the manufacture's protocol, was introduced in the strain $\Delta asbF$ or *Mh* JM1. PCR amplifications for Gibson Assembly were done with the Takara's Prime Star enzyme (oligonucleotides are resumed in the Table S3).

The obtained plasmids were firstly transferred into *E. coli* DH5- α λ pir by electrotransformation and clones containing the plasmid were selected using kanamycin 50 µg.mL⁻¹ on LB plates. The vector was then transferred into competent *E. coli* S17-1 λ pir cells by TSS transformation [1]. Finally, the plasmid is transferred into *Mh* JM1 by conjugation and the clones are selected by antibiotic resistance. Correct deletions were all verified by PCR and sequencing.

7. Supplementary tables

Table S1. List of bacterial strains used during this study.

Strain	Genotype/phenotype	Description	Reference
<i>E. coli</i>			
S17-1 (λ pir)	Tp ^R Sm ^R <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> -M ⁺ RP4: 2- Tc:Mu:Km	Donor strain for conjugation.	[2]
DH5 α (λ pir)	Tn7 λ pir <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ <i>lacZ</i> Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ pir	Host for cloning.	
KD9	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) carrying pSN78	This study
KD37	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) carrying pSN77	This study
FH31	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) carrying pSN78	This study
FH23	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) carrying pSN77- Δ <i>asbAB</i>	This study
FH24	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) carrying pSN77- Δ <i>asbAB</i>	This study
FH25	DH5 α (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> DH5 α (λ pir) carrying pSN77- Δ <i>fbpA</i>	This study
FH27	S17-1 (λ pir), Kn ^R	<i>E. coli</i> S17-1 (λ pir) carrying pSN77- Δ <i>fbpA</i>	This study
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>			
SP17 ATCC 49840	Sm ^S	Original isolate	[3]
<i>Mh</i> JM1	<i>rpsIK58T</i> , Sm ^R	Referred as wildtype	[4]
Δ <i>asbABF</i>	<i>rpsIK58T</i> , Sm ^R , Δ <i>MARHY3422</i> Δ <i>MARHY3423</i> Δ <i>MARHY3427</i>	<i>asbABF</i> knockout mutant in <i>Mh</i> JM1	This study
Δ <i>fbpA</i>	<i>rpsIK58T</i> , Sm ^R , Δ <i>MARHY2192</i>	<i>fbpA</i> knockout mutant in <i>Mh</i> JM1	This study
Δ <i>asbAB</i>	<i>rpsIK58T</i> , Sm ^R , Δ <i>MARHY3422</i> Δ <i>MARHY3423</i>	<i>asbAB</i> knockout mutant in <i>Mh</i> JM1	This study
Δ <i>asbF</i>	<i>rpsIK58T</i> , Sm ^R , Δ <i>MARHY3427</i>	<i>asbF</i> knockout mutant in <i>Mh</i> JM1	This study

Table S2. List of plasmids used during this study

Plasmid	Antibiotic resistance	Description	Reference
pSEVA 211	Kn ^R	Replication origin : R6K γ <i>ori</i> .	[5]
pSN77	Kn ^R	Derivated of pSEVA 211. Carrying the wild <i>rpsL</i> gene of <i>Mh</i> SP17, conferring the streptomycine sensibility.	This study
pSN78	Kn ^R	Used for <i>MARHY3427</i> deletion, obtained by enzymatic restriction and ligation	This study
pSN77- Δ <i>MARHY3432</i>	Kn ^R	Used for <i>MARHY3432</i> deletion, obtained by enzymatic restriction and ligation	This study
pSN77- Δ <i>asbAB</i>	Kn ^R	Used for <i>MARHY3422</i> and <i>MARHY3423</i> deletions, obtained by Gibson Assembly	This study
pSN77- Δ <i>fbpA</i>	Kn ^R	Used for <i>MARHY2192</i> deletion, obtained by Gibson Assembly	This study
pSN77- Δ <i>asbABF</i>	Kn ^R	Used for <i>MARHY3422</i> , <i>MARHY3423</i> and <i>MARHY3427</i> deletions, obtained by Gibson Assembly	This study

Table S3. List of primers used during this study.

Names	Sequence	Source
GA_delAsbAB1-F	acacttaacggctgacatgggccgtttatgggctgtg	This study
GA_delAsbAB1-R	gatggatgatcaatgaagggcagtcgacgctccaaattcc	This study
GA_delAsbAB2-F	ggaatttggagcgtcgaactgcccttcattgatcaccatc	This study
GA_delAsbAB2-R	gatctatcaacaggagtccaagccgggtgcaagctcatgg	This study
del3427_1-R	gtacggatcctcatggcaatacctccagg	This study
del3427_1-F	actgtcgcacaagaccggattctggaatcg	This study
del3427_2-F	ctctggatccacctcatccacctcatcg	This study
del3427_2-R	actgaattctactggtacgtcagacgc	This study
GA-delfpbA1-F	acacttaacggctgacatggcaggtgaactcatcaggc	This study
GA-delfpbA1-R	ggttggtgtgaggctgaagtggatcctttctgtcg	This study
GA-delfpbA2-F	cgacagaaaggatcaccacttcagcctcacaccaacc	This study
GA-delfpbA2-R	gatctatcaacaggagtccaaggaactgcacatggtcac	This study
Vérif_delasbF_F	actacgtgatggtggaagc	This study
Vérif_delasbF_R	ctggcgattgaagaggtt	This study
Verif_delAsbAB-F	accgttcccggctaattg	This study
Verif_delAsbAB-R	ggttgcgtgtaaggcatg	This study
Verif_delFbpA-F	gactcattcgcgggttagc	This study
Verif_delFbpA-R	tggtgatgagaagtgttgcg	This study

Table S4. Iron-containing proteins selected for expression analysis.

The pvalue between the substrates is indicated. If pvalue < 0.05, the gene is overexpressed in one condition compared to the other. The functions are also indicated. From [6].

SEQ_ID	Ac	HEX	TRI	pvalue_ hex_tri	pvalue_ ac_hex	pvalue_ ac_tri	Function
MARHY0048	6939,053187	7389,188743	6408,384021	0,024946607	0,206437677	0,112633565	aerobic respiration
MARHY0049	11376,34032	13250,72013	13671,44439	0,480681118	0,096756021	0,05139224	aerobic respiration
MARHY0055	5513,954761	6563,423928	5261,281058	0,001549154	0,118959867	0,850396868	aerobic respiration
MARHY0083	2183,073187	1976,300773	1652,386107	0,484693767	0,394397085	0,00042767	aerobic respiration
MARHY0774	9493,918835	8444,816706	4495,508419	0,000117416	0,830256575	0,007808839	aerobic respiration
MARHY0775	11095,88096	10795,7968	6619,489483	0,000312464	0,929265705	0,002064013	aerobic respiration
MARHY0776	5764,967724	5211,141891	3502,841382	0,005133832	0,674872812	0,011488039	aerobic respiration
MARHY1349	5646,211706	6252,00578	6306,017308	0,831168016	0,172020026	0,076023047	aerobic respiration
MARHY1352	8316,856243	9806,02115	7730,974483	0,003146397	0,023243017	0,32695659	aerobic respiration
MARHY1379	10820,41504	8259,42953	5027,585224	0,001235335	0,205564163	0,000792245	aerobic respiration
MARHY1518	4105,817539	2523,886289	1829,396521	0,007162534	0,223074309	0,02855313	aerobic respiration
MARHY1520	13877,67652	10260,79837	5227,943835	1,34722E-05	0,111227679	4,0834E-05	aerobic respiration
MARHY1521	10037,59689	7280,514946	3424,923558	3,62793E-05	0,179615147	0,000192118	aerobic respiration
MARHY1799	6301,066567	6367,89328	5173,870271	0,003074364	0,774623111	0,116331083	aerobic respiration
MARHY1809	6274,089206	6054,321752	7842,431104	1,80307E-05	0,321682565	0,000342583	aerobic respiration
MARHY1934	4015,28078	3057,278743	5462,39865	0,000202977	0,048410396	0,002835575	aerobic respiration
MARHY2080	7000,090548	9040,673141	8301,680502	0,07383223	0,001340931	0,022540507	aerobic respiration
MARHY2125	10206,26689	9827,960595	10125,8705	0,698511184	0,735700587	0,980529175	aerobic respiration
MARHY2127	15253,91485	13296,1793	8888,609021	0,014903222	0,382800591	0,000896707	aerobic respiration
MARHY2128	11192,42726	10412,2087	7107,497076	2,36683E-05	0,542988909	0,000472436	aerobic respiration
MARHY2735	7108,80328	24955,39458	7333,71828	6,04137E-09	8,3374E-07	0,64452552	alkane metabolism
MARHY2837	3478,267678	16019,00152	4028,162724	4,45777E-07	2,79848E-07	0,110143995	alkane metabolism
MARHY2838	4390,020502	14322,08069	4365,127632	9,93126E-06	0,000187015	0,699566941	alkane metabolism
MARHY2846	5706,922215	3156,845502	5775,228048	2,42358E-05	0,003776699	0,703507747	alkane metabolism
MARHY2847	6629,998465	3816,040317	6577,099993	0,000238049	0,009276341	0,803259229	alkane metabolism
MARHY3773	4352,419206	4865,133095	5726,608882	0,044520243	0,390736394	0,087389006	alkane metabolism
MARHY0705	2807,758095	3163,429761	2756,198095	0,102976333	0,092359568	0,767219465	amino acid biosynthesis
MARHY0706	7377,989993	7731,134715	7623,609483	0,779892887	0,342325542	0,437060231	amino acid biosynthesis
MARHY0823	7171,055595	8288,315224	5941,600039	1,01479E-05	0,001191845	0,000216303	amino acid biosynthesis
MARHY1176	8874,415039	5388,942539	6422,715733	0,006313002	0,00012554	0,006408348	amino acid biosynthesis
MARHY1720	5010,645965	5335,258696	4137,281983	0,00886097	0,496107718	0,127718657	amino acid biosynthesis

CHAPITRE IV : DEPENDANCE VIS-A-VIS DU FER ET MECANISMES D'ACQUISITION DE CE METAL SELON LE SUBSTRAT

MARHY0277	5267,098558	6682,21865	5314,034391	0,000667952	0,034661968	0,791057979	carbon compound utilization
MARHY0278	5084,600595	6346,374252	6141,121243	0,546381277	0,072696193	0,125970105	carbon compound utilization
MARHY0280	2370,634345	2683,998187	2095,219947	0,028840577	0,244407305	0,076841021	carbon compound utilization
MARHY0325	3230,377308	3212,344113	3065,182354	0,848928116	0,833863071	0,445363834	carbon compound utilization
MARHY0549	9586,484946	7516,745039	7688,606058	0,724634401	0,002707183	0,004829173	cofactor biosynthesis
MARHY0673	9092,521335	7483,255872	6263,881335	0,005206156	0,034631113	0,000908728	cofactor biosynthesis
MARHY0736	5766,337817	4406,160687	4084,277632	0,210115909	0,008385404	0,002145246	cofactor biosynthesis
MARHY1763	7787,623372	8981,764761	9064,403743	0,995166567	0,006834433	0,072171592	cofactor biosynthesis
MARHY1775	4569,664021	4529,960178	3551,244298	0,007295333	0,93212871	0,047876959	cofactor biosynthesis
MARHY2154	4452,81115	4683,871891	3715,696243	0,030439549	0,625326746	0,235099421	cofactor biosynthesis
MARHY2159	6735,362446	7036,062724	7208,542354	0,588485483	0,568725478	0,239899548	cofactor biosynthesis
MARHY2644	6414,658882	6567,008187	6139,829113	0,320780751	0,673416944	0,579470352	cofactor biosynthesis
MARHY3036	12618,2243	12977,51513	11989,99208	0,462113756	0,772188709	0,779864146	cofactor biosynthesis
MARHY3037	12126,55087	13501,99652	13182,74596	0,72218285	0,244365531	0,308938134	cofactor biosynthesis
MARHY3039	11312,14124	10441,31096	8474,928558	0,005790535	0,229883914	0,001747467	cofactor biosynthesis
MARHY3254	7111,871428	5109,162261	3955,629993	0,100293284	0,050482842	0,001135914	cofactor biosynthesis
MARHY3805	5836,360085	4452,492632	3059,005595	0,029431475	0,152742128	0,000795495	cofactor biosynthesis
MARHY1699	5283,277724	6448,705178	6067,106335	0,233984087	0,001361422	0,052733268	DNA metabolism
MARHY2356	1829,401992	1634,348905	1903,21828	0,197768322	0,492868614	0,695237299	DNA metabolism
MARHY3033	15047,74346	16719,09467	19054,52976	0,279402404	0,339936641	0,126743857	DNA metabolism
MARHY3116	13233,24763	14176,53124	15249,77309	0,295374252	0,484815224	0,146469845	DNA metabolism
MARHY3764	5104,293187	3767,907446	5126,019669	0,0042193	0,005214838	0,953202338	DNA metabolism
MARHY0369	5693,071289	6195,94115	6871,029946	0,214928149	0,196881755	0,015013277	electron transport
MARHY1205	5071,226289	4839,606474	4744,919622	0,570865277	0,542889909	0,388155776	electron transport
MARHY1517	5023,877122	4211,491058	3800,142956	0,271921687	0,35565867	0,113752444	electron transport
MARHY2078	4714,952076	4837,122909	3666,943419	0,000913716	0,703859166	0,061018655	electron transport
MARHY2351	3516,538882	3831,672909	3752,818928	0,73385555	0,224234893	0,530583108	electron transport
MARHY2352	4843,151613	5229,451335	4735,217076	0,032921111	0,204772902	0,754790117	electron transport
MARHY2663	3975,802632	5346,569391	5060,449761	0,303588494	0,002298726	0,009383433	electron transport
MARHY1265	4169,223002	4667,414298	4140,908928	0,28472515	0,340131915	0,965370896	energy metabolism
MARHY1444	6193,419946	6668,017817	4095,11078	0,006380316	0,607907386	0,097698037	energy metabolism
MARHY1474	5181,974252	5112,111428	4995,91578	0,759169305	0,876060844	0,648528835	energy metabolism
MARHY2740	7707,217215	8845,796243	8839,319854	0,959724652	0,191436704	0,23810996	energy metabolism
MARHY3144	4525,114067	4434,273604	4363,127863	0,782012883	0,777604086	0,606770312	energy metabolism
MARHY3267	19761,07198	14319,82439	9721,007261	0,000112584	0,000246889	2,61462E-06	energy metabolism
MARHY3469	5893,987076	6172,627724	4994,152724	0,004028068	0,54748086	0,123284016	energy metabolism

MARHY3582	5249,487539	5049,824483	4614,327308	0,184224572	0,401104976	0,045502416	energy metabolism
MARHY1632	3178,136243	2685,167076	2965,226335	0,299909647	0,314813116	0,748150997	energy metabolism
MARHY0364	3899,21828	2388,243788	2079,553836	0,247548141	0,001943982	1,58666E-05	iron metabolism
MARHY0365	5168,875872	7592,231058	3145,075687	3,09324E-05	0,042099162	0,005744748	iron metabolism
MARHY2192	6737,340872	4786,0349	5436,894669	0,344399522	0,014489014	0,116433387	iron metabolism
MARHY3094	10344,18967	9124,925409	8948,351706	0,816487067	0,07419866	0,056506441	iron metabolism
MARHY3117	11067,23985	13397,47101	11948,87717	0,051969541	0,030990739	0,402842658	iron metabolism
MARHY0868	5702,618558	5300,741521	4768,100456	0,046486794	0,297345194	0,028294779	lipid metabolism
MARHY1221	3778,588604	3479,145919	4114,876428	0,031712912	0,513000272	0,390088634	lipid metabolism
MARHY1789	8573,950595	8444,377771	7244,963928	0,065917949	0,808817904	0,037666541	lipid metabolism
MARHY0443	3069,801336	3729,851752	2983,131521	0,020715133	0,156991071	0,979156556	nitrate respiration
MARHY3015	16694,40902	17067,70819	17752,70698	0,300330392	0,640613203	0,268342128	nitrate respiration
MARHY3021	9938,780502	7198,573048	8155,397956	0,179545971	0,007441978	0,00016074	nitrate respiration
MARHY3025	17147,46856	16848,99263	11596,2143	0,000970412	0,946108702	0,003928222	nitrate respiration
MARHY3027	17653,97134	15179,678	9314,447261	0,000432256	0,224628738	3,95666E-05	nitrate respiration
MARHY3028	18126,8043	16667,12476	10523,45272	0,001687643	0,56534828	0,000651055	nitrate respiration
MARHY3053	17530,66819	13789,81995	12697,60874	0,25433922	0,001374837	3,78421E-05	nitrate respiration
MARHY3054	17266,98319	12397,42772	10720,18393	0,095859719	0,007401339	0,000536229	nitrate respiration
MARHY3055	13624,30448	12702,48263	11561,46198	0,187947896	0,306366935	0,00483608	nitrate respiration
MARHY3063	10801,85652	8662,629206	6738,786706	0,001801354	0,048220045	0,000519077	nitrate respiration
MARHY3064	19893,71504	15775,41615	10632,84735	0,000622591	0,028478496	2,75456E-06	nitrate respiration
MARHY3066	18351,42828	13394,21745	12774,39189	0,500214937	0,008316656	0,002109774	nitrate respiration
MARHY3068	16697,3918	12793,33921	13333,69948	0,503190393	0,002616975	0,000357267	nitrate respiration
MARHY3069	16641,62059	18253,81578	12831,77902	0,001786696	0,226164478	0,003468367	nitrate respiration
MARHY3071	14295,03448	14342,82217	15635,07573	0,246295027	0,942871924	0,265490283	nitrate respiration
MARHY0166	3433,150147	4560,840178	4097,380595	0,176952362	0,116202804	0,254210487	nitrite assimilation
MARHY0167	4172,165966	5257,095872	4641,984576	0,258238079	0,155675189	0,363736981	nitrite assimilation
MARHY0174	7678,527724	10367,50439	10134,52467	0,695002242	0,112320673	0,13306167	nitrite assimilation
MARHY1581	7342,675039	6695,205502	5627,031428	0,020144505	0,485138905	0,03068992	nucleotide biosynthesis
MARHY0332	7795,756983	6371,454946	4966,932261	0,001155446	0,158833543	0,005039113	oxidative stress
MARHY0759	6098,688604	8201,399113	7913,161474	0,455472401	0,007770512	0,021554325	oxidative stress
MARHY0930	6211,193095	6316,767724	7449,762076	0,141215945	0,936790719	0,086314285	oxidative stress
MARHY1555	9654,399761	8669,065039	7206,803002	0,001449457	0,166407572	0,002012194	oxidative stress
MARHY2222	6551,26115	7825,537817	5989,282261	0,009201947	0,099618011	0,328670168	oxidative stress
MARHY0029	6740,626798	6782,886891	5170,584021	4,07268E-05	0,803309648	4,59233E-05	protein fate
MARHY0096	3537,334946	3483,318558	3308,117354	0,697819385	0,760550501	0,238169078	purine metabolism

CHAPITRE IV : DEPENDANCE VIS-A-VIS DU FER ET MECANISMES D'ACQUISITION DE CE METAL SELON LE SUBSTRAT

MARHY0676	2808,890596	2677,164391	2794,887724	0,503731712	0,382747501	0,831509272	regulatory functions
MARHY3175	5134,604993	4567,797215	4386,432585	0,70094564	0,346153045	0,161502251	regulatory functions
MARHY3258	6037,651382	5501,525826	5591,931706	0,77406681	0,443537948	0,518399553	regulatory functions
MARHY3679	9925,946335	6980,70203	7796,955132	0,067935447	5,09594E-05	0,000579908	regulatory functions
MARHY0516	4634,692076	3932,675502	4758,233326	0,035788076	0,282441977	0,680291812	RNA modification
MARHY0988	9375,423095	10390,80235	8307,615317	0,182253367	0,609319599	0,169548926	RNA modification
MARHY1511	7333,017863	8932,334576	7726,814113	0,021066438	0,04874933	0,499696128	RNA modification
MARHY1759	8245,041798	9662,054854	7516,275965	0,006192475	0,085129984	0,388224652	sulfur metabolism
MARHY0140	5489,510409	5125,166798	5073,830595	0,952933904	0,336139748	0,191591023	unknown
MARHY0287	6085,193789	7340,678835	6486,627539	0,032898217	0,025539288	0,297686473	unknown
MARHY0336	6135,751983	7130,658928	7604,671798	0,458655171	0,283972985	0,112328998	unknown
MARHY0393	4990,436243	5057,753048	4642,342817	0,139518205	0,788335037	0,458494792	unknown
MARHY0476	5504,6824	5975,764761	5826,856983	0,971748566	0,588415229	0,410887264	unknown
MARHY0531	1843,665969	870,5584358	1421,306838	5,85007E-05	0,001078596	0,192892744	unknown
MARHY0544	8442,178002	6479,415502	7951,411798	0,030357591	0,005662955	0,19452626	unknown
MARHY1406	11026,64235	12286,21754	12174,42272	0,865334351	0,202411796	0,325092292	unknown
MARHY1476	3050,462076	2837,916533	3408,417632	0,198172718	0,52584962	0,177780272	unknown
MARHY1670	5654,223372	4310,380687	4998,836752	0,000721875	0,001168113	0,075116993	unknown
MARHY1732	9250,816243	11337,92874	12197,47689	0,231478125	0,03375732	0,014711933	unknown
MARHY1796	3623,443326	3372,394437	3557,914715	0,490352094	0,522780751	0,923820949	unknown
MARHY2157	4333,756196	4490,32328	3536,211937	0,008169281	0,632244119	0,115252756	unknown
MARHY2250	6192,89328	5918,932585	6095,334946	0,710282299	0,578446812	0,868559119	unknown
MARHY2348	7331,917724	6859,045595	6808,679669	0,821697538	0,115905463	0,251738688	unknown
MARHY2380	4093,298835	4168,756196	3735,039669	0,172421757	0,745361672	0,315966698	unknown
MARHY2383	3397,152909	3991,336983	2460,968835	0,03496748	0,512420793	0,098035186	unknown
MARHY2561	4899,041521	3435,61453	7004,598835	7,67042E-06	0,00927108	0,003958725	unknown
MARHY2619	6058,372076	6505,119761	6090,047215	0,532515536	0,48188263	0,985384291	unknown
MARHY2625	4149,544298	5902,223465	4797,072539	0,000518099	8,46084E-05	0,016131115	unknown
MARHY2671	5009,455456	6605,123511	5939,172817	0,18996625	0,031902626	0,219370321	unknown
MARHY2724	12944,20745	9157,739391	9130,479669	0,883982262	0,001386254	0,002948926	unknown
MARHY2726	8180,401613	4795,182539	4327,675502	0,095156704	7,2345E-06	1,77709E-06	unknown
MARHY3008	7355,645086	15584,10865	8582,300595	1,11538E-05	0,004686817	0,299697011	unknown
MARHY3089	13002,07596	12243,77856	10312,21282	0,002818787	0,297180502	0,000920859	unknown
MARHY3171	3698,641752	4327,430595	4395,878743	0,852710345	0,202249484	0,150888261	unknown
MARHY3237	3210,902076	2837,624622	3717,043233	0,010727543	0,062840719	0,128898464	unknown
MARHY3482	9282,989206	9600,353465	8117,454483	0,077467265	0,750136414	0,089088684	unknown

MARHY3556	8527,40365	5504,996752	4016,878974	0,004998456	0,035897867	0,001642932	unknown
MARHY3652	8987,301567	10244,86735	7063,876613	0,000695799	0,093543998	0,005391462	unknown
MARHY2004	6785,449483	6872,747909	7034,040271	0,703417339	0,813769733	0,586680484	

Table S5. Comparison of MEM medium and sea water composition

Element	Sea water		EMS		MEM	
	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹	g.L ⁻¹	mol.L ⁻¹
Na ⁺	10.78	0.47	16.10	0.70	10.95	0.48
Cl ⁻	19.35	0.55	24.28	0.68	18.13	0.51
SO ₄ ²⁻	2.72	0.028	6.25	0.065	2.54	0.026
Mg ²⁺	1.28	0.053	1.58	0.065	1.30	0.054
K ⁺	0.40	0.010	0.42	0.011	0.41	0.010
Ca ²⁺	0.41	0.010	0.40	0.010	0.40	0.010
NH ₄ ⁺ *	3.61x10 ⁻⁶ - 14.43x10 ⁻⁶	0.2x10 ⁻⁶ - 0.8x10 ⁻⁶ *	1.01	0.056	1.0	0.055

* Concentration reference : [6].

The reference (sea water) for the other elements is from Millero [7].

Table S6. Particulate fraction of iron in MEM medium

	Total Fe ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Fe hold on the filter ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Fe passed through the filter ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Mean	1.37	0.26	1.11
SD	0.080713664	0.043303416	0.037410248

8. Supplementary figures

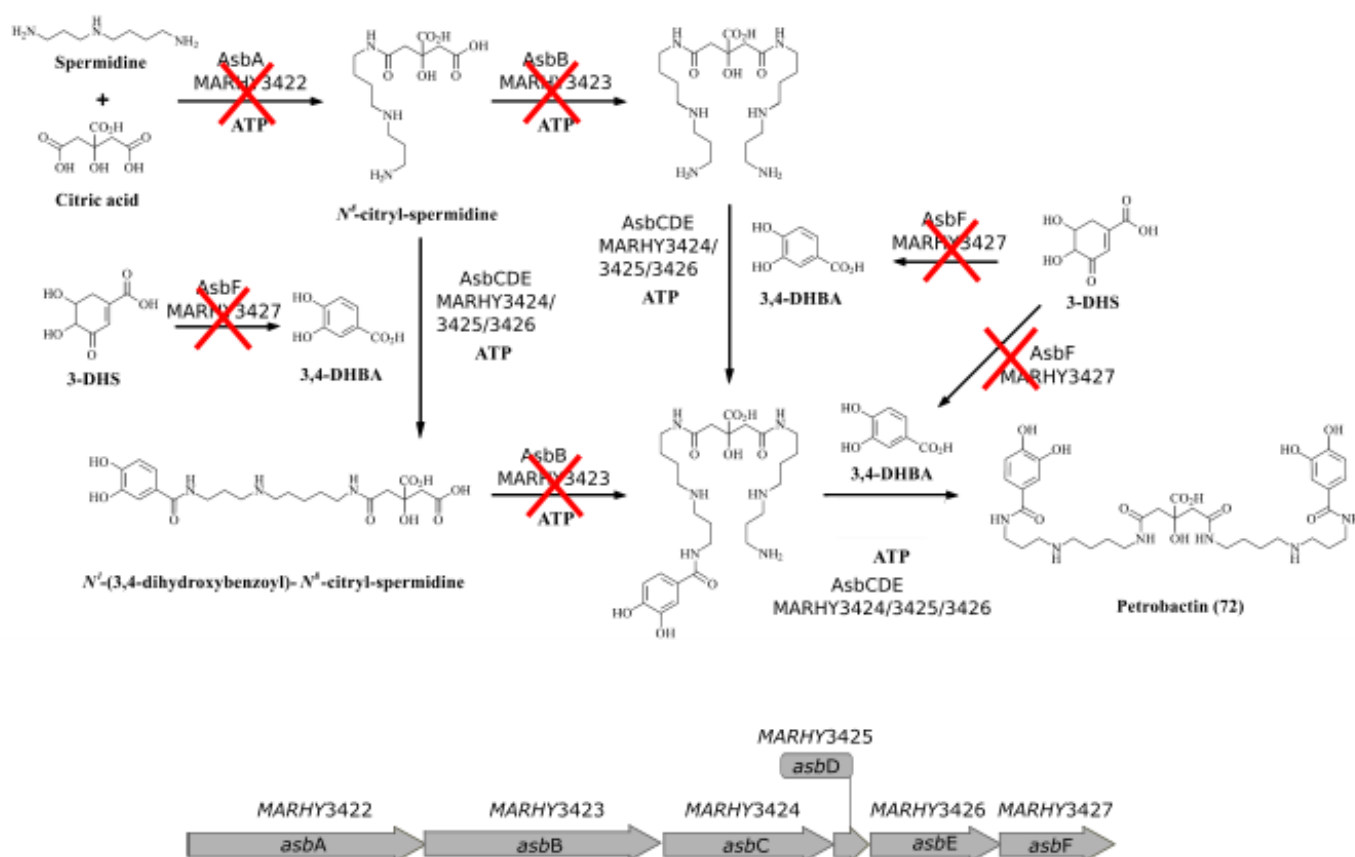


Figure S1. The petrobactin structure and the biosynthetic operon of petrobactin producer *Mh* ATCC 49840 below.

MARHY genes correspond to the originally annotation of *Mh* genes and are indicated above the labeled genes according to the well-characterized *B. anthracis* biosynthetic gene cluster. The red crosses indicate the reactions which are not possible for the $\Delta asbABF$ mutant because of the *asbA*, *asbB* and *asbF* gene deletions. Adapted from Barbeau *et al.* [8].

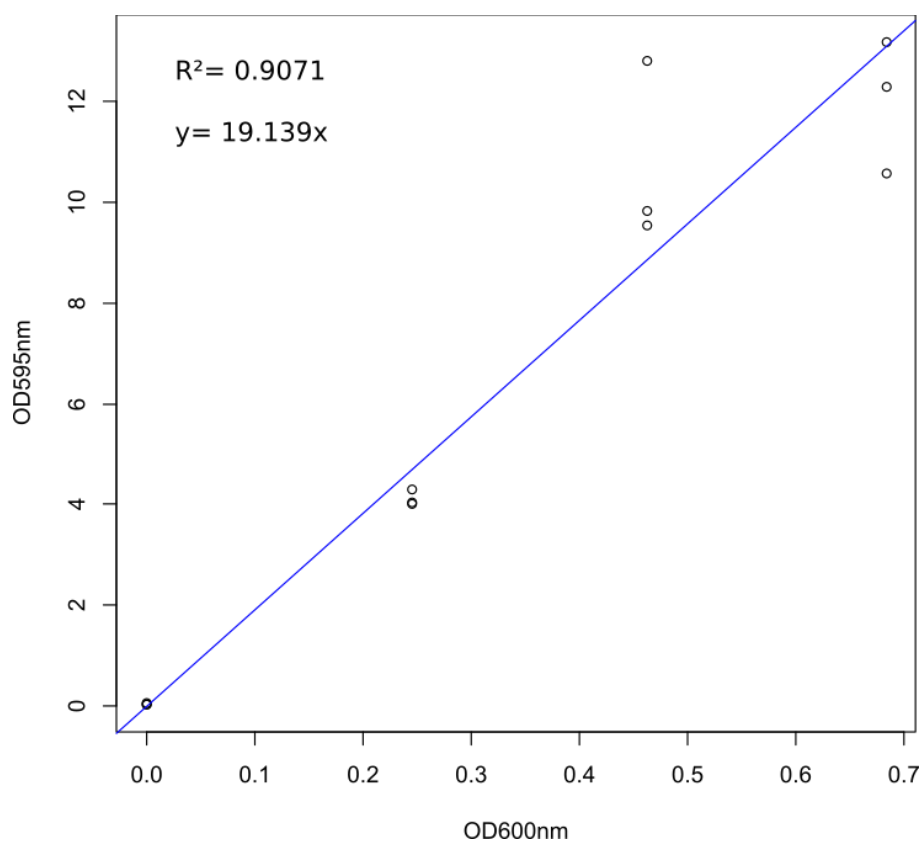
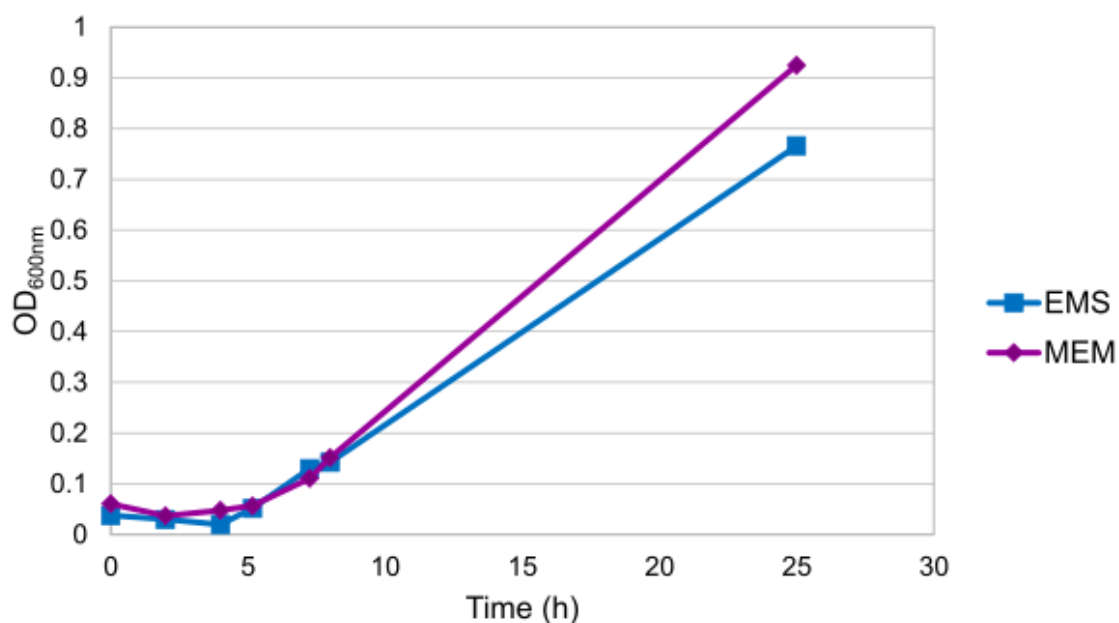


Figure S2. Correlation between OD_{600nm} and OD_{595nm} for direct biofilm and planktonic growth comparison.

Linear regression between OD_{600nm} (turbidity) and OD_{595nm} (crystal violet). The white circles represent each replicate (3 in total). $R^2 = 0.9071$ and the equation of the slope is $y = 13.139x$.

A



B

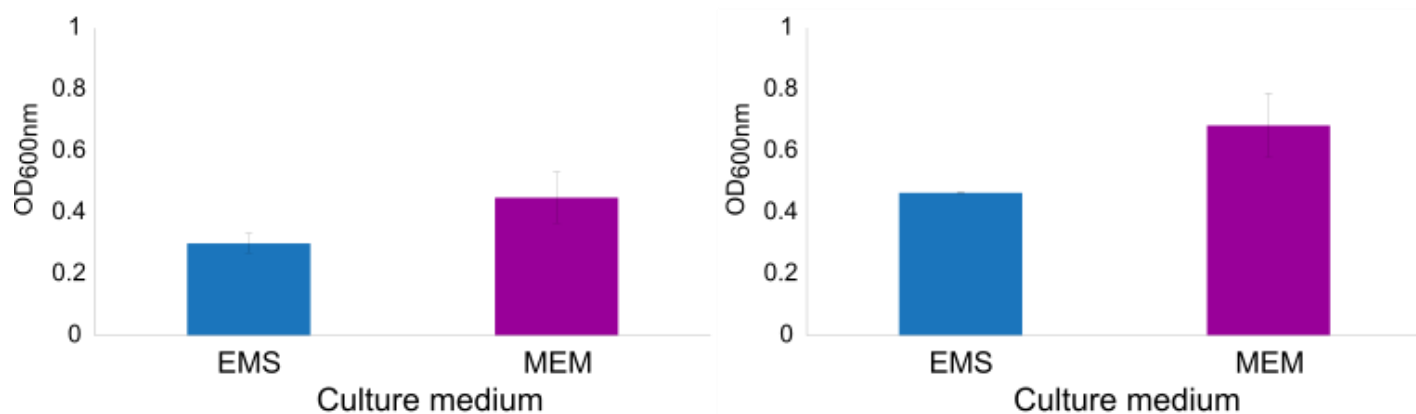
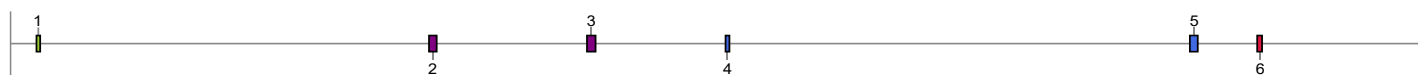


Figure S3. Growth comparison in EMS and MEM medium.

The planktonic growth (A) was done on acetate and with one replicate. The biofilm growths (B) were performed on paraffin and the biomass was quantified after 24h (left) and 48h (right) with 3 replicates. The bars represent the standard deviation.

Identified secondary metabolite regions using strictness 'relaxed'



Marinobacter hydrocarbonoclasticus ATCC 49840 (NC_017067.1)

Region	Type	Location	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	Ectoine	73,502-83,897		
Region 2	Betalactone	1,180,744-1,202,431	Fengycin	20%
Region 3	Betalactone	1,626,392-1,650,584		
Region 4	RiPP-like	2,017,259-2,028,170		
Region 5	Redox-cofactor	3,327,091-3,349,250	Lankadycin C	13%
Region 6	Siderophore	3,516,981-3,530,602		

Figure S4. Putatives secondary metabolites in *Mh* using AntiSmash.

Predicted secondary metabolites in *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 (NCBI accession number: NC_017067.1) and most similar known clusters characterized using Antismash tool.

The table displays the different secondary metabolites identified and the genes which are involved.

Ectoine: amino acid produced by microorganisms for resisting against heat, high U.V. radiation or high salt concentrations.

Betalactone: 3 carbons heterocycles containing an ester function.

RiPP-like: peptide synthesized by a ribosome and modified post traduction.

Redox-cofactor: oxidoreduction cofactor.

Siderophore: the region corresponds to the petrobactin biosynthesis operon.

Siderophore: the region corresponds to the petrobactin biosynthesis operon.

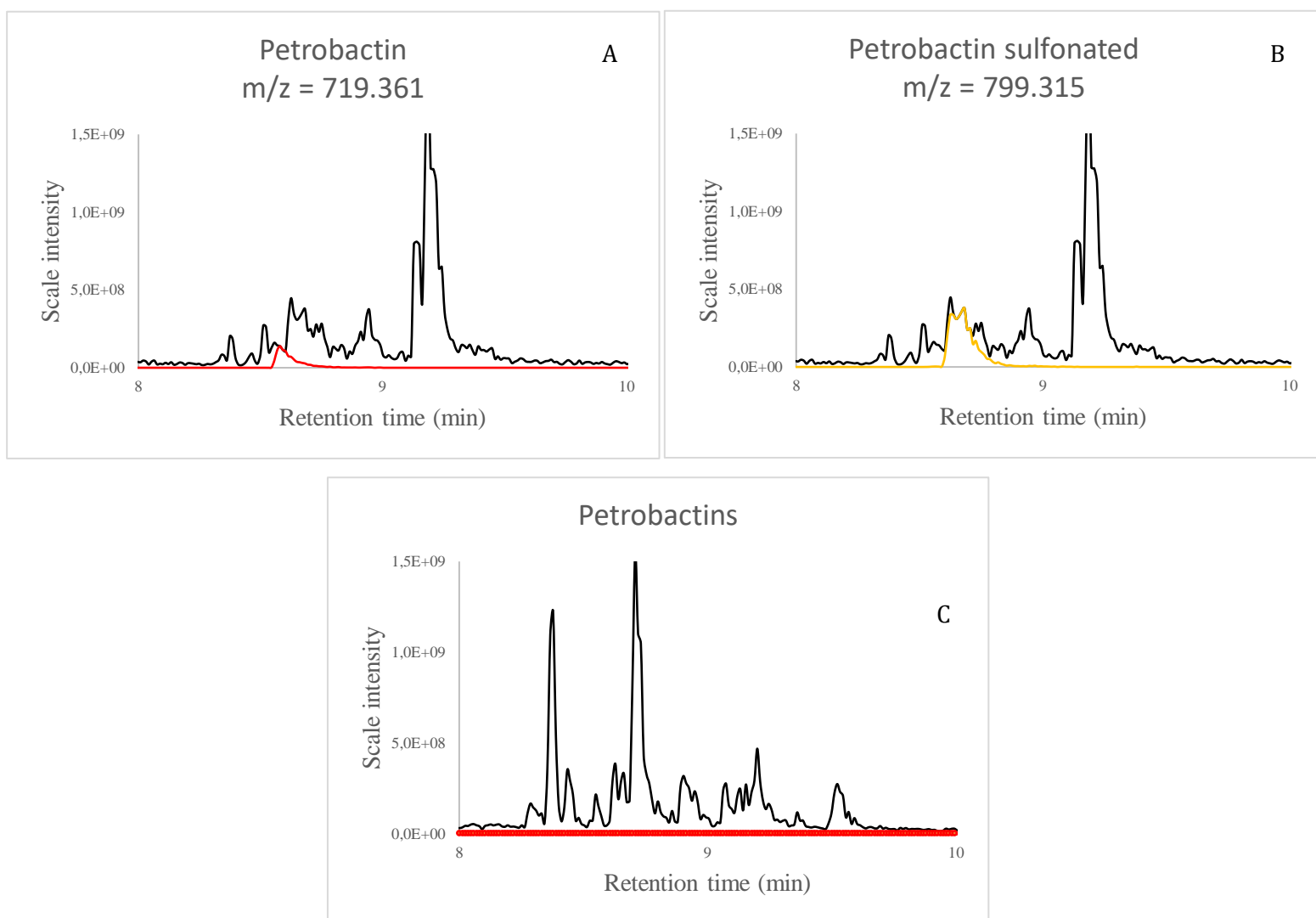


Figure S5. Total ion chromatogram of the supernatant extracts from *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 WT and petrobactin nonproducer mutant, $\Delta asbABF$ grown in iron limited medium.

Petrobactin (A) et sulfonated petrobactin (B) chromatogram from *M. hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 WT and chromatogram of both petrobactins from $\Delta asbABF$ (C) after growth in iron limited medium (100 nmol.L⁻¹ of added iron). The extracted peaks of petrobactin (m/z 719.3616) and sulfonated petrobactin (m/z 799.3159) are colored in red and orange, respectively. Both extracted peaks of petrobactin and sulfonated petrobactin are regrouped in red in the C part of the figure. Petrobactin intermediates, including N⁸-cytril-spermidine (C₁₃H₂₅N₃O₆), 3,4-DHBA (C₇H₆O₄), N¹-(3,4-dihydroxybenzoyl)-N⁸-citryl-spermidine (C₂₀H₂₉N₃O₉), N¹-(3,4-dihydroxybenzoyl)-N⁸,N⁸-citryl-bis(spermidine) (C₂₇H₄₆N₆O₈), N⁸,N⁸-citryl-bis(spermidine) (C₂₀H₄₂N₆O₅), were not detected in the mutant culture medium.

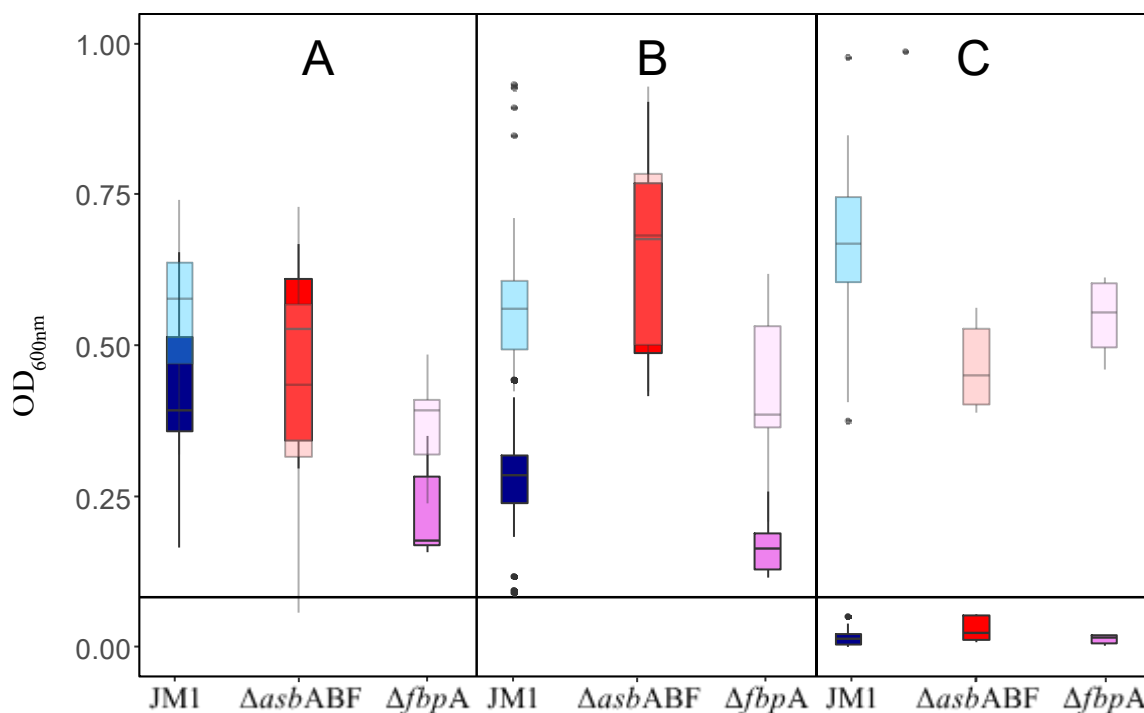


Figure S6. Detailed fractions (planktonic and biofilm) of all strain growths at high iron concentration.

Mh JM1 and derivated mutants, petrobactin non-producer $\Delta asbABF$ (red) and FbpA non producer $\Delta fbpA$ (pink) growths in MEM medium in iron replete condition. Black bars represent the *inoculum* (starting OD_{600nm} was 0.1). The total number of replicates is comprised between 7 and 8 for $\Delta asbABF$ mutant and between 5 and 9 for $\Delta fbpA$. The dark boxplot corresponds to the biofilm fraction. The pale boxplot corresponds to the addition of planktonic and biofilm fractions. A: biofilm growth on paraffin. B: biofilm growth on tristearin. C: planktonic growth on acetate. The iron concentration was 7200 nmol.L⁻¹ of added iron and the biomass quantifications were done after 120h of growth.

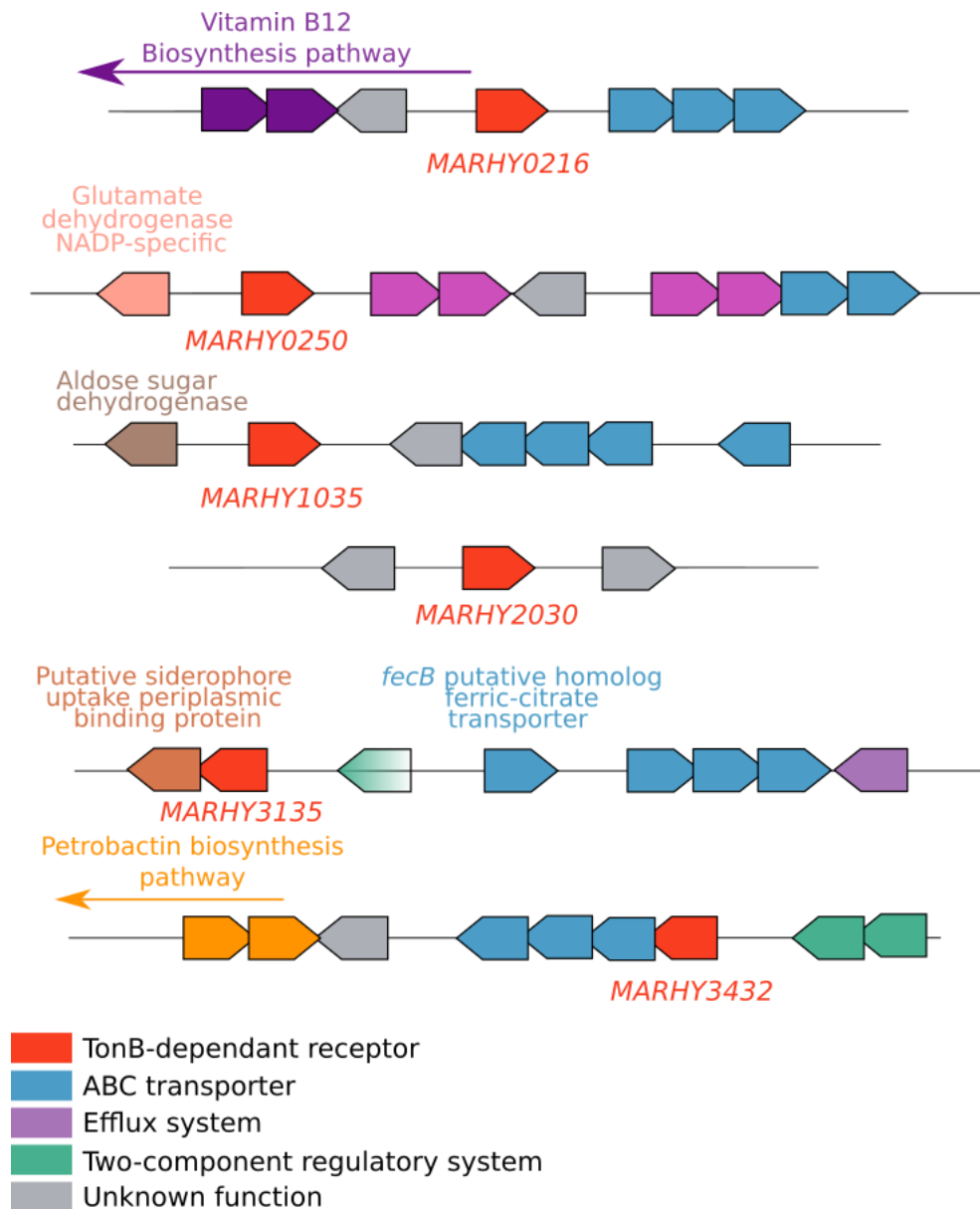


Figure S7. Putative siderophore TBBDT in *Mh* JM1 genome.

The six TonB-dependent receptors of *Mh* JM1 are represented in red, and the adjacent genes are indicated. The size of the genes and the distance between the genes are not representative of the reality. When there is no space between two genes, it means that there is less than 20 bp between them and it is probable that the genes are probably organized into an operon. The same color is used for the genes which are involved in the same functions. When the function is mentioned above the gene, it means that this function is only found for this gene. The light green gene on the right of *MARHY3135* is supposed to be involved in regulation but not a two-component regulatory system.

9. Supplementary references

- [1] Chung C T, Niemela S L and Miller R H 1989 One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86** 2172–5
- [2] Simon R, Priefer U and Pühler A 1983 A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria *Bio/Technology* **1** 784
- [3] Gauthier M J, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P and Bertrand J-C 1992 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **42** 568–76
- [4] Mounier J, Camus A, Mitteau I, Vaysse P-J, Goulas P, Grimaud R and Sivadon P 2014 The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles *FEMS Microbiology Ecology* **90** 816–31
- [5] Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, de las Heras A, Páez-Espino A D, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nikel P I, Platero R and de Lorenzo V 2013 The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes *Nucleic Acids Res* **41** D666–75
- [6] Bianchi M, Feliatra F, Tréguer P, Vincendeau M-A and Morvan J 1997 Nitrification rates, ammonium and nitrate distribution in upper layers of the water column and in sediments of the Indian sector of the Southern Ocean *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44** 1017–32
- [7] Millero F J, Feistel R, Wright D G and McDougall T J 2008 The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **55** 50–72
- [8] Barbeau K, Zhang G, Live D H and Butler A 2002 Petrobactin, a Photoreactive Siderophore Produced by the Oil-Degrading Marine Bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* *J. Am. Chem. Soc.* **124** 378–9

Résultats complémentaires

1. La pétrobactine est également produite après 24h de croissance

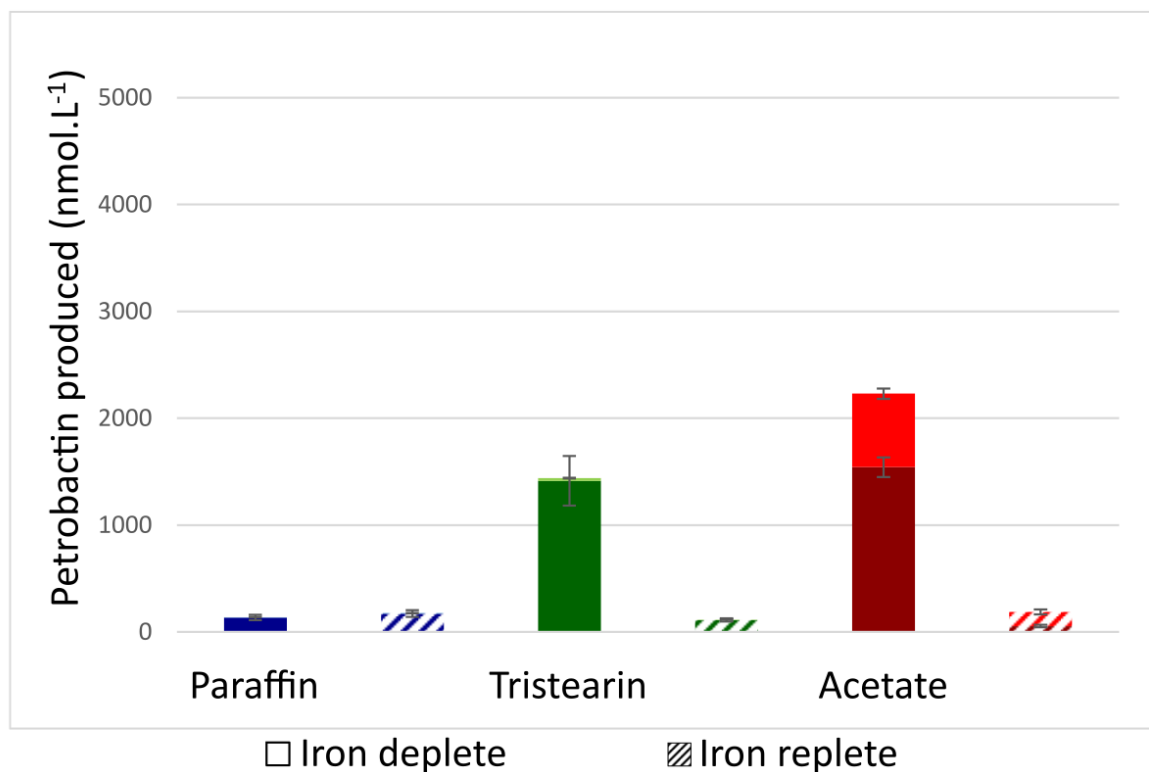


Figure IV.1. Quantification de la pétrobactine et de ses dérivés dans des surnageants de culture à 24h.

La pétrobactine a été quantifiée par ESI-MS (*ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry*), après 24h de croissance sur paraffine, tristéarine et acétate dans un milieu de culture contenant 100 nmol.L⁻¹ de fer (iron deplete) où les barres sont pleines et 7200 nmol.L⁻¹ de fer (iron replete) où les barres sont hachurées. La fraction de pétrobactine est représentée par la couleur sombre (en dessous) et la fraction de pétrobactine sulfonatée est représentée par la couleur plus claire (au-dessus). Les valeurs sont celles de la moyenne de 5 réplicats et les barres d'erreurs représentent les valeurs d'écart type.

La concentration en pétrobactine dans le milieu de culture a également été mesurée à 24h, en plus de 120h (se référer à la section 3.3 de ce même chapitre dans la partie **The nature of the carbon source modulates the iron requirement and the acquisition systems of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***). La **Figure IV.1** montre qu'à 24h de culture, en tristéarine et acétate, il y a une production plus importante de pétrobactine en condition de faible concentration en fer comparé à la condition de forte concentration. Cette observation n'est pas retrouvée en paraffine, où la quantité de pétrobactine détectée est faible quelle que soit la concentration en fer. Cela peut s'expliquer par le fait que la croissance sur paraffine n'ait pas encore débuté après 24h. En effet, les biomasses mesurées à ce temps sont plus faibles sur ce substrat que sur tristéarine ou acétate (**Annexes 3, 4 et 5**). Il est également possible que la concentration en fer soit suffisante pour amorcer la croissance des cellules sur paraffine, sans recourir à une surproduction du sidérophore. Une autre possibilité est que la pétrobactine produite soit immédiatement utilisée par les cellules, réduisant ainsi sa concentration dans le milieu extracellulaire. Cette dernière hypothèse est en accord avec les résultats obtenus du mutant $\Delta asbABF$ dont la croissance est plus faible sur paraffine que sur les autres substrats à faible concentration en fer, soulignant le rôle de la pétrobactine pour la croissance sur paraffine dans ces conditions.

En paraffine et tristéarine, les quantités produites de pétrobactine dans la condition de concentration élevée en fer à 24h sont très similaires à celles mesurées dans ces mêmes conditions à 120h. Cela suggère une production de sidérophore qui est indépendante de la biomasse à forte concentration en fer pour ces substrats. Ces résultats sont concordants avec ceux du mutant ne produisant plus la pétrobactine, $\Delta asbABF$, où il a été observé qu'à forte concentration en fer lors d'une croissance sur biofilm, la production de pétrobactine n'est pas nécessaire pour les cellules. Le fait que la quantité de pétrobactine ne varie pas entre 24h et 120h durant une croissance sur paraffine et tristéarine suggère là encore que la production du sidérophore n'est pas essentielle pour la croissance dans ces conditions. En acétate, il y a environ deux fois moins de sidérophore produit à 24h qu'à 120h. Cette proportion est également retrouvée en condition de faible concentration en fer, où là aussi deux fois moins de pétrobactine a été détectée à 24h qu'à 120h. L'augmentation de la production de sidérophore en acétate entre 24h et 120h pourrait indiquer que la pétrobactine est importante pour la croissance, même quand le métal est présent en fortes quantités. Là encore, ces résultats sont concordants avec ceux du mutant $\Delta asbABF$, qui a une croissance plus faible que celle de la souche sauvage en condition planctonique à toutes les concentrations en fer car il ne produit plus de sidérophore. A faible concentration en fer, on observe pour tous les substrats une augmentation de la

concentration en pétrobactine, en accord avec l'augmentation de la biomasse et la surproduction de la pétrobactine qui devient en excès.

En comparant les mesures de pétrobactine à 24h et 120h, on observe une nette augmentation de la quantité de sidérophore dans le milieu de culture en condition de faible concentration en fer, confirmant que la production de la pétrobactine est régulée par la concentration en fer et que les niveaux de production excèdent largement les quantités utilisées par les cellules pour se développer. D'autre part, comme à 120h, les niveaux de pétrobactine sulfonée sont plus importants en acétate qu'en paraffine ou tristéarine, suggérant que sa production dépend des conditions de croissances et qu'elle joue un rôle important lors de la croissance planctonique dans nos conditions. Les proportions varient néanmoins entre 24h et 120h avec 31 % de forme sulfonée à 24h comparée à 77 % à 120h. Il est difficile de savoir si la forme sulfonée est moins produite à 24h ou si c'est la forme majoritairement utilisée par les cellules. Bien que l'utilité de la sulfonation n'ait pas encore été démontrée, plusieurs hypothèses ont été formulées par Homann. Tout d'abord, la présence d'un groupement sulfonate sur les catéchols de la pétrobactine aurait comme effet de stabiliser ces derniers contre l'oxydation (Homann *et al.*, 2009). Cela rendrait la pétrobactine sulfonée moins efficace pour lutter contre le stress oxydant car elle y est moins sensible. Par conséquent, la pétrobactine non sulfonée protégerait plus efficacement la cellule en réagissant avec les ROS, limitant ainsi leur concentration dans le milieu intracellulaire. Il est fortement probable qu'à 24h de croissance, la quantité d'oxygène dans le milieu de culture soit plus élevée qu'à 120h. Le stress oxydant est donc plus important à 24h qu'à 120h. Les cellules produiraient en conséquence majoritairement de la pétrobactine non sulfonée pour acquérir le fer et également pour lutter contre ce stress oxydant. A 120h, lorsque la concentration en oxygène diminue, il y a moins de stress oxydant et les cellules privilégieraient la pétrobactine sulfonée. Cette dernière étant plus soluble en raison du groupement sulfonate, comme cela a été proposé par Homann (2009), elle diffuse plus loin dans le milieu de culture et pourrait donc être plus efficace pour acquérir le fer. Ces hypothèses sont très discutables car elles ne se basent sur aucune expérience permettant d'affirmer que la sulfonation apporte un réel avantage aux cellules, ni qu'il s'agisse d'un phénomène biologique. Si la sulfonation de la pétrobactine n'est effectivement pas réalisée par les organismes et qu'il s'agit d'une réaction chimique lente entre les sulfates présents dans le milieu de culture et la pétrobactine, cela expliquerait également pourquoi la pétrobactine sulfonée est minoritaire à 24h et majoritaire à 120h.

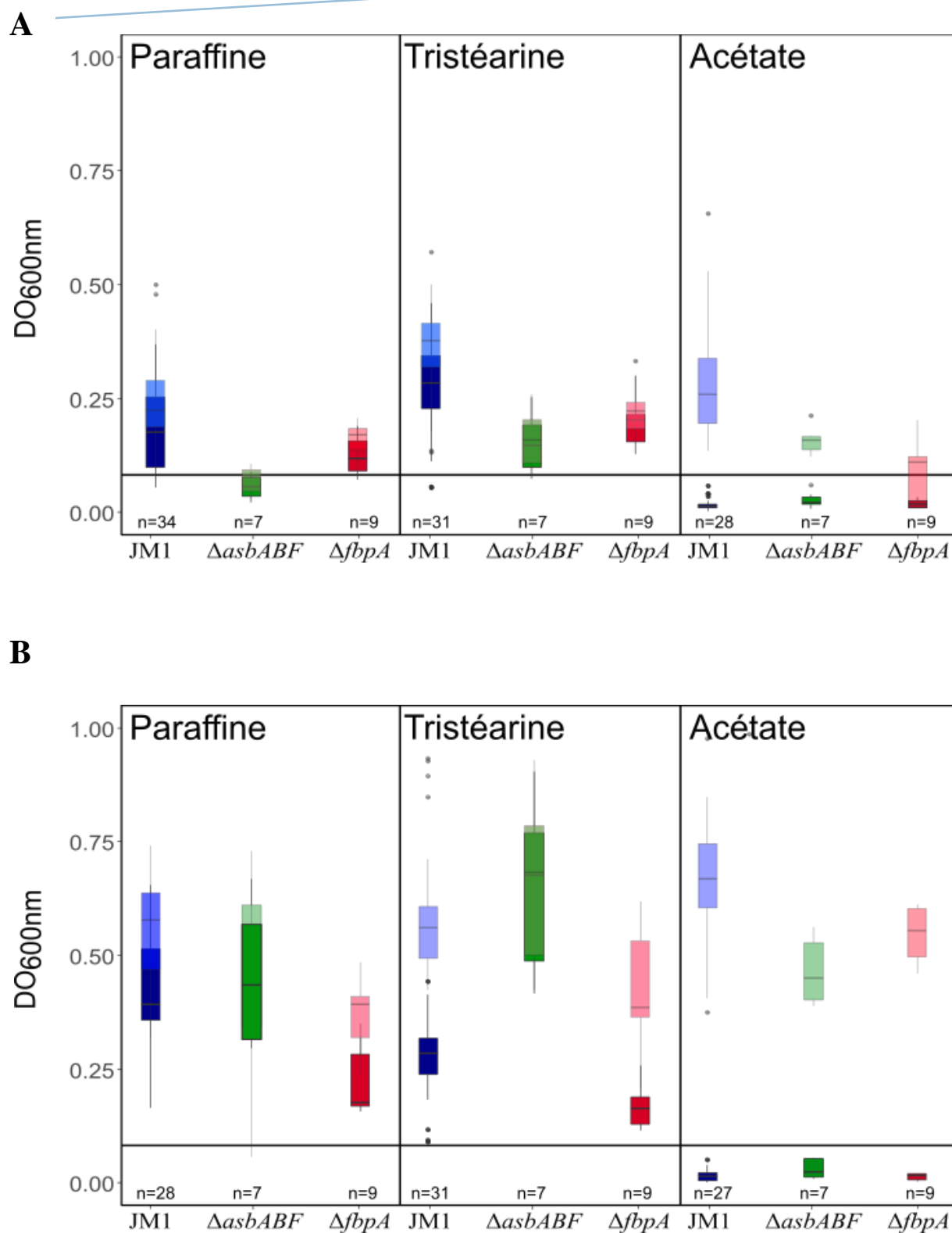


Figure IV.2. Détail des fractions (planctonique et biofilm) des souches *Mh* JM1, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$.

Mh JM1 (en bleu), $\Delta asbABF$ (en vert) et $\Delta fbpA$ (en rouge) ont été cultivés en MEM 100 nmol.L⁻¹ de fer (A) et en MEM 7200 nmol.L⁻¹ de fer (B), après 120h de croissance.

2. $\Delta asbABF$ ne se détache pas du biofilm lors d'une croissance sur tristéarine

La formation de biofilm sur substrat hydrophobe conduit à deux types de population, comme cela a déjà été décrit : les cellules en biofilm et celles qui se détachent du biofilm (Klein *et al.*, 2008). Il a été observé que les cellules détachées ne se développent pas, elles colonisent généralement une autre partie du substrat. Il est toutefois important de rappeler que lorsque la source de carbone est soluble, il n'y a pas de formation d'un biofilm sur le plastique (composant des plaques utilisées pour les cultures) car ce dernier n'est pas métabolisable par *Mh* JM1. La totalité des cellules est alors sous forme planctonique, et la très faible quantité détectée de biofilm n'est pas un biofilm à proprement parler, il s'agit plutôt de cellules adhérees au substrat. La **Figure IV.2** indique la fraction de cellules en biofilm ainsi que la fraction totale (comprenant la partie biofilm et la partie de cellules détachées). Pour une croissance de la souche sauvage en biofilm sur paraffine, la fraction de détachées n'est pas majoritaire, la plupart des cellules sont en biofilm. La proportion de cellules détachées est toutefois plus élevée à forte concentration en fer. En tristéarine, à faible concentration en fer, la fraction biofilm est nettement plus élevée que la fraction de cellules détachées. En revanche, à forte concentration en fer, le ratio entre cellules en biofilm et cellules détachées est d'environ 1 : 1. La boîte à moustache de la biomasse totale est environ deux fois plus élevée que celle de la fraction biofilm. Bien que non encore décrit, ni prouvé durant cette étude, il est possible que la croissance sur ce substrat puisse promouvoir le détachement, voire même permettre le développement de ces cellules. La dégradation de la tristéarine conduit à la formation de composés légèrement solubles, des mono-esters, qui pourraient être dégradés par les cellules planctoniques.

Pour $\Delta fbpA$, les résultats ressemblent à ceux de la souche sauvage, avec toutefois une proportion de cellules détachées à forte concentration en fer plus élevée, tant en paraffine que tristéarine. En paraffine cette fraction est minoritaire à faible concentration en fer, et environ égale à la fraction biofilm à forte concentration en fer. En tristéarine, elle devient même majoritaire à forte concentration en fer. Concernant le mutant $\Delta asbABF$, les observations sont totalement différentes. Sur paraffine et tristéarine, la proportion de cellules détachées est quasiment nulle, tant à forte qu'à faible concentration en fer. Il est possible que la production de sidérophore favorise le détachement. En supposant que la dégradation de la tristéarine conduise à la présence de composés solubles et permette le développement des cellules sous forme planctonique, la sécrétion de sidérophore aiderait les cellules à acquérir le fer dans ces conditions. Comme il en a été discuté, la production de pétrobactine est importante lors d'une croissance planctonique, ce qui est probablement le cas pour

les cellules utilisant les produits de dégradation de la tristéarine. $\Delta asbABF$ ne produisant pas de sidérophore, il ne peut donc pas utiliser ces composés et se développer sous forme planctonique. Par conséquent, les cellules ne sont retrouvées qu'en biofilm et la fraction planctonique est très faible. Ce mécanisme pourrait également expliquer pourquoi la proportion de cellules détachées est plus élevée pour $\Delta fbpA$ que la souche sauvage en tristéarine. En effet, si $\Delta fbpA$ produit plus de pétrobactine pour compenser l'absence de FbpA, une croissance planctonique est alors plus efficace qu'une croissance en biofilm. Une partie importante des cellules en biofilm va donc se détacher pour se développer sous forme planctonique.

3. Utilisation d'un promoteur inductible à l'arabinose chez *Mh* JM1

Jusqu'à présent, aucun outil permettant une expression contrôlée et inductible n'était connu chez *Mh* JM1. Comme il a été indiqué par Gauthier *et al.* (1992), *Mh* SP17 (et donc par extension *Mh* JM1) ne métabolise pas l'arabinose, qui est classiquement utilisé pour induire des gènes sous contrôle du promoteur P_{BAD} . Nous avons souhaité vérifier si même sans être métabolisé, l'arabinose peut être utilisé comme inducteur chez *Mh* JM1. Pour cela, un plasmide transférable par conjugaison et possédant l'origine de répllication pBBR1 ori V, compatible avec *Mh* JM1 a été utilisé. Le promoteur inductible a été cloné en amont du gène *mCherry* codant une protéine fluorescente. Le plasmide nommé pSN75 et contenant le promoteur P_{BAD} construit chez *E. coli* a ensuite été introduit chez *Mh* JM1 par conjugaison. Afin de vérifier l'induction, des cultures d'*E. coli* et de *Mh* JM1 en présence et en absence d'arabinose ont été réalisées et la fluorescence produite mesurée par microscopie à fluorescence (**Figure IV.3**). En absence d'induction, peu de fluorescence est détectable (**Figure IV.3 A**). La mesure du rapport entre la quantité de fluorescence émise par les cellules et le bruit de fond (**Figure IV.3 B**) montre un signal légèrement supérieur au bruit de fond chez *E. coli*, indiquant une fuite du promoteur. Chez *Mh* JM1, la fuite du promoteur est moins importante, mais s'observe pour une partie des cellules analysées. En présence d'arabinose, on observe une forte induction chez *E. coli* et *Mh* JM1 puisque la quantité de fluorescence est significativement plus élevée qu'en absence d'induction. En moyenne le signal de fluorescence est 1,5 fois supérieur au bruit de fond. On observe également une grande variabilité de la réponse à l'induction chez *E. coli* comme chez *Mh* JM1, avec des cellules qui ne présentent pas de fluorescence et d'autres qui ont un signal 4 fois supérieur au bruit de fond. Bien que non métabolisable par les cellules, l'arabinose peut donc

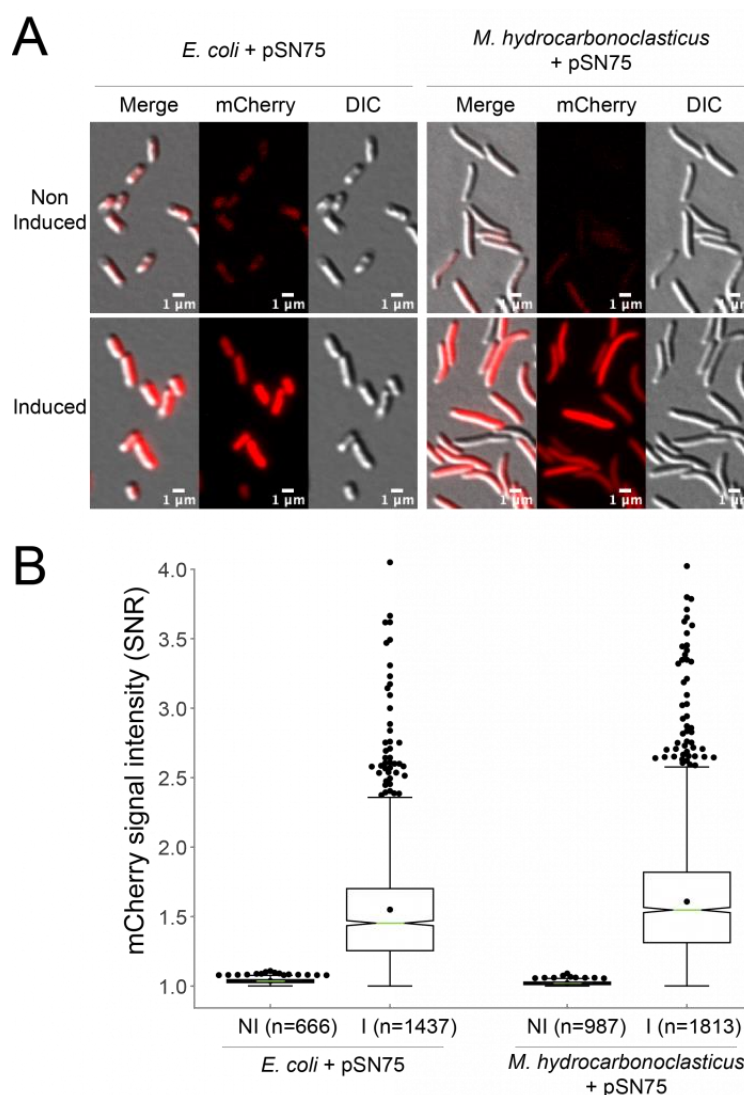


Figure IV.3. Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules portant le plasmide pSN75 avant et après induction par l'arabinose.

A Images de microscopie à fluorescence de cellules d'*E. coli* (à gauche) et de *Mh* JM1 (à droite) portant le plasmide exprimant le gène *mCherry* sous le contrôle du promoteur P_{BAD} inductible à l'arabinose. Les images montrent les cellules non induites (en haut) ou après 2 h d'induction à l'arabinose (en bas) en contraste interférentiel différentiel (image de gauche), en fluorescence (milieu) ou une superposition des deux (image de gauche). L'échelle est indiquée sur les images en bas à droite. **B** Les boîtes à moustache représentent le ratio entre l'intensité de fluorescence émise par les cellules par rapport au bruit de fond. Le trait vert représente la médiane, la moyenne est indiquée par un rond noir. Les valeurs supérieures au maximum (*outliers*) sont représentées par des ronds noirs pleins. L'analyse a été effectuée grâce au logiciel MicrobeJ. Le nombre de cellules analysées est indiqué en dessous de chaque boîte (n=). NI : Non induit, I : induit.

être utilisé comme inducteur chez *Mh* JM1. Le plasmide pSN75 construit est un nouvel outil permettant de contrôler l'expression de gènes chez *Mh* JM1. Ce plasmide a notamment permis lors de ce travail de construire un double mutant conditionnel $\Delta asbABF \Delta fbpA$.

4. Phénotype du double mutant conditionnel $\Delta asbABF \Delta fbpA$

Comme il en a été discuté précédemment, la délétion des gènes *asbA*, *asbB*, *asbC* et *fbpA* semble être létale car aucun mutant n'a pu être obtenu, malgré un grand nombre d'essais. Un mutant $\Delta asbABF \Delta fbpA$ conditionnel, portant le plasmide pFH54 contenant le gène *fbpA* sous le contrôle du promoteur P_{BAD} inductible par l'arabinose a quant à lui pu être créé. Ce mutant a été obtenu à la toute fin de ce travail, et à ce stade seuls des tests préliminaires ont pu être effectués sur milieux solides et liquides, contenant tous une concentration élevée en fer (7200 nmol.L⁻¹). Le phénotype du mutant a été comparé à celui de la souche sauvage, de $\Delta fbpA$, de $\Delta asbABF$ et de $\Delta asbABF$ portant le plasmide pFH54. Pour cette dernière souche, il s'agit d'un contrôle pour s'assurer que la présence du plasmide n'a pas d'effet sur le phénotype du mutant. Tous les résultats sont résumés dans la **Figure IV.4**.

Le phénotype du double mutant a été étudié sur milieu EMS liquide et solide avec 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté, en présence et absence d'arabinose. Tout d'abord, les croissances des simples mutants ont été comparées à celle de la souche sauvage pour s'assurer que la présence d'arabinose dans le milieu de culture n'affecte pas leurs phénotypes. La croissance a été observée à 24h et 48h sur boîte, avec des dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻⁶ réalisée à partir d'une culture de nuit (**Figure IV.4 A**). La DO_{600nm} a également relevée sur 30h sur une culture liquide agitée avec comme *inoculum* la même préculture que celle utilisée pour les croissances sur boîte (**Figure IV.4 B**).

Les cultures réalisées en absence et en présence d'arabinose montrent que l'ajout d'arabinose dans le milieu de culture n'a aucune influence sur la souche sauvage et les mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ tant en condition solide que liquide. La croissance de $\Delta fbpA$ est identique à celle de la souche sauvage sur milieu solide (**Figure IV.4 A**) et liquide (**Figure IV.4 B** courbe du haut), alors que celle de $\Delta asbABF$ est retardée par rapport à la souche sauvage. Sur boîte (**Figure IV.4 A**), après 24h de croissance, des colonies sont visibles jusqu'à une dilution de 10⁻³ pour ce mutant, contre 10⁻⁵ pour la souche sauvage. Le fait qu'à une dilution plus importante la souche sauvage soit capable de former des colonies en 24h indique que sa croissance est plus rapide que celle du mutant $\Delta asbABF$. Après

48h de croissance sur milieu solide, il n'y a plus de différence entre le mutant et la souche sauvage. Ces observations sont confirmées par la culture liquide (**Figure IV.4 B** courbe du haut), où la croissance du mutant est légèrement retardée par rapport à celle de la souche sauvage. Après environ 22h de croissance, ce retard est rattrapé. Ces résultats du mutant $\Delta asbABF$ signifient que la pétrobactine joue un rôle dans la croissance sur acétate de *Mh* JM1 dans des conditions de forte concentration en fer, en accord avec ce qui a été discuté précédemment (se référer à la section 3.4 de ce même chapitre dans la partie **The nature of the carbon source modulates the iron requirement and the acquisition systems of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***), tout comme l'absence de phénotype du mutant $\Delta fbpA$ en conditions planctoniques à forte concentration en fer. Il est à noter que la couleur des colonies varie selon les souches. En effet, on observe des colorations différentes chez la souche sauvage et les mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$. Pour $\Delta asbABF$, les colonies paraissent être plus ternes que celles de la souche sauvage et c'est l'inverse pour $\Delta fbpA$ où leur coloration semble plus intense. Cela pourrait être dû à la pétrobactine : les colonies de $\Delta asbABF$ n'en synthétisant plus sont moins colorées alors que celles de $\Delta fbpA$ ont une couleur plus intense. Ces dernières produiraient plus de sidérophores que la souche sauvage pour compenser la perte de la protéine FbpA, accentuant ainsi la coloration.

Nous avons ensuite souhaité vérifier si la présence de deux copies du gène *fbpA* pourrait avoir une influence sur le phénotype du mutant $\Delta asbABF$. La croissance de la souche $\Delta asbABF$ contenant le plasmide pFH54 a été comparée à celle de la souche $\Delta asbABF$ ne portant pas de plasmide, en absence et en présence d'arabinose (**Figure IV.4 Y A et B** courbe du milieu). On peut voir que dans ces conditions, la présence du plasmide pFH54 dans le mutant $\Delta asbABF$ restaure le phénotype sauvage, tant en croissance sur MEM solide que liquide. La surproduction de FbpA causée par la présence du plasmide permet donc au mutant d'améliorer sa croissance. Le fait qu'il n'y ait pas de différence entre les conditions présence et absence d'arabinose met en avant que la fuite du promoteur arabinose est suffisante pour restaurer la croissance du mutant, expliquant également pourquoi sur milieu solide le mutant $\Delta asbABF$ portant pFH54 a une meilleure croissance que le mutant n'ayant pas le plasmide.

Enfin, la croissance du double mutant conditionnel a été comparée à celle du mutant $\Delta asbABF$ portant le plasmide pFH54 (**Figure IV.4 A et B** courbe du bas). Sur milieu solide, la croissance sans induction à l'arabinose du mutant $\Delta asbABF\Delta fbpA + pFH54$ est très affectée, tant à 24h qu'à 48h. Les colonies visibles sont plus « transparentes » que celles de la souche sauvage, traduisant un nombre de cellules bien moins élevé pour le mutant. En milieu liquide, la biomasse de

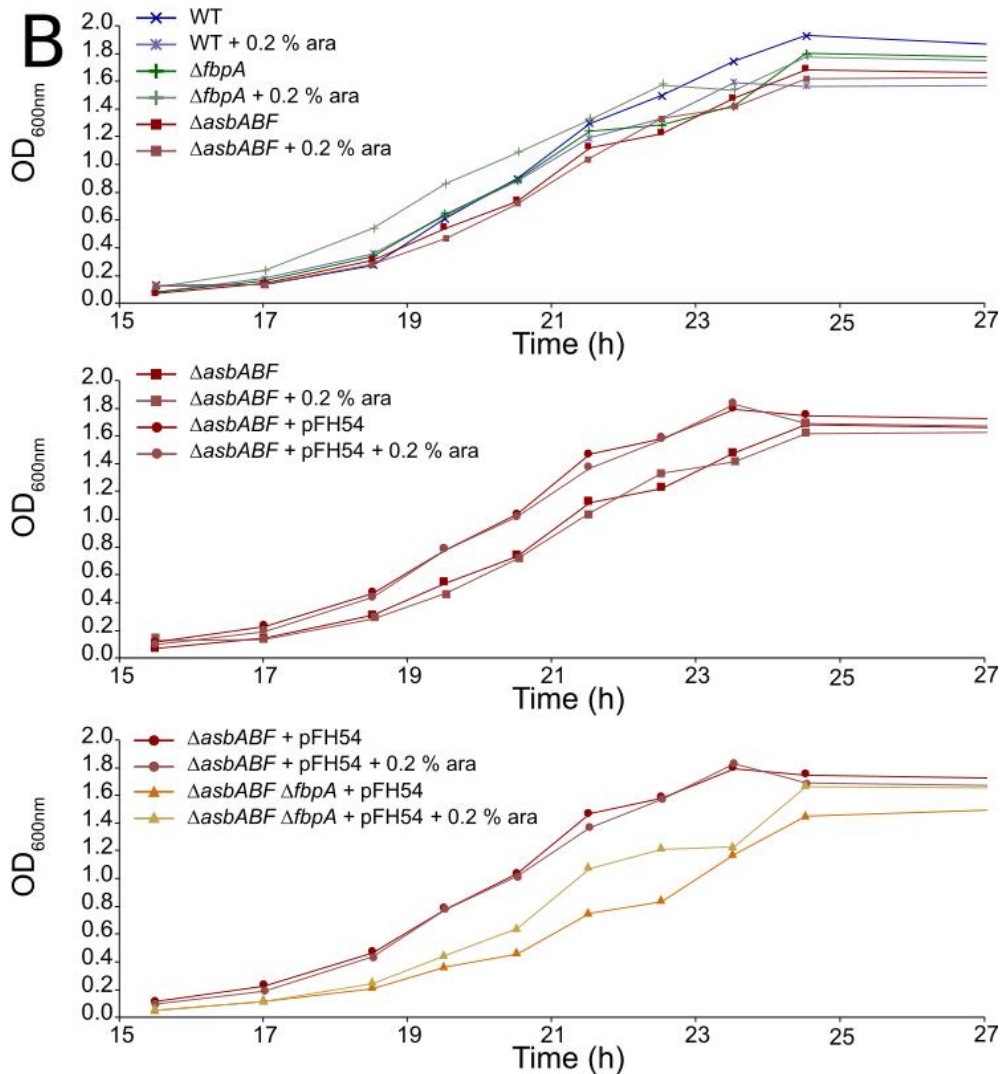
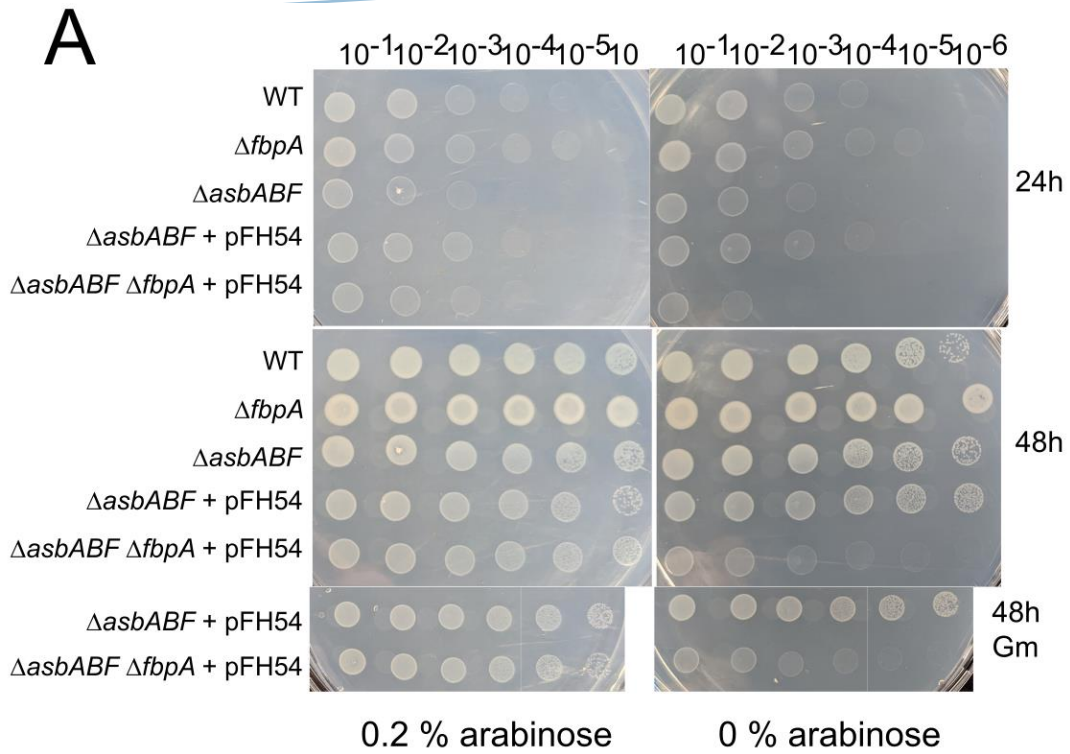


Figure IV.4: Etude du phénotype du mutant conditionnel $\Delta asbABF\Delta fbpA$ sur MEM solide et liquide.

En haut : Croissance sur MEM solide des mutants $\Delta fbpA$, $\Delta asbABF$ portant ou non le plasmide pFH54 (qui contient le gène *fbpA* sous contrôle du promoteur arabinose) et $\Delta asbABF\Delta fbpA$ portant le plasmide pFH54, en présence ou absence d'arabinose. 10 μ L de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-6} d'une culture de nuit ont été déposées sur boîte MEM. Les photographies des croissances ont été réalisées à 24h et 48h. Les concentrations en arabinose ajoutées dans le milieu gélosé sont indiquées en bas des images. La dernière ligne de photographies confirme que les cellules portent toujours le plasmide pFH54 car elles sont résistantes à la gentamycine.

En bas : Courbe de croissance des mêmes souches que celles utilisées pour la croissance sur milieu solide durant 24h. Réalisé sur 1 réplicat.

Gm : gentamycine.

ce dernier est également plus faible que celle de la souche sauvage tout au long de la phase exponentielle. Sa biomasse finale est légèrement plus faible que celle de la souche sauvage. Il est probable que la fuite du promoteur permette la croissance observée en absence d'arabinose. Ce constat est en accord avec la létalité du mutant, cette fuite est nécessaire pour que les cellules puissent se développer. L'induction à l'arabinose restaure partiellement la croissance de ce mutant, tant sur milieu solide que liquide mais ne lui permet pas de retrouver un phénotype sauvage. En milieu liquide, sa croissance est plus lente mais la biomasse finale est identique à celle de la souche sauvage.

Les résultats des mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ ont montré que l'absence de pétrobactine ou de FbpA ralentit la croissance, probablement en rendant l'acquisition du fer moins efficace. Ces deux mécanismes, semblent être les seuls, ou *a minima* les deux plus efficaces pour que les cellules puissent obtenir du fer. La présence de ces deux systèmes redondants permet une réponse optimale de la cellule à la présence de fer, ce qui apporte un net avantage en conditions naturelles où les organismes sont en compétition pour l'acquisition du fer. Pour vérifier si l'absence de FbpA chez le mutant $\Delta fbpA$ est compensée par une augmentation de la production de pétrobactine, un dosage du sidérophore après croissance du mutant est prévu.

Les croissances des mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ à forte concentration en fer présentées en **Figure 4** (dans la partie **The nature of the carbon source modulates the iron requirement and the acquisition systems of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus***) semblent indiquer que chaque mécanisme est impliqué dans des conditions différentes. La pétrobactine est principalement employée par *Mh* JM1 lors d'une croissance en biofilm alors que FbpA l'est plutôt lors d'un développement des cellules sous forme planctonique. Des expérimentations menées au laboratoire en utilisant de la ferrihydrite et de la goéthite comme sources de fer ont montré que les cellules étaient capables de former un biofilm autour des oxydes de fer alors que la source de carbone est soluble (données non présentées). Il a été observé que même sous agitation, un biofilm se forme sur les côtés du tube et a pour conséquence de coller les particules de fer à la paroi, maintenant un contact direct entre les cellules et la source de fer. Il est donc possible que cette proximité facilite l'acquisition du fer. Nous supposons que dans nos conditions de culture en plaques, le fer qui est principalement particulaire et colloïdal sédimente et se retrouve au niveau du substrat, là où est présent le biofilm. Lorsque les cellules se développent sous cette forme, à forte concentration en fer, la pétrobactine n'est pas nécessaire pour la croissance : il n'y a aucune différence entre la souche sauvage et le mutant $\Delta asbABF$, à l'inverse de $\Delta fbpA$ dont la biomasse est plus faible. Ces résultats suggèrent donc qu'un transport du fer ne nécessitant pas de sidérophores est présent. Il est possible que comme pour certains organismes phytoplanctoniques, un transport du fer via des porines ou des transporteurs TonB-dépendants soit possible (Sutak *et al.*, 2020). Une fois que le fer a atteint le périplasme, il serait pris en charge par FbpA. Lors d'une croissance planctonique, même à forte concentration en fer, le développement du mutant $\Delta asbABF$ est réduit par rapport à la souche sauvage. L'absence de contact entre les cellules et le fer ne permettrait alors pas le type de transport précédemment écrit, et dans ce cas, la production de sidérophores serait nécessaire. En condition de faible concentration en fer, les deux mécanismes sont importants pour la croissance de *Mh* JM1, probablement car le fer étant limitant pour la croissance, la cellule cherche à l'acquérir en utilisant chacune des voies possibles. Ainsi la pétrobactine serait plus efficace lorsque le fer est éloigné de la cellule et FbpA lorsqu'il est en contact.

5. Conclusion

Ces nouveaux résultats apportent des éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh* JM1. La mise en place d'un promoteur arabinose a permis de réaliser un mutant conditionnel, ne produisant plus la pétrobactine ni FbpA lorsqu'il n'est pas induit. Le fait qu'il ait été impossible d'obtenir un mutant « classique » délété de ces deux voies indique donc que l'impossibilité de produire la pétrobactine et FbpA est létal pour la cellule. Cela suggère qu'il s'agisse probablement des deux seules voies d'assimilation du fer, ou du moins les deux principales. La croissance réduite du double mutant en absence d'induction démontre bien l'importance de la pétrobactine et de FbpA. En regardant les nuances de couleurs des colonies sur EMS solide, il est envisageable que le mutant $\Delta fbpA$ qui a des colonies ayant une coloration plus intense produise plus de pétrobactine pour compenser la perte de FbpA. Un dosage du surnageant de culture de ce mutant sera réalisé prochainement pour confirmer cette hypothèse. L'avantage de posséder deux mécanismes permet sans doute à *Mh* JM1 de mieux pouvoir s'adapter en fonction des conditions. L'absence de population détachée lors d'une croissance sur tristéarine semble confirmer que l'efficacité du mécanisme varie en fonction du mode de croissance. Une voie est plus efficace que l'autre lors d'un développement en biofilm, alors que l'autre est plus adaptée lors d'une croissance planctonique. En milieu naturel cela doit probablement permettre aux cellules d'être plus compétitives vis-à-vis de l'acquisition du fer. Ces résultats montrent également qu'en fonction du mode de croissance, les mécanismes utilisés dans l'acquisition du fer sont modifiés : lorsque les cellules sont sous forme planctonique, l'utilisation de pétrobactine est privilégiée alors qu'en biofilm, c'est FbpA.

Chapitre V

Influence de la nature du substrat sur les besoins en fer et systèmes de transport de ce métal chez *Mh* JM1

Préambule

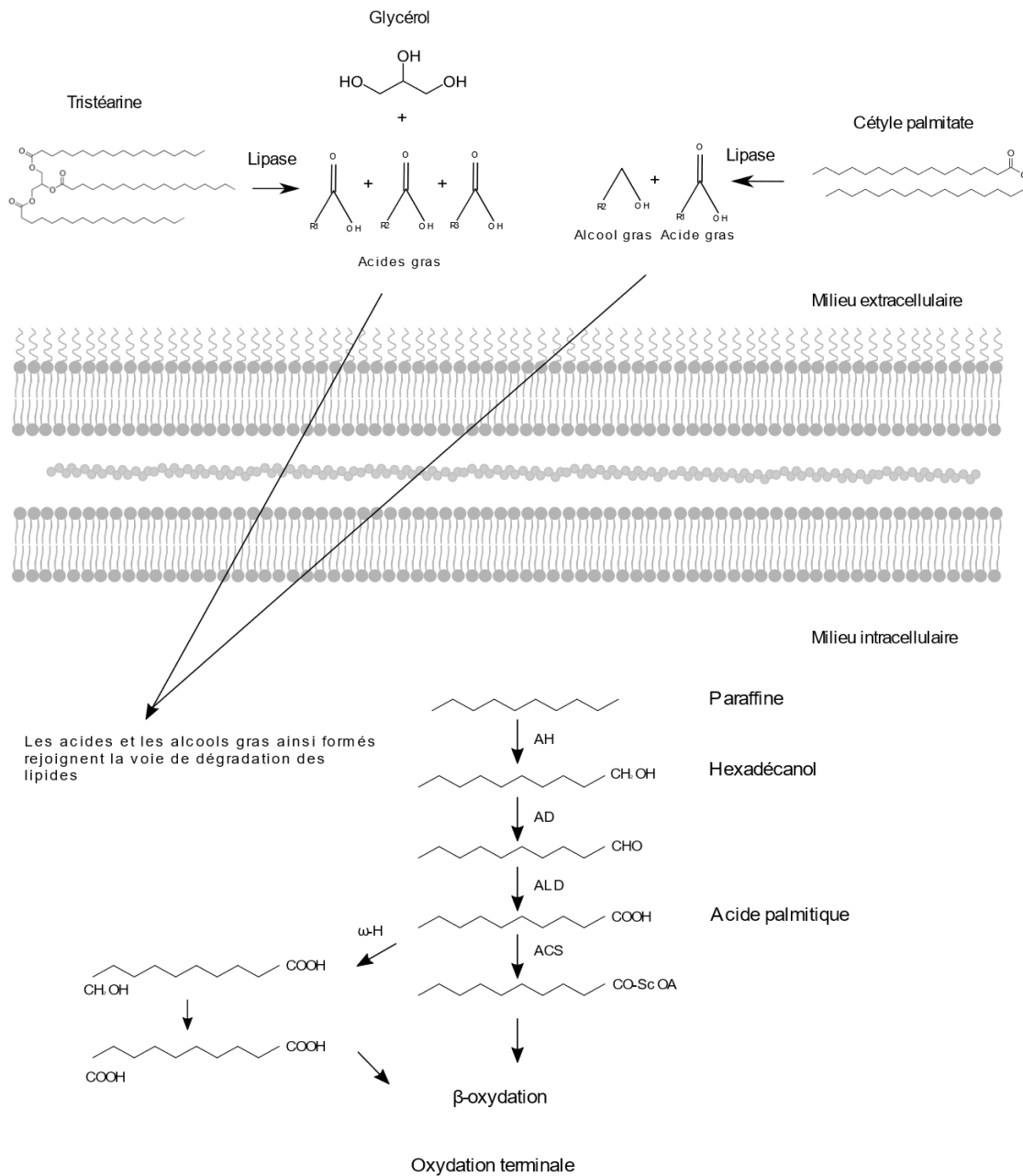


Figure V.1. Voies de dégradation des alcanes par oxydation terminale et subterminale.

La tristéarine et le cétyle palmitate (en haut) commencent à être dégradés hors de la cellule sous l'action de lipases puis sont internalisés pour rejoindre la voie de dégradation des lipides. La paraffine, l'hexadécanol et l'acide palmitique sont des intermédiaires de la voie de dégradation des lipides. AH, alcane hydroxylase ; AD, alcool déshydrogénase ; BVM, Baeyer-Villiger monooxygénase ; E, estérase ; TCA, acide tricarboxylique ; ALD, aldéhyde déshydrogénase ; ACS, acyl-coenzyme A synthétase ; ω -H, ω -hydroxylase. Adapté de (Rojo, 2009).

Mh JM1 est capable de dégrader une large gamme de substrats, tels que l'acétate, la paraffine et la tristéarine, comme présenté dans le chapitre précédent (Chapitre 4 : **Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes d'acquisition de ce métal selon le substrat chez *Mh JM1***). Le choix de ces trois composés pour la rédaction d'un article scientifique s'est justifié par le fait qu'ils sont représentatifs des substrats dégradables par *Mh JM1*. L'acétate est la condition où les cellules se développent sous forme planctonique, alors que sur paraffine et tristéarine, la formation d'un biofilm est nécessaire, et sont respectivement, un alcane (premier intermédiaire de la voie de dégradation des alcanes) et un tri-ester (qui subit initialement une dégradation extracellulaire avant d'atteindre le cytoplasme). Ces trois composés impliquent donc trois métabolismes différents. Dans ce travail, l'étude du besoin en fer a également été réalisée sur d'autres intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes : l'eicosane, qui est un alcane linéaire de formule $C_{20}H_{42}$, différent de la paraffine qui elle est un mélange d'alcanes dont le nombre de carbones varie entre 18 et 32, l'héxadécanol (un alcool gras), l'acide palmitique (un acide gras) et enfin le cétyle palmitate (un ester). Les voies de dégradation de tous ces composés sont indiquées dans la **Figure V.1**. De la même manière que pour les expérimentations sur acétate, paraffine et tristéarine, des suivis de croissance ont été réalisés sur ces nouveaux substrats, avec toutefois un nombre de réplicats moins élevé.

Les résultats présentés dans le chapitre précédent (Chapitre 4 : **Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes d'acquisition de ce métal selon le substrat chez *Mh JM1***) ont montré qu'une croissance sur tristéarine nécessite moins de fer que sur paraffine ou acétate. Une contamination en fer de la tristéarine pourrait expliquer ces besoins moins élevés. Pour le vérifier, des expérimentations ont été réalisées afin de connaître la teneur en fer des substrats paraffine et tristéarine. La principale difficulté est la forte concentration en composés organiques, qui nécessite par conséquent une dilution importante des substrats préalablement dissous pour une analyse en ICP-MS.

En outre de l'étude des besoins en fer selon la source de carbone, un autre objectif a également guidé ma thèse : déterminer par quels mécanismes *Mh JM1* est capable d'acquérir du fer dans son milieu. Aussi, en plus des mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ décrits dans le chapitre précédent (Chapitre 4 : **Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes d'acquisition de ce métal selon le substrat chez *Mh JM1***), d'autres mutants ont été construits, en commençant avec $\Delta asbF$, le premier mutant incapable de produire la pétrobactine. Des délétions de transporteurs TonB-dépendants ont également été réalisées, pour aboutir aux mutants $\Delta 3432$, $\Delta cirA$ et $\Delta fhuE$. Les phénotypes de ces mutants ont été comparés à celui de la souche sauvage en MEM à différentes concentrations en fer

(0, 100, 200 et 7200 nmol.L⁻¹ de FeCl₃) en utilisant de l'acétate, de la paraffine et de la tristéarine comme sources de carbone.

Enfin, tout au long de ce travail, plusieurs protocoles ont été essayés pour quantifier avec précision le fer intracellulaire. Pour cela, il est nécessaire de retirer tout le fer qui est adhérent à la surface des cellules et qui fausse par conséquent les analyses. Plusieurs techniques ont été employées : utilisation de solutions chélatant le fer et acidification du milieu de culture pour dissoudre le fer.

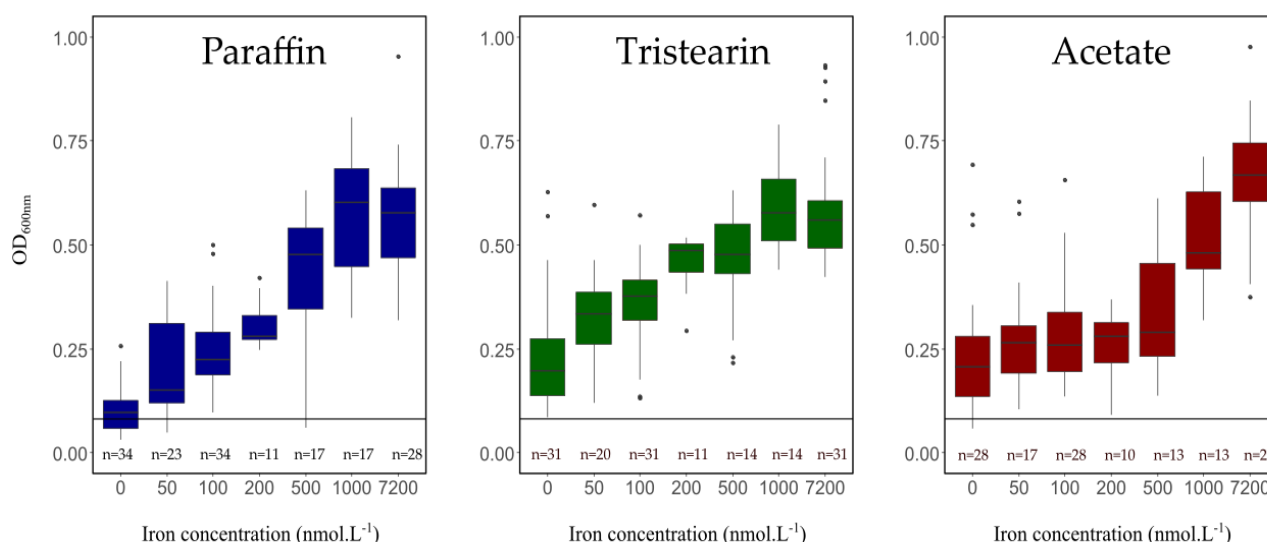


Figure V.2. Comparaison de la croissance de *Mh JM1* sur paraffine, tristéarine et acétate à différentes concentrations en fer.

Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 120h à différentes concentrations en fer, en présence de paraffine (gauche), tristéarine (centre) ou acétate (droite) comme sources de carbone. La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de réplicats est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

1. Croissance de *Mh JM1* sur les différents intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes

Dans le chapitre 4, il a été démontré qu'une croissance planctonique en acétate et en biofilm sur paraffine nécessitent plus de fer que sur tristéarine. Ainsi, lors d'un développement en biofilm, la nature du substrat influe sur les besoins en fer des cellules. Ces résultats sont rappelés en **Figure V.2**. Une explication possible est que la dégradation de la paraffine nécessite des alcanes hydroxylases, qui sont des systèmes enzymatiques contenant des protéines à fer (Austin and Groves, 2011; Rojo, 2009; Shao and Wang, 2013), impliquant une demande plus élevée de ce métal. Pour confirmer ce résultat, les mêmes expérimentations ont été réalisées sur d'autres substrats, en commençant par un alcane différent de la paraffine, l'eicosane, dont les résultats sont présentés en **Figure V.3**. Pour ce substrat, seules 4 concentrations ont été utilisées : 0, 100, 200 et 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté.

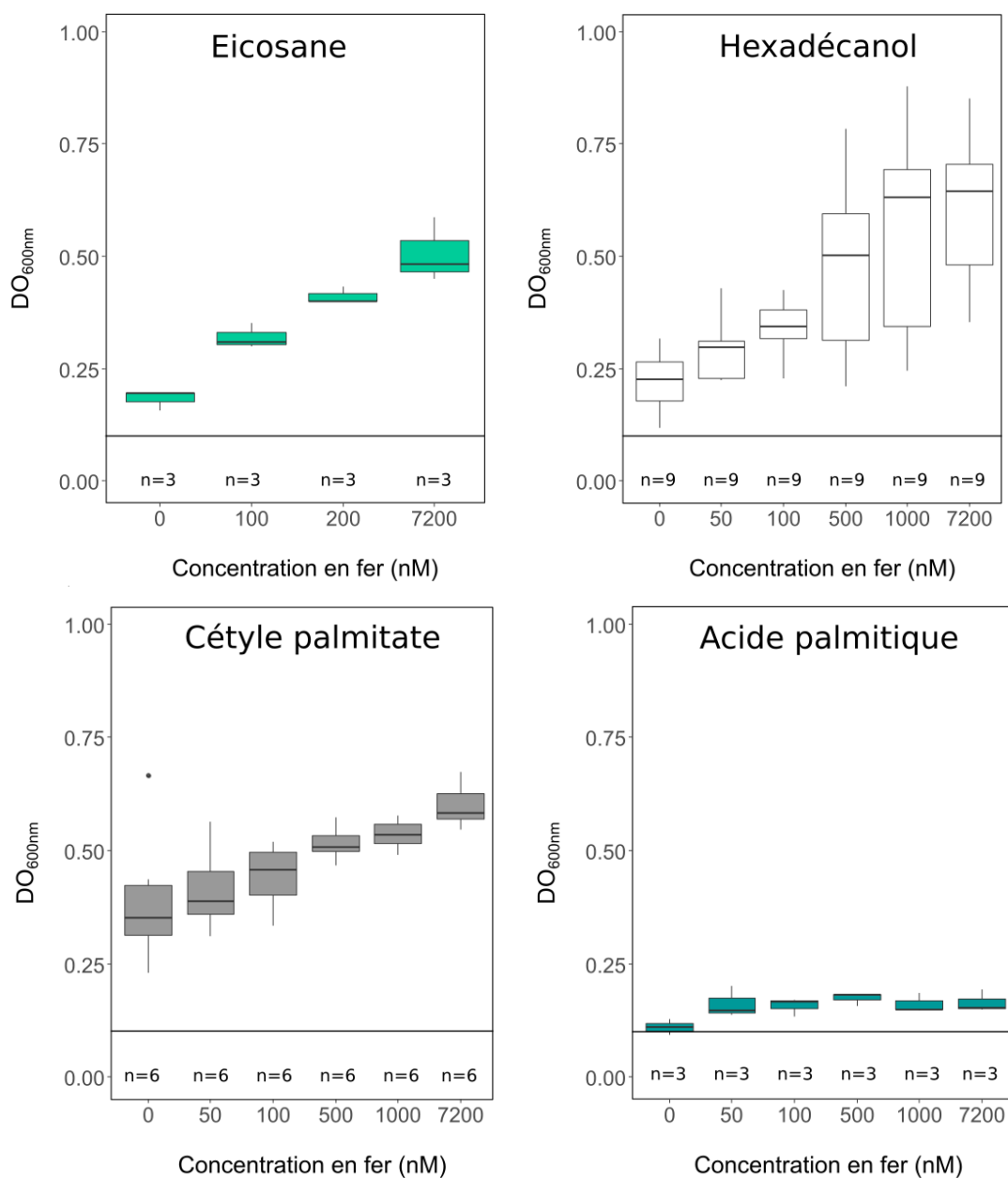


Figure V.3. Comparaison de la croissance de *Mh* JM1 sur des intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes à différentes concentrations en fer.

Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 120h à différentes concentrations en fer, en présence d'eicosane, hexadécanol, cétyle palmitate ou acide palmitique comme sources de carbone.

La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de réplicats est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

La croissance de *Mh* JM1 sur eicosane ressemble fortement à celle obtenue sur les autres substrats où les cellules se développent en biofilm : plus la concentration en fer dans le milieu est élevée, plus la DO_{600nm} augmente. Les résultats sont également comparables à ceux obtenus en paraffine dans la condition où aucun fer n'a été ajouté car la croissance est sensiblement plus faible que sur les autres substrats, avec une DO_{600nm} de 0,19. Ainsi, avec la paraffine dont la DO_{600nm} était de 0,1, il s'agit des deux substrats où la biomasse est la plus faible dans cette condition, impliquant probablement que la dégradation des alcanes nécessite plus de fer que pour celle des autres substrats. A titre de comparaison, la DO_{600nm} en tristéarine dans cette condition était de 0,25.

D'autres intermédiaires de la voie de dégradation ont également été utilisés, avec un alcool gras, l'hexadécanol dont les résultats sont présentés en **Figure V.3**. Tout comme pour les autres substrats impliquant un développement en biofilm, plus la concentration en fer est élevée, plus la croissance sur hexadécanol augmente, et ce jusqu'à 1000 nmol.L^{-1} de fer ajouté. Comme pour paraffine et tristéarine, entre 1000 et 7200 nmol.L^{-1} de fer ajouté, la biomasse finale n'augmente plus.

La croissance de *Mh* JM1 a également été réalisée avec de l'acide palmitique comme source de carbone, dont les résultats sont présentés en **Figure V.3**. Il s'agit d'un acide gras, qui est parmi tous les substrats utilisés au cours de cette étude, l'intermédiaire le plus avancé dans la voie de dégradation des alcanes. Un point important à noter est que la quantification du biofilm sur l'acide palmitique est difficile car ce dernier piège une quantité importante de cristal violet, compliquant la mesure de la quantité de biomasse en la sous-estimant. L'acide palmitique n'est donc pas un substrat adapté pour étudier les besoins en fer de *Mh* JM1, c'est pourquoi la croissance n'a été mesurée que sur 3 réplicats. Il semble toutefois que la dépendance vis-à-vis du fer ne soit pas très marquée, la biomasse n'augmente pas entre 50 et 7200 nmol.L^{-1} de fer ajouté.

Le cétyle palmitate, un ester, est le dernier substrat utilisé pour ces expérimentations évaluant l'effet de la concentration en fer sur la croissance. Tout comme pour la tristéarine, une première dégradation extracellulaire sous l'action d'une lipase est nécessaire pour que les cellules puissent l'assimiler (**Figure V.1**). Cette étape débouche sur la formation d'alcools et d'acides gras, qui sont transportés vers le cytoplasme et rejoignent la voie de dégradation des lipides. Les résultats présentés en **Figure V.3** montrent que comme pour les autres croissances en biofilm, le développement de *Mh* JM1 est positivement corrélé avec l'augmentation de la concentration de fer. Les besoins en fer sont moins élevés que sur alcane, car de la même manière que pour la tristéarine, la biomasse finale dans

la condition où aucun fer n'est ajouté est supérieure à celles obtenues sur paraffine et eicosane, avec une valeur de 0,35 contre 0,1 et 0,19, respectivement. Une différence majeure entre le cétyle palmitate et les autres substrats est que les cellules sont limitées en fer dans toutes les conditions. En effet, en condition biofilm, il n'y a que sur ce substrat que la DO_{600nm} augmente entre 1000 $nmol.L^{-1}$ et 7200 $nmol.L^{-1}$ de fer ajouté, passant de 0,53 à 0,58. Même à forte concentration en fer, la croissance sur cétyle palmitate semble encore être limitée par le métal, suggérant des besoins en fer plus élevés que sur les autres substrats. Ce résultat est surprenant car comme mentionné quelques lignes au-dessus, la dégradation du cétyle palmitate forme des alcools et des acides gras. Or les croissances sur hexadécanol (alcool gras) ou même sur tristéarine qui aboutit également à la formation d'acides gras, n'augmentent pas entre 1000 et 7200 $nmol.L^{-1}$ de fer ajouté.

Les résultats présentés ici confirment bien ceux obtenus dans le chapitre précédent. En effet, la source de carbone implique des besoins en fer variables. A l'exception du cas particulier qu'est l'acide palmitique, tous les substrats insolubles ont un profil similaire : plus la concentration en fer dans le milieu de culture augmente, plus la croissance est élevée. La paraffine et l'eicosane, tous deux des alcanes, sont ceux ayant la croissance la moins élevée dans la condition où aucun fer n'a été ajouté au milieu de culture. En hexadécanol, le fer est limitant pour la croissance jusqu'à une concentration de 1000 $nmol.L^{-1}$, également observé sur paraffine et tristéarine. Le cétyle palmitate est en revanche le seul substrat insoluble où la DO_{600nm} augmente significativement entre 1000 et 7200 $nmol.L^{-1}$ de $FeCl_3$. Ces résultats supplémentaires confirment bien que lors d'une croissance en biofilm, les besoins en fer varient en fonction de la source de carbone. La croissance de *Mh JM1* sur alcane est plus faible que pour les autres substrats lorsqu'aucun fer n'est ajouté au milieu de culture. Cette variabilité en termes de besoin en fer selon le substrat peut s'expliquer par des métabolismes différents, comme il en a été discuté dans le chapitre précédent. Il est donc possible que l'alcane deshydrogénase impliquée dans la dégradation des alcanes nécessite une quantité importante de fer, limitant la croissance des cellules lorsque le métal est présent à trop faible concentration. Néanmoins, une autre possibilité envisagée expliquant cette variation pourrait être que certains d'entre eux soient contaminés en fer ou que quelques substrats piègent de manière plus efficace ce métal que d'autres. C'est pour cette raison que tout au long de ma thèse j'ai essayé d'établir des protocoles permettant de quantifier le fer piégé ou contenu dans les différents substrats.

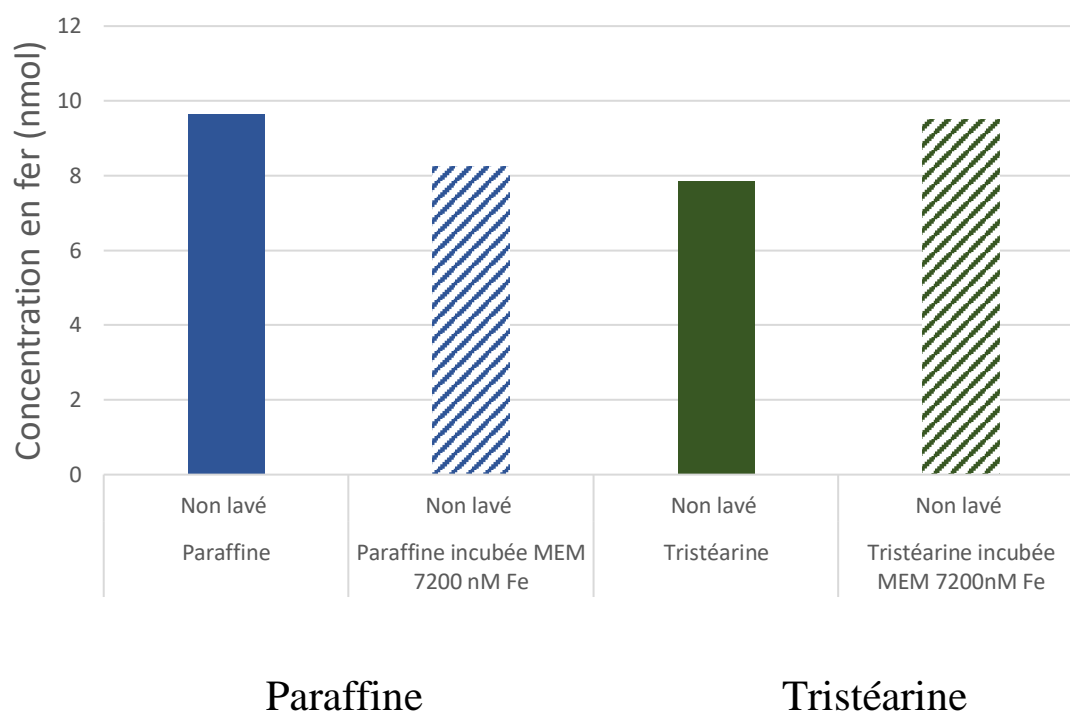


Figure V.4. Quantité de fer présent dans la paraffine et la tristéarine avant et après incubation dans un milieu riche en fer.

Histogramme représentant la quantité de fer détecté dans la paraffine et la tristéarine dans deux conditions différentes : sans incubation et avec incubation avec du MEM 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté.

2. Quantification du fer piégé et contenu dans les différents substrats

Comme il en a déjà été discuté précédemment, la croissance de *Mh* JM1 sur paraffine nécessite plus de fer que sur tristéarine. Pour écarter la possibilité que cette variabilité soit due à une contamination en fer de la tristéarine, la quantité de fer contenu dans ces deux substrats a été mesurée par ICP-MS. Les résultats sont présentés en **Figure V.4**. D'après les analyses, un puits de 0,2 g de paraffine contiendrait 540 ng de fer, soit 9,64 nmol. Pour 0,2 g de tristéarine, il y aurait 440 ng de fer, soit 7,86 nmoles. La principale difficulté de ces dosages est que pour pouvoir être analysés, les substrats une fois dissous doivent encore être dilués. La dilution représente un facteur d'erreur pour l'analyse et de plus, les valeurs mesurées sont très proches de la limite de détection de l'appareil. Par conséquent, il est possible que les concentrations obtenues ne soient pas représentatives de la réalité. En supposant que ces données soient fiables, les quantités de fer dans les substrats sont assez

similaires, et sont contenues dans la totalité du substrat, alors que les cellules ne sont en contact qu'avec la surface. De plus, la paraffine contient plus de fer que la tristéarine, par conséquent il est possible d'écarter l'hypothèse que seule la tristéarine est contaminée en fer.

Une autre possibilité envisagée a été qu'un substrat puisse piéger plus facilement le fer qu'un autre et ainsi augmenter de manière significative la concentration du métal à sa surface, qui pourrait alors être récupéré par les cellules, par exemple en produisant des sidérophores ou par un contact direct. Pour vérifier cette hypothèse, la paraffine et la tristéarine ont été incubées avec du milieu riche en fer. Après lavage puis dissolution des substrats et quantification du fer, la quantité de métal détecté est très proche de celle sans incubation (à environ 1 nmol près, probablement dû à des approximations de dilution), comme indiqué dans la **Figure V.4**. Par conséquent, ni la paraffine ni la tristéarine ne retiennent des quantités importantes de fer à leur surface. Les résultats discutés dans ce paragraphe semblent indiquer qu'une contamination en fer ne soit pas l'explication de la variabilité des besoins en fer. Nous avons toutefois essayé de le confirmer en analysant la paraffine, l'eicosane et la tristéarine par ablation laser. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'apporter de nouvelles informations quant à une contamination éventuelle de la tristéarine (données non présentées). En effet, les rapports $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$ sont erronés, empêchant toute conclusion sur les données. D'autres techniques d'analyses, tels que le TOF-SIMS (*Time Of Flight – Secondary Ion Mass Spectrometry*) ou le XPS (*X-Ray photoelectron*) ont été employées pour essayer de mesurer le fer contenu dans la paraffine et la tristéarine, mais sans succès car la limite de détection était trop haute (données non présentées). Toutes ces tentatives, même si elles n'ont pas permis d'estimer avec précision la quantité de fer présent dans les substrats, indiquent que la concentration semble assez faible car elle se situe toujours en dessous de la limite de détection. Par conséquent, il est très fortement plausible que même si une contamination de ce métal est possible, celle-ci sera faible, et n'explique probablement pas le fait que la croissance de *Mh JM1* sur tristéarine nécessite moins de fer que sur paraffine. Ainsi, si la source de carbone implique des besoins en fer variables, cela sous-entend que les cellules ont besoin de plus de fer ou qu'elles acquièrent le fer de manière plus efficace dans une condition que dans une autre. Il est de cette manière possible que les mécanismes d'acquisition du fer puissent être différents en fonction de la source de carbone. Un autre aspect également intéressant est d'étudier la quantité de fer intracellulaire. En effet, si une condition nécessite plus de fer qu'une autre, avec par exemple la surproduction d'enzymes contenant du fer, il est fortement probable que les teneurs en fer intracellulaire puissent être variables d'une condition à une autre.

3. Lavage des culots pour retirer le fer intracellulaire

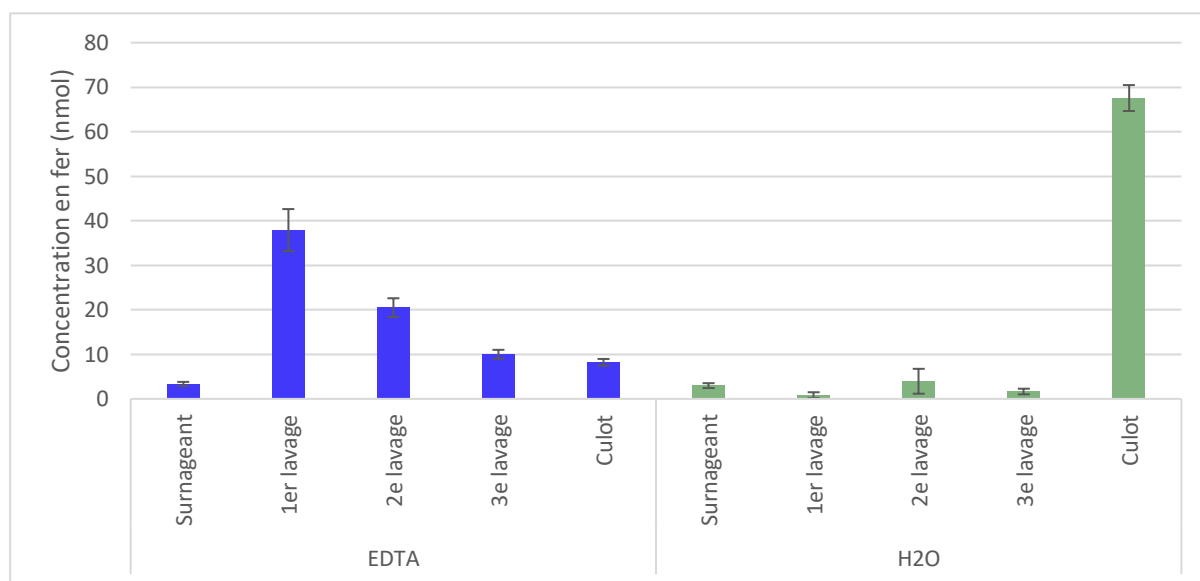


Figure V.5. Quantité de fer détecté dans les surnageants après lavage à l'eau et à l'EDTA.

Histogramme représentant la quantité de fer après trois lavages de cellules avec de l'EDTA 0,1 mol.L⁻¹ (en bleu) ou de l'eau (en vert) et dans les culots après ces trois lavages. Réalisé sur trois réplicats.

Tout au long de ce travail, un objectif était de mesurer avec précision le fer intracellulaire. Dans le but de retirer le fer adhérent à la surface de la cellule, plusieurs expérimentations ont été réalisées. Tout d'abord, les cellules ont été lavées avec de l'eau et de l'EDTA. La **Figure V.5** montre que les lavages à l'eau ne retirent qu'une infime partie du fer. En effet, après 3 lavages, la quantité de fer dans le culot est d'environ 67 nmol. En sachant que le milieu de culture utilisé pour l'incubation contient 71,7 nmol de fer, cela prouve bien que des lavages à l'eau ne retirent pas le fer provenant du milieu de culture. Le fer étant présent sous forme de particules telles que la ferrihydrite, l'eau ne permet pas leur dissolution, et ces particules se retrouvent au niveau du culot lors de la centrifugation. En revanche, la solution d'EDTA 0,1 mol.L⁻¹, permet de retirer efficacement le fer adhérent sur les cellules. En effet, lors du troisième lavage, la quantité de fer détecté dans le culot (8 nmol) est réduite de 7 fois par rapport à des lavages réalisés avec de l'eau. La principale difficulté est que ces nombreux lavages ont pour effet de solubiliser une petite partie du culot, augmentant par conséquent la quantité de fer dans le surnageant. Une solution alternative a alors été étudiée pour limiter le nombre de centrifugation : en acidifiant le milieu, le fer devrait se retrouver majoritairement sous forme Fe²⁺, et donc soluble.

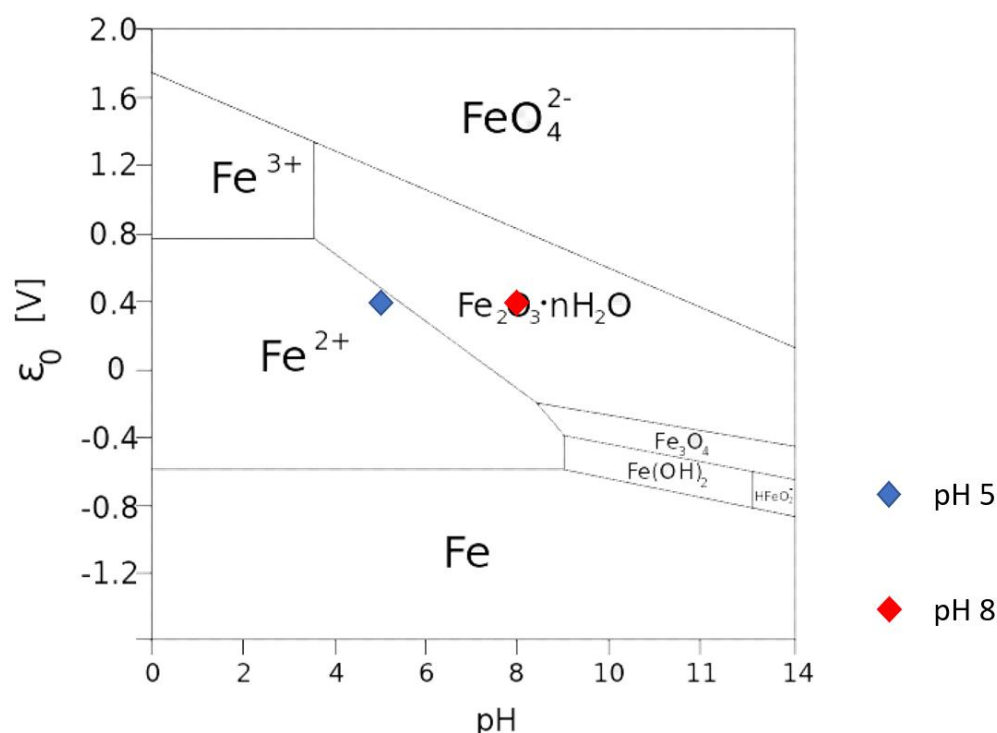


Figure V.6. Diagramme de Pourbaix indiquant la forme du fer en fonction du pH et du potentiel redox.

Les losanges rouges et bleus indiquent les formes du fer en fonction du pH et du potentiel redox de l'eau de mer. La composition du MEM étant identique à celle de l'eau de mer, ce diagramme peut s'appliquer à notre milieu de culture. Adapté de (Susanto, 2020).

Des cultures planctoniques sur acétate et en biofilm sur paraffine et tristéarine ont alors été réalisées. Après 24h de croissance pour la condition planctonique et 48h pour la condition biofilm, les cellules ont été lavées une première fois avec du milieu sans fer à pH 8 pour retirer l'éventuelle fraction soluble du fer. Un nouveau lavage a été réalisé avec du milieu de culture acidifié à pH 5. D'après le diagramme de Pourbaix, présenté en **Figure V.6**, l'eau de mer (et donc par extension le MEM) a un potentiel compris entre 0,2 et 0,4 (Cooper, 1937; Krumbein and Garrels, 1952). Dans notre milieu de culture, à ce potentiel et à pH 5, le fer est bien sous forme soluble. De cette manière, le lavage du culot avec du milieu à ce pH devrait solubiliser le fer qui se retrouvera alors dans le surnageant. La viabilité des cellules à pH 5 a également été vérifiée au microscope afin de s'assurer qu'elles ne lysent pas dans ces conditions. Les images de microscopie sont présentées en **Figure V.7** et démontrent que le lavage des cellules avec du MEM acidifié ne conduit pas à leur lyse. Le fer contenu dans les surnageants des lavages et des culots a ensuite été quantifié par ICP-MS.

Malheureusement, l'analyse de ces échantillons n'a pas permis de valider cette méthode (données non présentées). En effet, les surnageants après lavage du culot avec du MEM à pH 5 contiennent la même quantité de fer que ceux des lavages avec du MEM à pH 8, et la quasi-totalité du fer se retrouve dans les culots. La difficulté lors de ce dosage est que même avec un nombre réduit de centrifugations, une partie du surnageant s'est retrouvée dans le culot, faussant ainsi les quantités de fer mesurées. Les cultures ont été réalisées dans un volume de 10 mL. Lorsque ces expérimentations seront faites à nouveau, le volume de culture sera plus conséquent.

Jusqu'à présent, aucun protocole n'a permis de retirer efficacement le fer adhérent à la surface des cellules. Par conséquent, le dosage du fer intracellulaire n'a pas pu être réalisé.

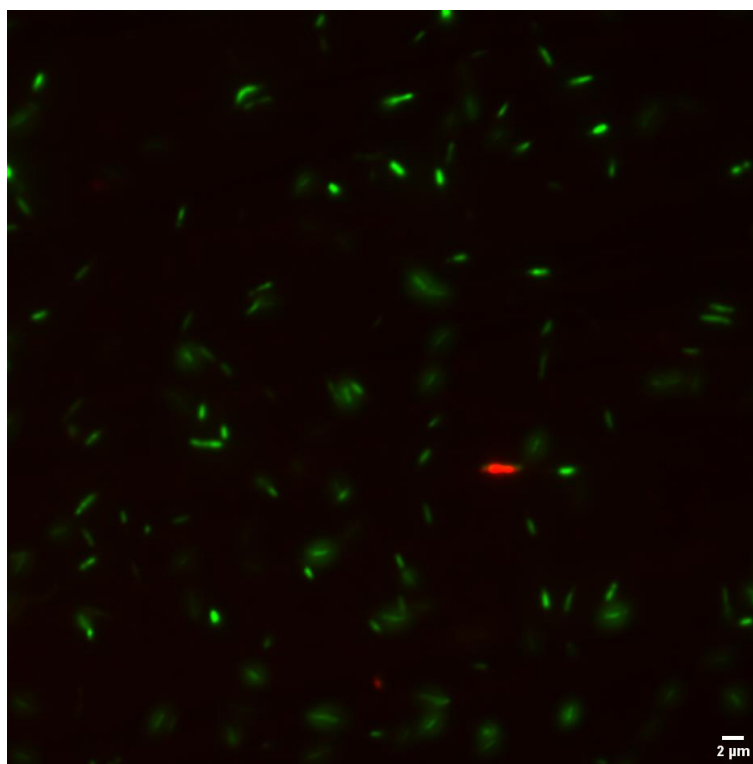


Figure V.7. Observation de l'intégrité des cellules par marquage avec les fluorophores SYTO-9 et iodure de propidium après un lavage dans du MEM acidifié à pH 5 en microscopie à fluorescence.

Le SYTO-9 pénètre dans toutes les cellules et produit une fluorescence verte. A l'inverse, l'iodure de propidium ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est endommagée, engendrant avec le SYTO-9 une fluorescence rouge. Par conséquent, les cellules fluoresçant en vert sont considérées comme intègre et donc vivantes alors que celles fluoresçant en rouge sont considérées comme mortes.

4. Quantification de la pétrobactine intracellulaire et du complexe pétrobactine-fer

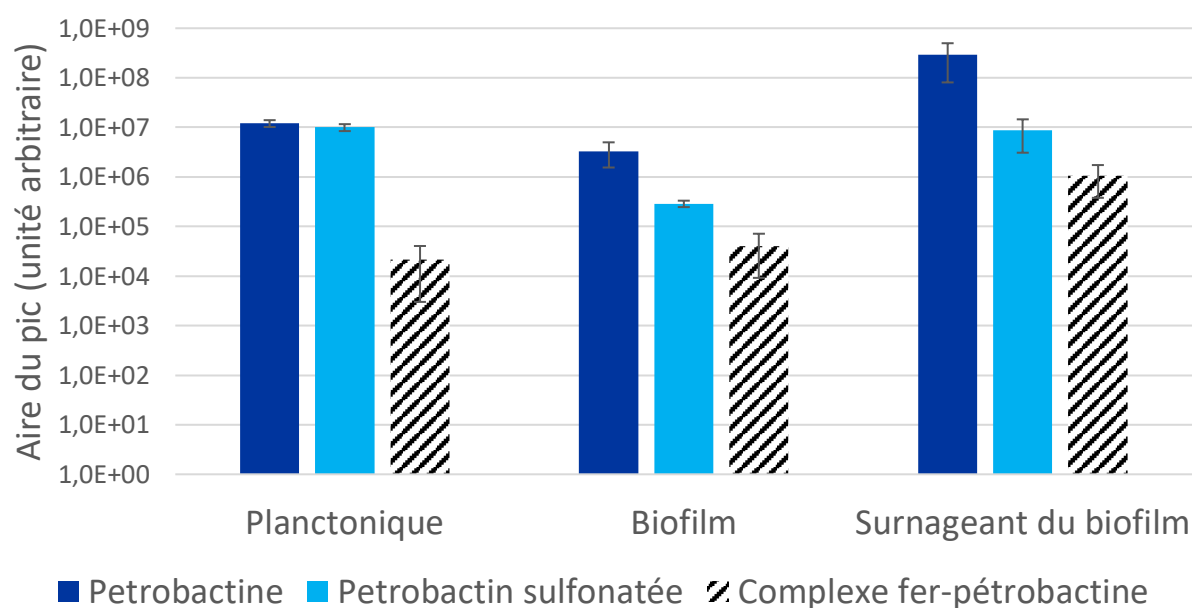


Figure V.8. Proportions des différentes formes de la pétrobactine et du complexe pétrobactine-fer retrouvées dans les surnageants de culture et le biofilm de *Mh* JM1.

Détection des pétrobactines (non sulfonaté -en bleu foncé- et mono-sulfonaté -en bleu clair-) et du complexe pétrobactine fer -hachuré- par ESI-MS dans le milieu de culture après 120h de croissance dans une culture pauvre en fer (100 nmol.L⁻¹ de fer ajouté). Pour la condition planctonique, la pétrobactine a été recherchée dans le surnageant. Pour la condition biofilm, le surnageant a été retiré, le biofilm gratté puis resuspendu dans du milieu, puis la pétrobactine a été recherchée dans ce milieu après filtration. Pour la condition surnageant du biofilm, la pétrobactine a été recherchée directement dans le milieu de culture du biofilm, après filtration. L'échelle de l'axe des ordonnées est logarithmique.

Le complexe pétrobactine-fer n'a été détecté qu'en très faible quantité durant les dosages du sidérophore dans le milieu de culture. Les dosages où ce complexe a été recherché ont été réalisés à 120h et bien que surprenant, il est possible qu'en phase stationnaire de croissance, la quasi-totalité des complexes ait déjà été récupéré par les cellules. Bien que le complexe pétrobactine-fer n'ait pas pu être quantifié, il a tout de même été détecté dans le milieu de culture, tant en condition planctonique que biofilm, comme présenté en **Figure V.8**. Cette figure n'indique pas les concentrations de pétrobactine produites, mais il est possible de comparer les résultats entre eux. La barre hachurée, représentant le complexe pétrobactine-fer, est dans toutes les conditions, bien plus faible que celle de la pétrobactine (bleu foncé) et de la pétrobactine sulfonagée (bleu clair). La proportion de complexe est environ 1000 fois plus faible que celle du sidérophore seul, impliquant que la quasi-totalité des complexes pétrobactine-fer aurait été récupérée par les cellules. Les résultats obtenus montrent que la quantité de sidérophore est bien plus élevée dans un surnageant de culture en biofilm que dans le biofilm lui-même (**Figure V.8**). Il est envisageable que les sidérophores soient rapidement exportés dans le milieu extracellulaire pour lier le fer, et qu'une fois le complexe formé, lorsque ce dernier se retrouve dans le biofilm, il soit très rapidement récupéré par les cellules, expliquant sa faible quantité détectée.

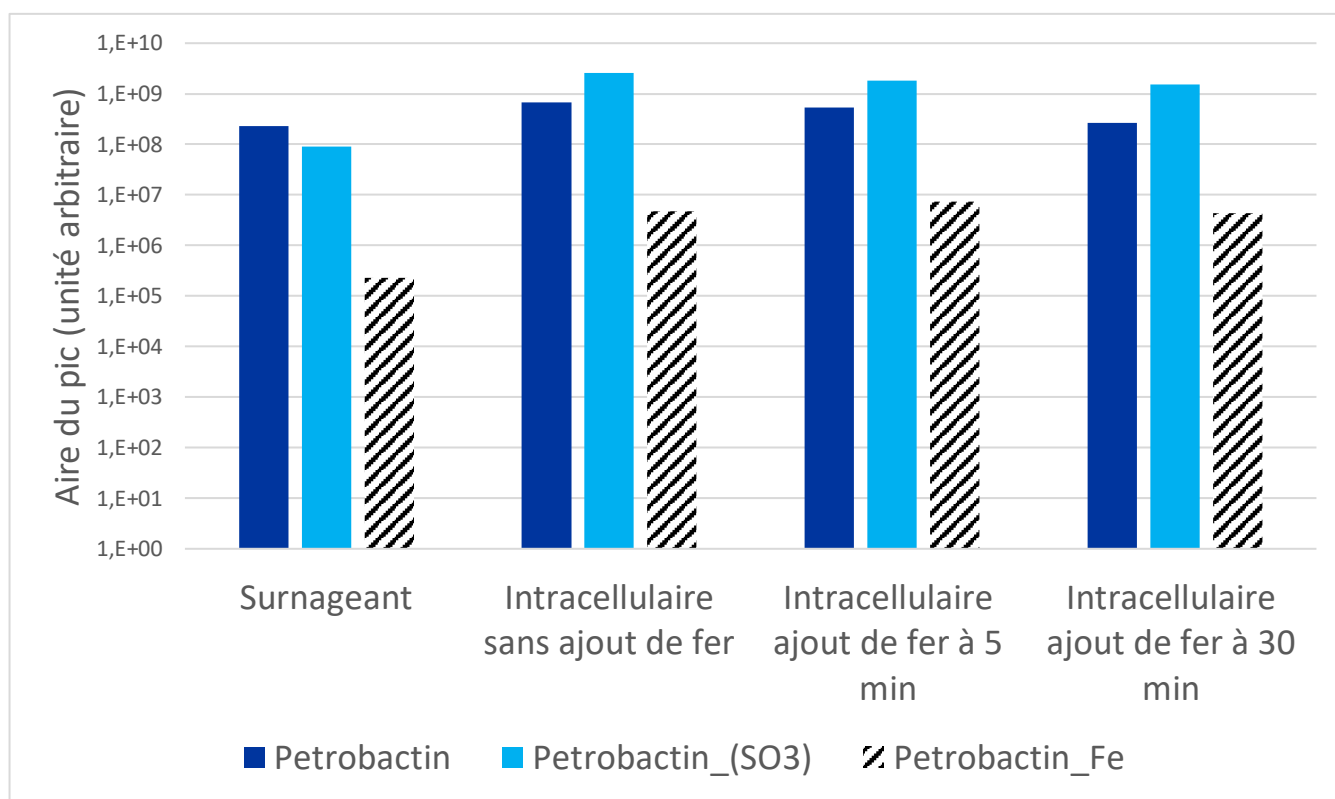


Figure V.9. Détection des différentes formes de la pétrobactine et du complexe pétrobactine-fer dans les milieux intra et extracellulaires.

Détection des pétrobactines (non sulfonaté -en bleu foncé- et mono-sulfonaté -en bleu clair-) et du complexe pétrobactine fer -hachuré- par ESI-MS dans le milieu de culture durant la phase exponentielle de croissance planctonique des cellules de *Mh* JM1. Les sidérophores ont été recherchés dans le surnageant de culture (sans ajout de fer avant la fin de croissance), et dans le contenu intracellulaire sans ajout de fer dans la culture, ou avec ajout de fer ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) 5 min ou 30 min avant arrêt de la culture. L'échelle de l'axe des ordonnées est logarithmique.

Dans le but de détecter ce complexe, mais également pour mesurer la quantité de pétrobactine intracellulaire, des cultures planctoniques de *Mh JM1* ont été arrêtées durant la phase exponentielle. En partant de l'hypothèse que le temps passé par le sidérophore lié au fer dans le milieu extérieur est extrêmement faible, car immédiatement récupéré par les bactéries, il est peut-être plus probable de détecter le complexe directement à l'intérieur de la cellule. Pour optimiser la formation du complexe, une grande quantité de fer a été ajoutée 30 minutes et 5 minutes avant d'arrêter la croissance de *Mh JM1* dans deux échantillons. Les résultats sont présentés en **Figure V.9** et là encore, très peu de complexes fer-sidérophore ont été détectés. Ce résultat est d'autant plus surprenant que ce complexe a déjà été décrit dans la littérature (Abergel *et al.*, 2008). Il est possible que les très faibles quantités détectées de complexe ne soient qu'un artefact. En effet, il est possible que durant l'analyse (pH trop acide par exemple) le complexe soit dissocié, faussant ainsi les résultats.

5. Essais d'imagerie moléculaire pour détecter la pétrobactine à l'intérieur du biofilm de *Mh JM1*

Comme il en a déjà été discuté au cours de ce travail, *Mh JM1* produit la pétrobactine et les dérivés sulfonates. Il n'a encore jamais été expliqué pourquoi ces formes sulfonates (mono- et di) sont produites par les cellules. Comme évoqué dans le chapitre 4, une explication suggérée par Homann et ses collègues en 2009 est que la sulfonation aurait un rôle sur la solubilité du sidérophore (Homann *et al.*, 2009). Une expérimentation intéressante, bien qu'ambitieuse, serait de comparer la diffusion des différentes formes de la pétrobactine au sein d'un biofilm. Pour cela, je suis allé au laboratoire de chimie analytique de Liège pour réaliser de l'imagerie moléculaire à l'intérieur même de biofilms sur alcanes et triglycérides de *Mh JM1*. Des tests préliminaires ont été réalisés en MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) et SALDI (*Surface Assisted LDI*). Plusieurs matrices ont été testées en modes d'ionisation positifs et négatifs (détectations d'ions positifs ou négatifs). En ionisation positive, les matrices DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid) et CHCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) sont les plus adaptées pour la détection des deux formes de pétrobactine, à une concentration de l'ordre du micromolaire. Plusieurs échantillons ont alors été testés pour rechercher la pétrobactine à l'intérieur du biofilm. Tout d'abord une culture classique, avec de l'eicosane, qui a été utilisé comme substrat car les biofilms y sont plus épais que sur paraffine ou tristéarine, recouvrant le fond d'une boîte de Pétri et au-dessus duquel du milieu MEM

contenant du fer a été ajouté. Ces conditions se rapprochaient au maximum des conditions de culture en plaques utilisées en routine dans ce travail. Du fer a été ajouté au milieu de culture afin d'obtenir un biofilm de *Mh* JM1 sur la totalité de l'eicosane. Des coupes de ce substrat contenant le biofilm ont alors été réalisées, puis analysées par MALDI-MS. Malheureusement, la pétrobactine n'a pas pu être détectée dans les échantillons, probablement car le sidérophore est présent en trop faible quantité. Pour promouvoir la production de pétrobactine, le même type d'échantillon a été préparé mais aucun fer n'a été ajouté au MEM durant la culture (il a été discuté dans le chapitre précédent qu'une faible quantité de fer stimule la production de sidérophore chez *Mh* JM1). Une fois encore, la pétrobactine n'a pas été détectée dans les échantillons de biofilm. Les surnageants de culture ont été analysés de la même manière que les coupes, et la pétrobactine a été détectée dans certains d'entre eux, indiquant que le sidérophore est bien produit dans ces conditions de culture, mais probablement dans des concentrations trop faibles pour être mesurées à l'intérieur même du biofilm. La quantité de pétrobactine est plus élevée dans le surnageant de culture d'un biofilm que dans le biofilm (**Figure V.8**), expliquant vraisemblablement pourquoi le sidérophore n'y est pas détecté. Plusieurs tentatives ont été réalisées dans le but d'augmenter la production de sidérophore. Ainsi, des cultures ont été réalisées sur eicosane avec et sans fer, avec du MEM liquide recouvrant le substrat durant 2h pour permettre aux cellules d'adhérer au substrat (échantillon 1) ou durant 48h pour obtenir un biofilm (échantillon 2). Après cette première incubation, le liquide a été remplacé par du MEM-agar et la culture a été incubée durant 48h pour le premier échantillon et stoppée immédiatement pour le deuxième échantillon. L'idée est que la pétrobactine diffuse moins dans l'agar que dans le liquide, concentrant ainsi le sidérophore. Lorsque l'eicosane et l'agar sont séparés, le biofilm reste sur ce dernier (Canette *et al.*, 2016) -ce qui a également été confirmé au cours de cette étude par une coloration au cristal violet (données non présentées). Des coupes ont ensuite été réalisées. L'intérêt de cette construction est d'avoir sur une partie de la coupe le biofilm, et également la partie surnageant où la pétrobactine est supposée être plus concentrée. Cette fois encore, les analyses n'ont pas permis de détecter la pétrobactine dans les échantillons. Des coupes d'agar, d'environ 0,5 cm³ ont été broyées dans de l'eau avant d'être analysées de la même manière et dans ce cas, la pétrobactine a pu être détectée à une concentration très proche de la limite de détection, indiquant une nouvelle fois qu'elle est produite, mais à une quantité faible. L'objectif est désormais de réaliser à Pau des cultures où la production de pétrobactine est optimale avec une concentration en fer contrôlée, pour réaliser des coupes qui seront ensuite analysées en Belgique.

6. Étude de gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh* JM1

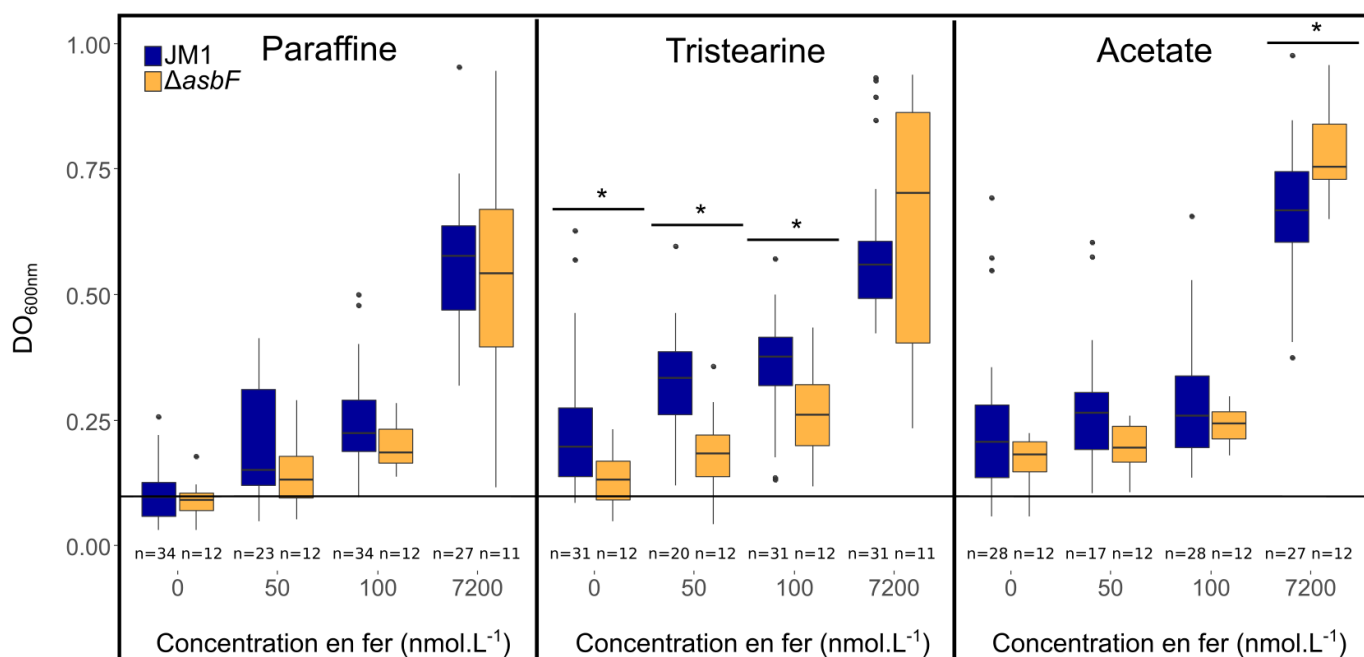


Figure V.10. Comparaison de la croissance de *Mh* JM1 et du mutant $\Delta asbF$.

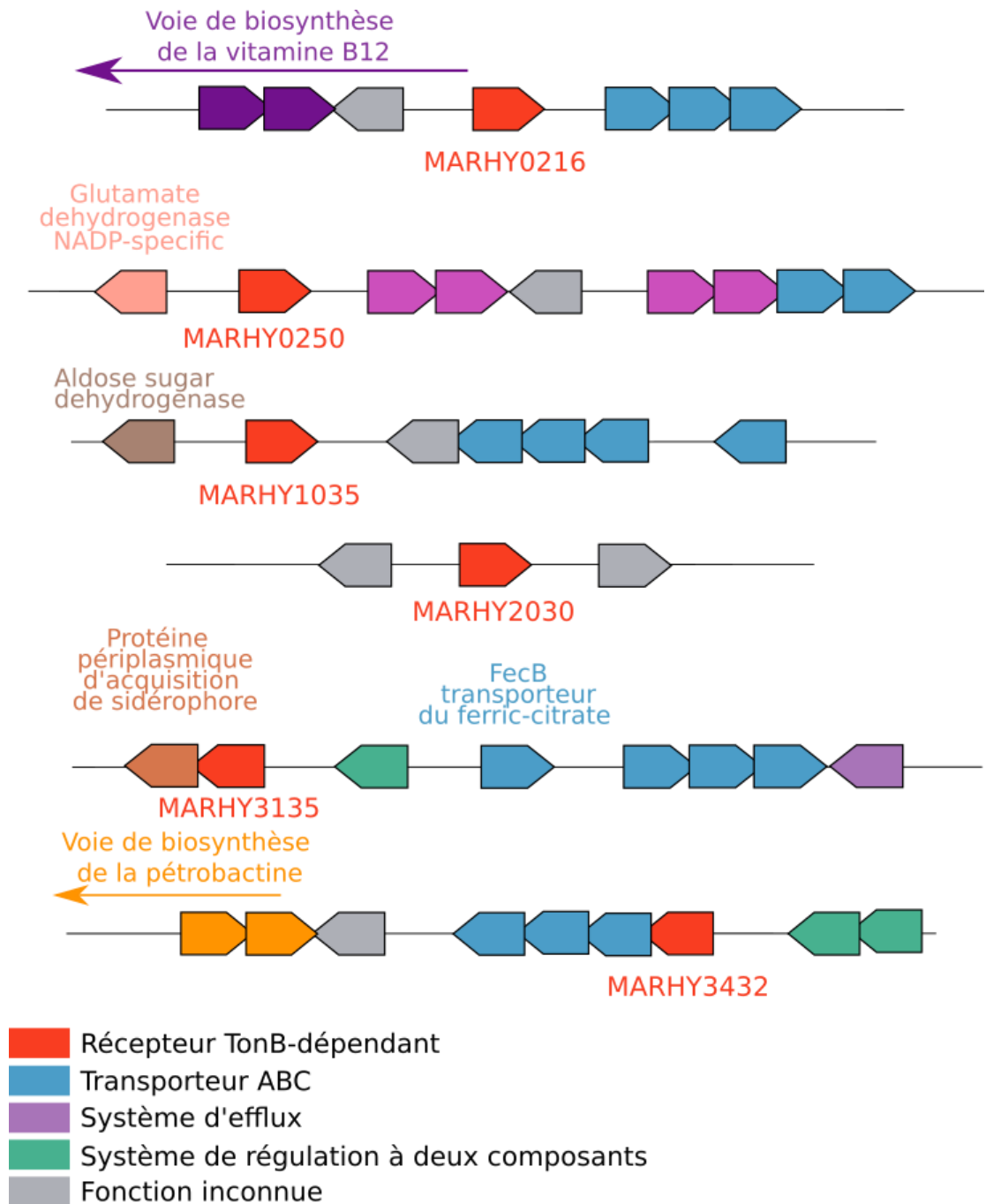
La biomasse a été mesurée après 120h de croissance sur paraffine, tristearine et acétate. La DO_{600nm} correspond à la fraction totale de la biomasse (addition de la fraction biofilm et de la fraction surnageant). Les barres noires représentent l'*inoculum* (la DO_{600nm} de départ était 0,1). Le nombre total de réplicats est indiqué par la lettre n. Les étoiles représentent une différence significative entre le mutant et la souche sauvage (0,01 < pvalue < 0,05).

Comme discuté dans les chapitres 1 et 3, d'après le logiciel AntiSMASH (Blin *et al.*, 2021) (Figure S4 du chapitre 4) et l'étude menée par Amin *et al.* (2012), la pétrobactine est le seul sidérophore produit par *Mh*. Pour étudier l'importance de ce sidérophore dans l'acquisition du fer chez *Mh* JM1, un tout premier mutant délété d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la pétrobactine a été créé. En s'appuyant sur une étude menée par Hagan en 2017 sur *B. anthracis*, certains précurseurs de la pétrobactine, à savoir le citrate et le 3,4-DHB sont capables de lier le fer

dans le milieu extracellulaire puis d'être récupérés par les cellules (Hagan *et al.*, 2017). L'ajout de ces composés, et tout particulièrement du 3,4-DHB permet de restaurer la croissance d'un mutant ne produisant plus la pétrobactine. En prenant en compte ces résultats, la délétion du gène *asbF* semblait être la plus judicieuse, car la protéine AsbF catalyse la conversion du 3-DHS en 3,4-DHB. Une fois ce premier mutant obtenu, son phénotype a été comparé à celui de la souche sauvage en utilisant comme sources de carbone de l'acétate, de la paraffine et de la tristéarine. Les résultats sont présentés dans la **Figure V.10**. Au regard des résultats, le phénotype du mutant $\Delta asbF$ n'est pas aussi marqué qu'attendu. En condition planctonique sur acétate, entre 0 et 100 nmol.L⁻¹ de fer ajouté, il n'y a pas de différence de croissance entre la souche sauvage et le mutant. A la plus forte concentration (7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté), la croissance du mutant est même légèrement plus élevée, s'expliquant probablement par une variabilité importante des valeurs de biomasse mesurées. Il n'y a aucune différence entre les deux souches lors d'une croissance sur paraffine. En revanche en tristéarine, la croissance du mutant est plus faible que celle de la souche sauvage entre 0 et 100 nmol.L⁻¹ de fer ajouté. Les résultats de la souche $\Delta asbF$ montrent de toute évidence que *Mh JM1* est capable d'acquérir le fer d'une autre manière qu'avec seulement la pétrobactine. Ce constat a également été relevé chez *B. anthracis* où un mutant ne produisant plus de pétrobactine était toujours capable de se développer dans un milieu pauvre en fer, bien que sa croissance soit plus lente que celle de la souche sauvage (Lee *et al.*, 2007).

Pour essayer d'obtenir un phénotype plus marqué d'un mutant ne produisant plus la pétrobactine, il a été décidé de déléter trois gènes, *asbA*, *asbB* et *asbF*, pour qu'aucun des intermédiaires du sidérophore ne puisse être produit (**Figure S1** du chapitre 3). Même si la protéine AsbB n'intervient pas dans les premières étapes de biosynthèse de la pétrobactine, les gènes *asbA* et *asbB* ont été tous deux délétés car il a été décrit dans la littérature qu'un mutant de *B. anthracis* délété uniquement du gène *asbA* est tout de même capable de synthétiser un produit de même masse que la pétrobactine (Lee *et al.*, 2007). Bien que surpris, les auteurs ont indiqué qu'*asbB* peut partager suffisamment de similarités avec *asbA* pour permettre la conversion du 3-DHS en 3,4-DHBA, ce qu'ils ont confirmé avec un mutant délété des gènes *asbAB*, qui ne produit plus de composé ayant une masse identique à celle de la pétrobactine. L'analyse détaillée du mutant $\Delta asbABF$ a été réalisée dans le chapitre précédent (Chapitre 4 : **Dépendance vis-à-vis du fer et mécanismes d'acquisition de ce métal selon le substrat chez *Mh JM1***).

A

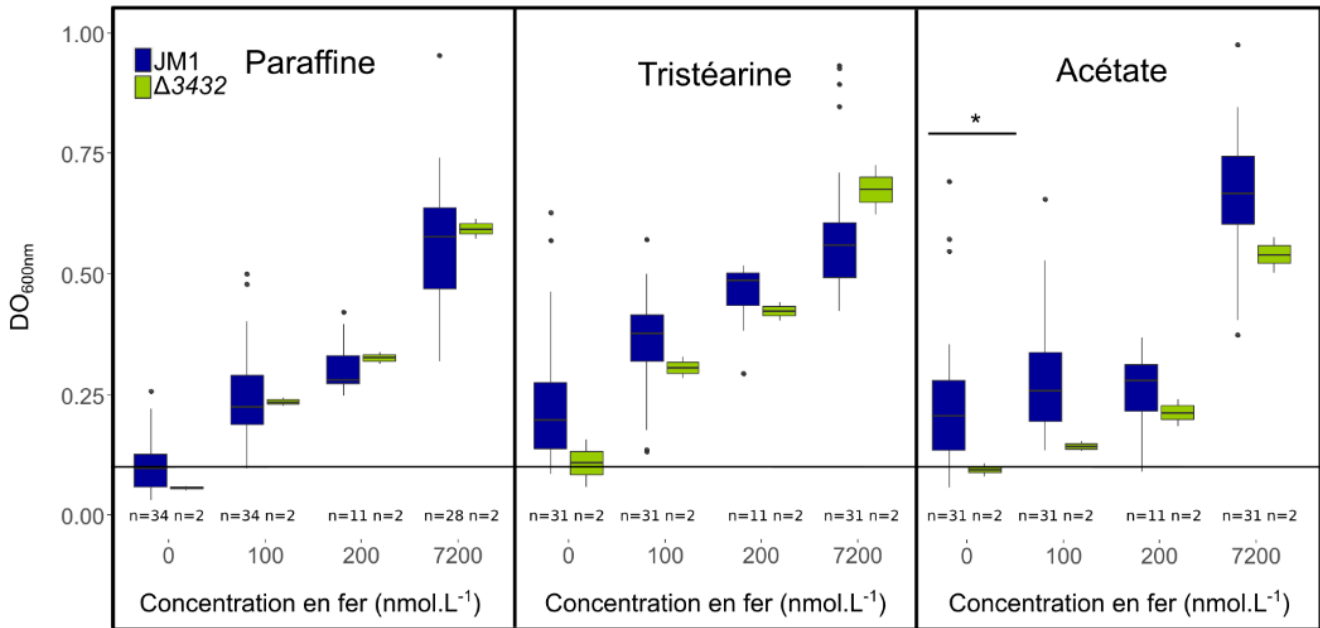


B	Protéine	Homologie	% d'identité
	MARHY0216	Transporteur de la vitamine B12 BtuB chez <i>Photobacterium profundum</i>	32,51
	MARHY0250	Aucune homologie trouvée	
	MARHY1035/FhuE	Récepteur FhuE chez <i>E. coli</i>	35,21
		Récepteur Ferripyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i>	36,36
	MARHY2030	Aucune homologie trouvée	
	MARHY3135/CirA	Transporteur de la vibriobactine (sidérophore catécholé) chez <i>Vibrio cholerae</i>	39,88
	MARHY3432	Transporteur d'hème BhuA chez <i>Brucella melitensis</i>	26,45

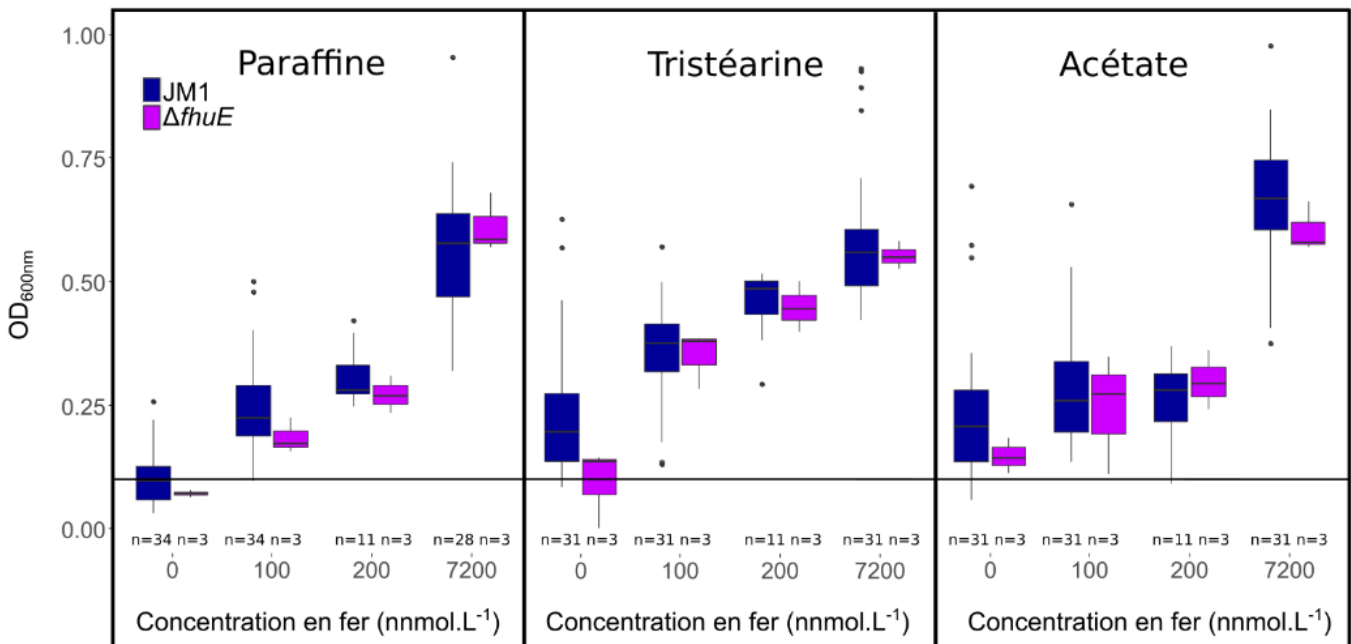
Figure V.11. Transporteurs TonB-dépendant et gènes adjacents retrouvés sur le génome de *Mh JM1* et homologies des récepteurs TonB-dépendants de *Mh JM1*.

- (A) : Les six récepteurs TonB-dépendants de *Mh JM1* sont représentés en rouge, et les gènes adjacents sont indiqués. Les tailles des gènes et les espacements entre les gènes ne sont pas à l'échelle. Lorsqu'il n'y a aucun espace entre les gènes et que ces derniers sont collés entre eux, cela signifie que les gènes sont chevauchants ou qu'il y a moins de 20 pb entre eux, ils sont alors considérés comme étant en opéron. Un même code couleur est utilisé dans la figure. Lorsque la fonction d'un gène, ou d'un groupe de gène est annotée, cela signifie que cette fonction n'est retrouvée qu'une fois dans la figure. Concernant l'environnement du gène *MARHY3135*, le gène adjacent code pour une protéine périplasmique d'acquisition du sidérophore. Le produit de ce gène montre une homologie avec une protéine liant la pétrobactine chez *B. subtilis* (27,27 % d'homologie protéique).
- (B) : Homologies protéiques des récepteurs TonB-dépendants de *Mh JM1*. L'alignement a été réalisé avec l'outil BlastP de NCBI avec la base de données SwissProt. Seul le ou les deux meilleur(s) résultat(s) est (sont) indiqué(s) dans le tableau.

A



B



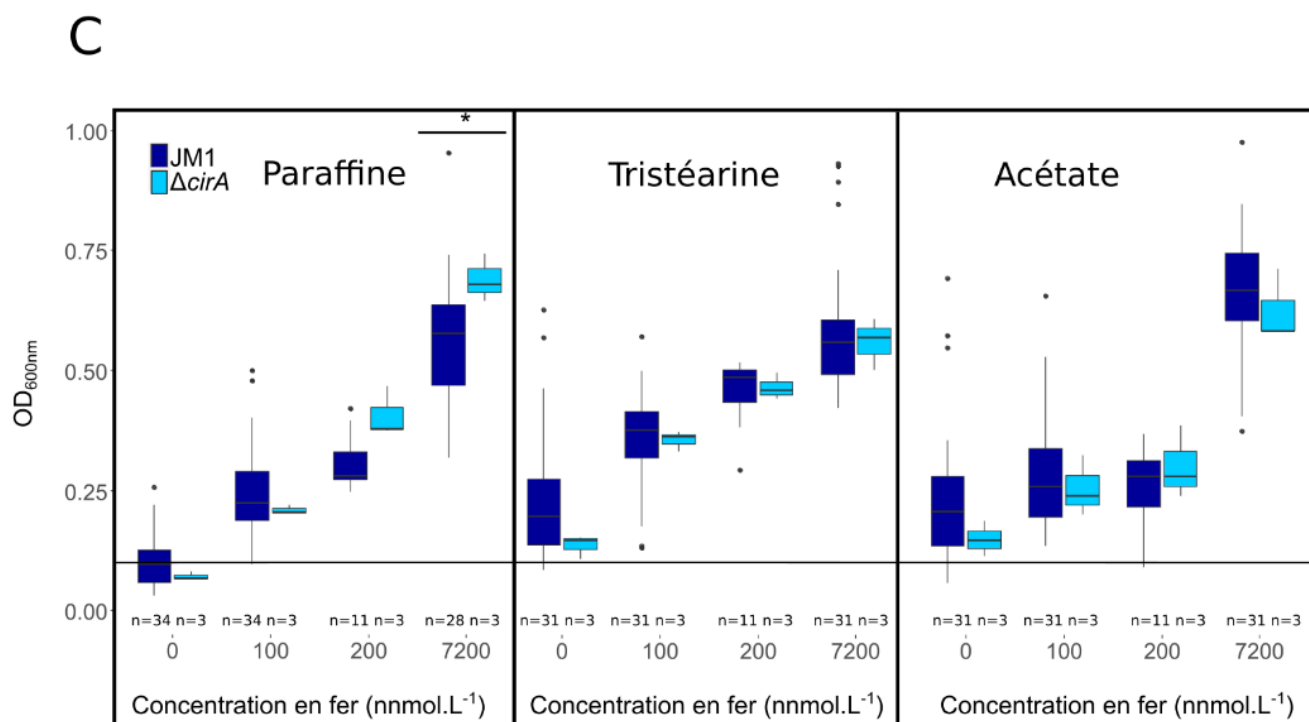


Figure V.12. Comparaison de la croissance entre *Mh* JM1 et les mutants $\Delta 3432$, $\Delta fhuE$ et $\Delta cirA$.

Biomasse mesurée de *Mh* JM1 et des mutants $\Delta 3432$ (A), $\Delta fhuE$ (B) et $\Delta cirA$ (C) après 120h de croissance sur paraffine, tristéarine et acétate. La DO_{600nm} correspond à la fraction totale de la biomasse (addition de la fraction biofilm et de la fraction surnageant). Les barres noires représentent l'*inoculum* (la DO_{600nm} de départ était 0,1). Le nombre total de répliqués est indiqué par la lettre n. Les étoiles représentent une différence significative entre le mutant et la souche sauvage ($0,01 < pvalue < 0,05$).

Au cours de cette étude, d'autres mécanismes impliqués dans le transport du fer ont été étudiés, en plus de la production de pétrobactine et de FbpA. Il est connu que l'import du complexe sidérophore-fer chez les bactéries didermes se fait via un transporteur TonB-dépendant (Noinaj *et al.*, 2010). Six de ces transporteurs sont présents chez *Mh* JM1 : *MARHY0216*, supposé être un transporteur de la vitamine B12 ; *MARHY0250*, supposé être impliqué dans le transport du cuivre ; *MARHY1035* ou *fhuE*, retrouvé chez *E. coli* K12 et impliqué dans l'acquisition du fer(III) via des composés hydroxamate tels que le coprogène, la ferrioxamine B ou l'acide rhodotorulique (Sauer *et al.*, 1990) ; *MARHY2030* ; *MARHY3135* ou *cirA*, impliqué dans le transport de sidérophores catécholates chez d'autres organismes (Domínguez-Acuña and García-del Portillo, 2022; Klein *et al.*, 2022) et *MARHY3432*, récepteur TonB-dépendant situé à proximité de l'opéron de biosynthèse de la pétrobactine. Tous sont indiqués dans la **Figure V.11**, qui contient également les gènes adjacents à ces transporteurs et les éventuelles homologues avec des protéines dont la fonction est connue. Parmi ces transporteurs, trois mutants ne les produisant plus ont été créés et étudiés au cours de ce travail : *MARHY3432* car il se situe à proximité de l'opéron de biosynthèse de la pétrobactine et nous supposons qu'il pourrait s'agir du récepteur de la pétrobactine, *cirA* et *fhuE* car tous deux sont impliqués dans le transport de sidérophores chez d'autres espèces. La croissance à 120h de ces mutants a été comparée à celle de la souche sauvage sur paraffine, tristéarine et acétate à différentes concentrations en fer, 0, 100, 200 et 7200 nmol.L⁻¹ de FeCl₃ ajouté. Les résultats sont présentés en **Figure V.12**.

En condition planctonique, la croissance des mutants $\Delta cirA$ et $\Delta fhuE$ est identique à celle de la souche sauvage quelle que soit la concentration en fer. La tendance est par conséquent identique, la DO_{600nm} ne varie que très peu entre 0 et 200 nmol.L⁻¹, puis la biomasse augmente de manière importante à la plus forte concentration en fer. Pour le mutant $\Delta 3432$, les résultats sont similaires à ceux des deux autres mutants, à l'exception de la condition où aucun fer n'a été ajouté au milieu, où sa croissance est significativement plus faible que celle de la souche sauvage. En effet, pour ce mutant la DO_{600nm} est de 0,1, indiquant que les cellules ne se sont pas développées. En revanche, à partir de 100 nmol.L⁻¹ de fer ajouté, la croissance du mutant n'est plus différente de celle de la souche sauvage. En résumé, la croissance planctonique de ces trois mutants, proche de celle de *Mh* JM1, indique que ces transporteurs ne sont pas essentiels pour la croissance dans ces conditions.

Ces trois mêmes mutants ont également été cultivés en condition biofilm, sur paraffine et tristéarine. Là encore, la croissance des trois mutants est en tout point similaire à celle de la souche

sauvage. La seule différence significative est retrouvée sur paraffine dans la condition où la concentration en fer est la plus haute où la biomasse du mutant $\Delta cirA$ est plus élevée que celle de la souche sauvage, s'expliquant probablement par la variabilité des résultats. En conclusion, tout comme en condition planctonique, la croissance en biofilm sur paraffine et tristéarine de ces trois mutants est identique à celle de la souche sauvage, quelle que soit la concentration en fer. Il semblerait donc que ces trois transporteurs ne soient pas essentiels pour l'acquisition du fer dans les conditions testées au cours de cette étude.

Le fait que ni MARHY3432, CirA ou encore FhuE ne semblent être impliqués dans l'acquisition du fer chez *Mh* JM1 dans les conditions testées est un résultat plutôt surprenant. En effet, en ce qui concerne le récepteur MARHY3432, le fait que le gène codant pour cette protéine soit situé à proximité de l'opéron de biosynthèse de la pétrobactine semblait être un indice de son rôle. Bien entendu, cette proximité chromosomique ne garantit pas son implication dans le transport de la pétrobactine. Chez *B. anthracis*, les gènes de transport et de biosynthèse ne sont pas contigus. Toutefois, d'autres indices laissaient penser que MARHY3432 pouvait potentiellement être le transporteur de ce sidérophore, car entre le gène *MARHY3432* et ceux de biosynthèse de la pétrobactine, les gènes *fepC* et *fepD* sont présents. Les gènes de cette famille sont retrouvés chez *E. coli* et sont impliqués dans l'acquisition du fer via l'entérobactine (Crosa and Walsh, 2002; Ozenberger *et al.*, 1987; Peralta *et al.*, 2016), un sidérophore contenant des groupements catéchol, tout comme la pétrobactine. L'étude des autres mutants $\Delta MARHY0216$, $\Delta MARHY0250$ ou $\Delta MARHY2030$ permettra peut être de démontrer qu'un de ces transporteurs est dédié à la pétrobactine.

Résultats et discussion

L'utilisation d'autres substrats en plus de la paraffine, la tristéarine et l'acétate confirme que c'est sur alcane que les cellules ont le plus besoin de fer. En excluant l'acide palmitique, c'est sur paraffine et eicosane que la croissance de *Mh JM1* est la moins élevée à la plus faible concentration en fer (**Figure V.2** et **V.3**). Cette variabilité du besoin en fer peut s'expliquer par des changements métaboliques selon le substrat. Les résultats de transcriptomique obtenus au cours d'une étude menée par Mounier en 2014 appuient cette hypothèse (Mounier *et al.*, 2014). En effet, bon nombre de gènes impliqués dans la dégradation d'alcane et utilisant le fer comme cofacteur (van Beilen and Funhoff, 2007), tels que *alkB* ou *alkM* par exemple, sont surexprimés lors d'une croissance sur hexadécane (alcane) en comparaison à une croissance sur trioléine (triglycéride). En prenant comme exemple la protéine AlkB, il s'agit d'une monooxygénase contenant deux atomes de fer. Une croissance sur alcool gras (hexadécanol) semble également nécessiter plus de fer que sur tristéarine ou cétyle palmitate. Pour la dégradation de la tristéarine ou du cétyle palmitate (**Figure V.1**), des enzymes, les lipases sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et permettent la dégradation d'esters ou de triglycérides (Jaeger *et al.*, 1994; Arvidson, 2006). L'hydrolyse de la tristéarine (triglycéride) conduit à la formation d'acides gras, et celle du cétyle palmitate (ester) à la formation d'acides gras et d'alcools gras. Ces composés peuvent passer à travers la membrane des cellules et leur dégradation se poursuit dans le milieu intracellulaire (**Figure V.1**). Cette voie de dégradation semble nécessiter moins de fer que la dégradation d'alcane. En conclusion, la croissance de *Mh JM1* sur les différents intermédiaires de la voie de dégradation des alcanes montre une variabilité dans les besoins en fer en fonction de la source de carbone. Les deux premiers intermédiaires, à savoir les alcanes et les alcools gras sont les substrats nécessitant le plus de fer, car leur croissance est la plus faible lorsque le métal est présent à faible concentration. Le fait que la croissance en cétyle palmitate soit encore limitée par le fer à forte concentration (**Figure V.3**) pourrait indiquer que la dégradation de ce substrat requiert également une quantité élevée de fer. Il serait intéressant de répéter ces mesures avec plus de réplicats afin de s'assurer que la biomasse continue d'augmenter entre 1000 et 7200 nmol.L⁻¹ de fer ajouté.

Pour déterminer les raisons pour lesquelles les besoins en fer sont différents en fonction de la source de carbone, il est nécessaire de mieux appréhender par quels mécanismes *Mh JM1* est capable d'acquérir le fer. Il a déjà été discuté dans le chapitre précédent que la pétrobactine et FbpA jouent un rôle important dans l'acquisition du fer. A faible concentration en fer les deux mécanismes sont impliqués. En revanche, à forte concentration, seule la pétrobactine joue un rôle en condition

planctonique, alors qu'en biofilm c'est uniquement FbpA. Néanmoins, comme mentionné dans le chapitre 4, l'obtention du double mutant conditionnel semble confirmer que seuls ces deux mécanismes sont impliqués dans l'acquisition du fer, et qu'ils sont redondants. Afin de mettre en lumière tous les aspects du transport du fer par la pétrobactine, le transporteur TonB-dépendant qui permet aux cellules d'internaliser le complexe sidérophore-fer a été recherché dans cette étude. Comme indiqué dans la **Figure V.11**, le génome de *Mh* JM1 contient six transporteurs de ce type. Six mutants ont ainsi été créés, avec pour chacun la délétion d'un gène codant pour un récepteur TonB-dépendant. Néanmoins, par manque de temps, tous ces mutants n'ont pas pu être testés, et seuls trois d'entre eux ont été étudiés. Comme discuté dans le paragraphe 6, les gènes *cirA*, *fhuE* et *MARHY3432* ont été sélectionnés car ils semblaient être les plus pertinents. Le récepteur CirA est impliqué dans le transport de sidérophores catécholates chez d'autres organismes (Domínguez-Acuña and García-del Portillo, 2022; Klein *et al.*, 2022). A proximité du gène *cirA*, une protéine périplasmique montrant une homologie avec une protéine de *B. subtilis* capable de lier la pétrobactine est retrouvée et la présence d'un gène impliqué dans la liaison et le transport du complexe fer-citrate est présent, renforçant l'hypothèse que CirA puisse être impliqué dans le transport de sidérophores contenant des groupements catéchol. *fhuE*, retrouvé chez *E. coli* K12 et qui est impliqué dans l'acquisition du fer(III) via des composés hydroxamate (Sauer *et al.*, 1990) pourrait également permettre le transport de la pétrobactine. Enfin, *MARHY3432* qui est situé à proximité de l'opéron de biosynthèse de la pétrobactine et des gènes *fepC* et *fepD* est également un bon candidat pour le transport du sidérophore. Malheureusement, le phénotype de tous ces mutants est identique à celui de la souche sauvage. Que le fer soit présent à forte ou à faible concentration, les mutants sont toujours capables de se développer. Il est donc possible que ces transporteurs ne soient pas impliqués dans le transport de la pétrobactine. L'analyse du phénotype des autres mutants des récepteurs pourra potentiellement apporter la réponse. En effet, si un de ces mutants Δ *MARHY0216*, Δ *MARHY0250* ou encore Δ *MARHY2030* a un phénotype différent de celui de la souche sauvage, il sera probable que le gène correspondant soit impliqué dans l'import de la pétrobactine. En revanche, si aucun de ces mutants ne donne les résultats escomptés, il est possible que plusieurs transporteurs puissent internaliser le complexe pétrobactine-fer. Bien que les récepteurs TonB-dépendants soient spécifiques d'un sidérophore ou d'une famille de sidérophores ayant une structure proche (Fujita *et al.*, 2019; Llamas *et al.*, 2006; Nicolas Folschweiller, 2000), il n'est pas impossible que l'import de la pétrobactine puisse être réalisé par deux transporteurs TonB-dépendant. Par exemple chez *B. an-*

thraxis, même s'il s'agit de transporteurs ABC qui sont moins spécifiques, l'import de la pétrobactine du milieu extracellulaire vers le cytoplasme peut être réalisé par trois systèmes indépendants. Il est donc envisageable que la pétrobactine puisse être transportée par plusieurs récepteurs TonB-dépendants. La création de doubles mutants est en cours, et l'étude de leur phénotype permettra probablement de mettre en avant quels récepteurs sont impliqués dans le transport de la pétrobactine.

Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre démontrent la difficulté de travailler sur le fer. Ce métal est un élément essentiel pour la croissance des organismes et ces derniers sont capables de l'acquérir de plusieurs manières. Le fait d'entraver une voie, l'utilisation d'un sidérophore par exemple, ne permet pas d'arrêter totalement la croissance des cellules car il existe d'autres systèmes d'acquisition. Il est par conséquent difficile de décrire dans sa globalité un mécanisme. Dans cette étude, cela se traduit notamment avec l'étude des récepteurs de la pétrobactine où aucun des mutants ne montre de différence de croissance avec la souche sauvage. Cela implique-t-il que ce ne sont pas les transporteurs du sidérophore ? Ou au contraire il s'agit bien des transporteurs de la pétrobactine, mais la surproduction de FbpA restaure la croissance. Il est également envisageable que le sidérophore puisse être récupéré par plusieurs transporteurs.

Le fer étant indispensable à la croissance des organismes, ces derniers sont alors capables de le récupérer même à des concentrations très faibles (de l'ordre du nmol.L^{-1}). De cette façon, il est difficile de pouvoir mesurer si la contamination d'un support ou d'un substrat peut suffire pour promouvoir la croissance des cellules, car ces quantités sont parfois inférieures à celles de la limite de détection des instruments.

Discussion générale et perspectives



La formation de biofilms pour dégrader des composés organiques hydrophobes s'avère être une stratégie efficace (Sivadon *et al.*, 2019). Plusieurs études ont été menées au laboratoire sur *Mh* SP17 à ce sujet. Il a notamment été démontré chez cette souche que pour la dégradation de ces composés, la formation d'un biofilm à l'interface eau-substrat est nécessaire (Klein *et al.*, 2008). *Mh* SP17 étant capable d'utiliser plusieurs substrats, si bien solubles (acétate, lactate, acides aminés) qu'insolubles (hexadécane ou encore lipides), d'autres travaux se sont penchés sur le taux d'expression génique ou protéique selon la source de carbone (Mounier *et al.*, 2014; Vaysse *et al.*, 2009). En sélectionnant les protéines contenant du fer ou celles associées au transport de ce métal, il s'est avéré que leur taux d'expression ou celui de leurs gènes varie de manière importante en fonction de leur substrat et/ou de leur mode de croissance.

1. Importance du fer

1.1. Les besoins en fer sont dépendants de la source de carbone

Pour mesurer l'effet du fer selon le mode de croissance, le milieu de culture EMS utilisé en routine pour la croissance de *Mh* JM1 a été modifié afin de se rapprocher de la composition de l'eau de mer. Ce nouveau milieu, baptisé MEM a alors été utilisé dans toutes les expérimentations de suivi de croissance. Un protocole a été mis en place afin de prévenir les contaminations en fer et d'éviter que les cellules puissent stocker du fer durant les précultures. L'utilisation de résine Chelex-100 a permis de réduire à 20 nmol.L^{-1} la concentration en fer résiduel. Dans la littérature, plusieurs études ayant pour but de promouvoir la production de pétrobactine chez *B. anthracis* ou d'étudier le phénotype d'un mutant ne synthétisant plus ce sidérophore ont utilisé un milieu appelé IDM pour *iron-depleted medium*. La concentration en fer de ce milieu était d'environ 100 nmol.L^{-1} (Cendrowski *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007). Cette concentration étant environ cinq fois plus élevée que celle obtenue dans nos conditions, notre protocole d'élimination du fer résiduel est donc satisfaisant.

La comparaison de la croissance de *Mh* JM1 à différentes concentrations en fer avec plusieurs substrats a confirmé le fait que le mode de vie et/ou la source de carbone implique(nt) des besoins en fer variables. Une croissance planctonique sur acétate nécessite des concentrations en fer plus élevées que les biofilms sur n-hexadécane ou triglycérides. Lorsque les cellules se développent en biofilm, c'est sur alcane (paraffine et eicosane) que la demande en fer est la plus élevée. Cette variabilité sur les besoins en fer peut s'expliquer de plusieurs manières. Tout d'abord d'un point de

vue physiologique, en regardant les résultats d'expression génique (**Figure 1** du chapitre 4), beaucoup de gènes de la respiration aérobie, nécessitant du fer, sont surexprimés en condition acétate par rapport aux conditions hexadécane et trioléine. La dégradation d'alcane requière des enzymes utilisant du fer comme cofacteur, pouvant potentiellement expliquer un besoin plus élevé du métal lorsque la source de carbone est un alcane. Une autre explication possible est que l'efficacité d'acquisition du fer puisse être différente entre une croissance planctonique et biofilm. Au cours de cette étude il a été démontré que dans nos conditions (présence d'oxygène et pH 8), le fer est à environ 80 % sous forme particulaire ($> 0,2 \mu\text{m}$), et il est probable que la majorité des 20 % restants soit sous forme colloïdale. Il est dans ce cas facilement envisageable que le métal sédimente. Par conséquent, les cellules planctoniques qui sont dans la colonne d'eau ne sont sans doute pas en contact direct avec le fer à la différence de celles en biofilm. La proximité avec le fer lors d'une croissance en biofilm peut donc modifier l'efficacité d'acquisition du fer par rapport à un développement sous forme planctonique. Toutefois, cette hypothèse n'explique pas pourquoi une culture sur paraffine nécessite plus de fer que sur tristéarine car dans ces deux conditions, les cellules forment un biofilm.

1.2. Dosage du fer dans les substrats carbonés paraffine et tristéarine

Pour écarter la possibilité que cette variabilité des besoins en fer observée entre la tristéarine et la paraffine soit causée par une contamination de ce métal uniquement de la tristéarine, ces deux substrats ont été dissous puis la concentration en fer a été mesurée par ICP-MS. Cette analyse a indiqué que ces deux composés contiennent environ la même quantité de fer, moins de 10 nmol.L^{-1} . Il a également été vérifié que le métal n'adhérait pas aux substrats, en incubant du milieu riche en fer sur des puits de paraffine et tristéarine. Les résultats ont montré que ce n'était pas le cas car après incubation, la quantité de fer n'augmente qu'au maximum d' 1 nmol.L^{-1} . Même si ces mesures sont approximatives car les facteurs de dilution sont importants et que les valeurs obtenues avoisinent la limite de détection, les quantités de fer détectées sont proches entre les deux substrats. Ces données tendent donc à écarter la piste d'une contamination en fer de la tristéarine.

1.3. Lavage des cellules pour réaliser un dosage du fer intracellulaire

Pour confirmer que des croissances planctoniques sur acétate et en biofilm sur alcane nécessitent plus de fer que dans les autres conditions, la mesure de ce métal contenu dans les cellules pourrait donner une indication sur les besoins en fer des organismes en fonction du substrat. Il a été discuté dans le chapitre 4 que 142 protéines contiennent du fer chez *Mh* JM1, et parmi ces 142, 56 gènes associés à ces protéines sont surexprimés en acétate par rapport à une autre condition (n-hexadécane ou trioléine) et 62 en n-hexadécane. Seuls 20 sont surexprimés en trioléine. Ces données, couplées aux résultats de croissance sur différentes sources de carbone indiquent, comme mentionné précédemment, que les cultures sur acétate et alcane nécessitent plus de fer que sur les autres substrats. Par conséquent, il est fortement probable que ce soit dans ces conditions que la quantité de fer intracellulaire soit la plus importante. Il est nécessaire de noter que le dosage du fer intracellulaire reste discutable car il est tout à fait possible que les cellules stockent du fer durant la croissance, mais il s'agirait là d'une indication supplémentaire, qui confirmerait que les besoins sont plus élevés en acétate et alcane si les résultats sont concordants. Néanmoins, comme il en a été discuté dans le chapitre 5, la principale difficulté dans le dosage du fer intracellulaire réside dans le fait que le fer adhère à la surface des cellules. Il est donc essentiel de trouver un protocole efficace pour l'éliminer et ainsi obtenir une valeur précise du fer contenu dans les organismes. Un problème majeur lors du lavage des cellules est qu'une partie du culot se détache et se retrouve dans le surnageant. Cela a pour effet de biaiser les résultats en apportant une source de fer, et faussant également la quantité mesurée du fer intracellulaire en la sous-estimant. Le fait d'augmenter le volume des cultures, en passant de 10 à 50 mL pourrait probablement éviter cette resuspension du culot. En effet, ce dernier serait alors plus stable car plus gros, et même si une petite partie se retrouve dans le surnageant, elle pourra être négligée en raison du volume plus important.

2. Outils génétiques développés chez *Mh* JM1

Les outils déjà existant permettant de modifier génétiquement *Mh* JM1 ont été améliorés durant cette étude afin de faciliter l'obtention de mutants. Tout d'abord, un nouveau plasmide, le pSN77 a été mis en place. Sa taille a été réduite, 2566 pb contre 6405 pb pour l'ancien vecteur, le pKOMKm. Cette diminution du nombre de paires de bases permet d'améliorer l'efficacité de transfert. De plus, afin d'accélérer la construction des plasmides, les techniques de restriction enzymatique et ligation ont été remplacées au profit d'un assemblage du plasmide par Gibson

Assembly ou POE-PCR. Enfin, la création du plasmide pSN75 a permis d'obtenir le premier système d'induction chez *Mh* JM1. Le promoteur P_{BAD}, inductible à l'arabinose a été introduit dans un plasmide ayant comme origine de répllication pBBR1 ori V, qui est compatible avec *Mh* JM1.

3. Mécanismes d'acquisition du fer chez *Mh* JM1

3.1. Importance de la pétrobactine

Dans le but de comparer les mécanismes d'acquisition du fer entre les modes de vie, la présence de pétrobactine a été recherchée dans le milieu de culture, à différentes concentrations en fer et en utilisant des sources de carbone solubles, l'acétate, ou insolubles, la paraffine (alcane) et la tristéarine (triglycéride). Les résultats ont montré que la pétrobactine est retrouvée dans chaque condition mais qu'elle est présente en plus grande quantité à faible concentration en fer. A forte concentration en fer, la production du sidérophore est peu élevée, entre 10 et 30 fois moins, selon le substrat, qu'à faible concentration en fer. La production de pétrobactine serait donc régulée en fonction de la concentration en fer dans le milieu. Ce résultat est courant dans la littérature (Lee *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2009). Il est possible que la régulation de la production de sidérophore soit sous le contrôle de Fur. A forte concentration en fer dans le milieu, la concentration intracellulaire de ce métal augmente et ce dernier se fixe alors sur la protéine régulatrice Fur, qui bloque la transcription des gènes qu'elle contrôle. La régulation par Fur implique la présence, en amont des gènes régulés, de sites canoniques appelés « boîte Fur ». Bien que le gène codant pour la protéine Fur soit présent chez *Mh* JM1, *MARHY3208*, dont la séquence protéique associée montre environ 70 % d'homologie avec la protéine Fur de *P. aeruginosa*, aucune boîte Fur identique à celle décrite par Escolar en 1999 (Escolar *et al.*, 1999) n'a été détectée. La présence d'un tel site a pourtant été rapportée chez *Mh* VT8 en amont des gènes de biosynthèse de la pétrobactine (Amin *et al.*, 2012). Pour vérifier si la production de pétrobactine de *Mh* JM1 est elle-aussi régulée par ce mécanisme, nous avons essayé de construire un mutant délété du gène *fur*. Malheureusement ce mutant n'a pas pu être obtenu, suggérant que la délétion de ce gène serait létale. En effet, cette protéine est impliquée dans l'homéostasie métallique et contrôle le métabolisme du fer. De cette manière, des processus cellulaires tels que la respiration, la synthèse d'acides nucléiques, l'acquisition et le stockage du fer sont régulés par Fur (Fillat, 2014). L'essentialité de Fur chez *Mh* JM1 pourrait expliquer pourquoi l'obtention d'un mutant n'a pas été possible. Néanmoins, des mutants *fur* ont pu être obtenus chez de nombreuses espèces bactériennes.

3.2. Détails de la production de pétrobactine chez *Mh JM1* et comparaison avec *B. anthracis*

La condition où le plus de sidérophore est produit est lorsque les cellules se développent sur acétate, après 120h de croissance, avec $4,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de pétrobactine mesurée. En paraffine et tristéarine, la production est d'environ 4 et $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sidérophore détecté, respectivement. Cette production de pétrobactine est faible lorsqu'on la compare avec une étude menée sur *B. anthracis* (Wilson *et al.*, 2009). En effet, les auteurs ont indiqué que chez *B. anthracis*, dans des conditions optimales de croissance, à 37°C et à partir d'une incubation de cellules végétatives dans du milieu pauvre en fer, la quantité de pétrobactine produite a atteint une concentration de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Dans d'autres conditions, après 10h de croissance à partir de spores, la quantité de pétrobactine mesurée dans le milieu de culture est de plus de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en milieu pauvre en fer. Même en milieu riche en fer, toujours à partir d'une culture de spores, *B. anthracis* produit plus de pétrobactine que *Mh JM1*, avec environ $9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, contre moins de $0,20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivement.

Les quantités de fer dans les milieux utilisés pour la croissance de *B. anthracis* et de *Mh JM1* sont respectivement de 36 et $7,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en condition de forte concentration en fer et de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pour les deux milieux en condition de faible concentration. La quantité de fer identique dans la condition où le milieu est déplété en fer souligne que *Mh JM1* produit moins de sidérophore que *B. anthracis*. Ce constat est d'autant plus marquant à forte concentration en fer. En effet, la production de pétrobactine de *Mh JM1* est à un niveau basal dans ce cas, avec une production inférieure à $0,20 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Une concentration aussi faible mesurée pourrait s'expliquer par le fait que la pétrobactine ne serait pas nécessaire à la croissance de *Mh JM1*. Une étude menée par Wilson en 2009, décrivant des résultats de quantification de sidérophores (pétrobactine et bacillibactine) chez *B. anthracis*, a montré qu'à partir de spores, la pétrobactine est détectée après 5h30 de croissance à 3 et $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à faible et forte concentration en fer dans le milieu, respectivement. Les cellules produisent environ $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de pétrobactine en milieu pauvre en fer et $9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en milieu riche après 10h de croissance (Wilson *et al.*, 2009). La pétrobactine est donc produite dans toutes les conditions, alors qu'à l'inverse, la bacillibactine, autre sidérophore produit par *B. anthracis* n'est détectée qu'après 10h de croissance et uniquement en milieu pauvre en fer, à une concentration d'environ $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Une autre étude, menée par Lee en 2011 s'est également intéressée à mesurer la quantité de pétrobactine et de bacillibactine produites dans plusieurs conditions et a indiqué que la pétrobactine est produite en quantités élevées à faible concentration en fer (plus de $180 \mu\text{mol.L}^{-1}$), et en quantités plus basses lorsque la concentration en fer est augmentée ($24 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de pétrobactine détectée à 20

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fer) (Lee *et al.*, 2011). La quantité de bacillibactine mesurée dans les mêmes conditions est quant à elle, bien plus basse avec $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en faible concentration en fer et proche de $0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ à forte concentration en fer. Le fait que la pétrobactine soit produite après 5h30 de croissance à partir de spores et que sa concentration soit bien plus élevée que la bacillibactine montre qu'elle joue un rôle essentiel dans l'acquisition du fer pour *B. anthracis* dans les premiers stades de développement lors de l'infection, alors que la bacillibactine intervient dans des stades plus tardifs, lorsque les températures ou la quantité de CO_2 varient, comme cela a déjà été décrit (Hotta *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2009). Ces résultats indiquent que la pétrobactine, indispensable pour le développement de *B. anthracis*, est produite dans de fortes concentrations. De plus, à partir d'une culture de spores, un mutant ne produisant plus de pétrobactine est incapable de se développer dans un milieu pauvre en fer si celui-ci n'a pas été supplémenté de pétrobactine ou d'une autre source utilisable de fer (Lee *et al.*, 2007). En revanche, la bacillibactine, qui n'intervient que plus tard n'est pas ou très peu produite par les organismes, car non nécessaire. En comparant avec *Mh* JM1, la quantité de pétrobactine produite est bien plus faible, suggérant que l'utilisation de ce sidérophore n'est pas l'unique moyen d'acquérir le fer. De plus, les quantités basales produites par les cellules à forte concentration en fer, pourraient indiquer que dans ces conditions, la pétrobactine n'est pas nécessaire à l'acquisition du fer. Cette interprétation est tout de même discutable car en condition planctonique, la croissance du mutant ne produisant plus la pétrobactine est tout de même significativement plus faible que la souche sauvage, indiquant que la pétrobactine serait importante pour la croissance même à faible concentration.

3.3. Importance de la pétrobactine en fonction de la source de carbone

Pour mieux comprendre le rôle de la pétrobactine dans l'acquisition du fer, un mutant ne produisant plus ce sidérophore, ΔasbABF , a été créé et son phénotype étudié. Les résultats sont concordants avec ceux du dosage de la pétrobactine. En effet, tant sous forme planctonique que biofilm, la croissance du mutant est plus faible que celle de la souche sauvage dans les conditions de faible concentration en fer. A forte concentration, le développement du mutant est inférieur à celui de la souche sauvage uniquement en condition acétate. Toutefois, même si la croissance du mutant est plus faible, il est tout de même capable de se développer, indiquant que la pétrobactine n'est pas essentielle dans ces conditions. Ce constat, couplé au fait qu'à forte concentration en fer la pétrobactine ne soit produite qu'à un niveau basal nous a tout d'abord surpris. En effet, comme il l'a été mentionné précédemment, dans nos conditions de culture, le fer est sous forme Fe^{3+}

particulaire ou colloïdal majoritairement. Par conséquent, il ne peut pas être assimilé par les cellules à l'aide d'un transport facilité comme c'est le cas pour Fe^{2+} (Lau *et al.*, 2016). Chez *B. anthracis*, il a aussi été décrit qu'un mutant ne produisant plus la pétrobactine est toujours capable de se développer dans un milieu pauvre en fer (Jr *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007). *B. anthracis* produit un autre sidérophore, la bacillibactine, il est donc probable que l'utilisation de cette dernière permette de compenser la perte de pétrobactine pour acquérir le fer. *Mh* JM1 ne produisant que la pétrobactine, un mécanisme indépendant de l'utilisation de sidérophore serait impliqué.

3.4. Un mécanisme d'acquisition du fer indépendant de l'utilisation de sidérophore

Le transport d'espèces inorganiques du fer à travers la membrane via des porines ou des transporteurs TonB-dépendants a été décrit chez des cyanobactéries (Sutak *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2016). Une fois que le fer est entré dans le périplasma, il est pris en charge par une protéine périplasmique qui le délivre à un transporteur ABC afin qu'il puisse traverser la membrane interne. Pour *Mh* JM1, si le fer est capable d'atteindre le périplasma, par un transport identique à celui de certaines cyanobactéries ou par un autre procédé inconnu, il est fortement probable qu'une protéine périplasmique puisse être nécessaire pour que ce métal atteigne le cytoplasme. Ces protéines sont également associées à des perméases et des ATP-ases, qui permettent alors le transport du fer vers le cytoplasme. Une protéine périplasmique, FbpA, appartenant à la famille des SBP (*Substrate Binding Protein*) des transporteurs ABC fixant les ions Fe^{3+} a été décrite chez *M. algicola* (Weerasinghe *et al.*, 2013). Le gène *fbpA* est retrouvé chez *Mh* JM1, et un mutant délété de ce gène a été construit afin d'étudier sa potentielle implication dans l'acquisition du fer. Les tests de croissance de ce mutant ont confirmé l'implication de FbpA. En effet, tout comme pour le mutant ne produisant plus la pétrobactine, en condition de faible concentration en fer, le mutant $\Delta fbpA$ présente une croissance plus faible que la souche sauvage, tant sur acétate que sur paraffine ou tristéarine. En revanche, à forte concentration en fer, la croissance de ce mutant est identique à celle de la souche sauvage lorsque les cellules se développent sous forme planctonique. A l'inverse, en biofilm la croissance de $\Delta fbpA$ est plus faible que celle de la souche sauvage. Tout comme pour le mutant pétrobactine, même à faible concentration en fer et bien que la croissance soit plus faible, ce mutant est capable de se développer dans toutes les conditions, indiquant que la production de FbpA n'est pas essentielle à *Mh* JM1. Ces deux systèmes d'acquisition du fer sont donc redondants. Bien que tous deux soient importants à faible concentration en fer, aucun n'est indispensable. L'intérêt pour les cellules est probablement que chaque mécanisme puisse être plus efficace dans une

condition que dans une autre. En prenant l'exemple de *B. anthracis* qui produit deux sidérophores, il a été proposé que la pétrobactine puisse être impliquée dans les premiers stades d'infection et la bacillibactine dans les stades plus avancés, lorsque la température ou que la concentration en CO₂ varie (Hotta *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2009). Pour *Mh* JM1, en regardant les phénotypes des mutants $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ à forte concentration en fer, il apparaît que le sidérophore est important dans ces conditions uniquement en croissance planctonique alors que FbpA l'est en croissance en biofilm. Une hypothèse possible est que lors d'un développement en biofilm, il y ait un contact direct entre les cellules et le fer. Si les cellules sont capables d'assimiler ce dernier directement, tout comme le phytoplancton par des porines ou des transporteurs TonB-dépendants (Sutak *et al.*, 2020), FbpA est ensuite nécessaire pour délivrer le fer jusqu'à un transporteur ABC pour que le métal puisse atteindre le cytoplasme. Dans ces conditions, la production de pétrobactine est alors moins importante pour l'acquisition du fer. A l'inverse, lors d'une croissance planctonique, nous supposons que le fer se retrouve au fond du puits et que sa concentration dans la colonne d'eau, là où se trouvent les cellules, soit très faible. Il n'y a alors que très peu, voire pas de contact entre les organismes et le fer. L'utilisation du sidérophore deviendrait nécessaire pour que les cellules puissent tout de même acquérir le fer. En revanche, lorsque le fer est présent à faible concentration, il est possible que les deux mécanismes soient utilisés afin de maximiser son obtention. En milieu naturel, le fait que *Mh* JM1 possède ces deux mécanismes peut être un avantage non négligeable pour sa croissance. Si une voie d'acquisition du fer est plus adaptée qu'une autre dans une condition donnée, elle permettra aux cellules d'être plus compétitives dans l'accès au fer avec les autres organismes présents et donc de pouvoir se développer.

3.5. La pétrobactine et FbpA semblent être les deux seuls mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer

L'analyse du double mutant ne synthétisant plus la pétrobactine et ne produisant plus FbpA a mis en avant que l'absence de ces deux mécanismes semble être létal pour la cellule. En effet, malgré de nombreuses tentatives, l'obtention de ce double mutant n'a pas pu être possible. Pour remédier à cela, un double mutant conditionnel a été créé. La croissance non induite du double mutant $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ est très affectée en comparaison de celle de la souche sauvage, tant sur boîte qu'en liquide, soulignant que l'absence de ces deux mécanismes réduit fortement le développement des cellules. Ces résultats impliquent donc que la pétrobactine et FbpA sont deux systèmes redondants et indépendants. Par conséquent, si l'un est manquant c'est l'autre qui prend

le relais. L'étude détaillée du phénotype de ce mutant permettra très rapidement de confirmer ou d'infirmer ces résultats. En principe, s'il n'est plus capable d'acquérir le fer, sa croissance devrait être nulle tant à faible qu'à forte concentration de ce métal. Néanmoins, le fer étant absolument essentiel pour les organismes, il n'est pas impossible que les cellules puissent l'acquérir par d'autres moyens ou qu'elles réduisent de manière conséquente leurs besoins et que donc le double mutant soit tout de même capable de se développer.

3.6. Systèmes de transport de la pétrobactine

Le transport de la pétrobactine a également été étudié au cours de ce travail. Plusieurs mutants de récepteurs supposés du complexe sidérophore-fer ont été créés. Malheureusement l'observation de leur phénotype sur plusieurs substrats et à différentes concentrations en fer n'a pas permis de mettre en avant lesquels étaient impliqués dans l'acquisition du fer. Trois d'entre eux n'ont pas encore été étudiés et le seront très prochainement. Si ces futures analyses ne mettent pas en lumière l'import du complexe sidérophore-fer, cela impliquerait que la pétrobactine puisse être transportée vers le cytoplasme par plusieurs transporteurs. Par conséquent, des mutants ne produisant plus plusieurs récepteurs vont être créés et là encore, leur phénotype étudié.

3.7. Hypothèses sur le rôle de la pétrobactine sulfonée

Une autre interrogation soulevée dans ce travail concerne la sulfonation de la pétrobactine. Les dosages des différentes formes du sidérophore ont montré que la sulfonation n'est produite en quantités élevées que lors d'une croissance planctonique. Le fait que l'ajout d'un groupement sulfonate soit régulé en fonction du mode de croissance tend à indiquer qu'il s'agisse d'un phénomène physiologique et non pas d'une réaction chimique spontanée fortuite. Pour essayer de comprendre le rôle de la sulfonation, des expérimentations d'imagerie moléculaire du biofilm ont été menées au laboratoire de chimie analytique de Liège en Belgique, pour dans un premier temps comparer la diffusion des deux formes de pétrobactine. Malheureusement les conditions de culture sur place n'ont pas permis de détecter les sidérophores *in vivo*. Pour pallier ce problème, des échantillons vont être réalisés très prochainement dans des conditions optimales au laboratoire de Pau avant d'être analysés à Liège. La comparaison de la diffusion entre la pétrobactine et sa forme sulfonée pourrait être un premier pas dans la compréhension de son rôle. Encore non démontré, il a été proposé dans la littérature que la sulfonation influencerait la solubilité du sidérophore, en

l'augmentant (Homann *et al.*, 2009). Nous supposons donc que la forme sulfonée de la pétrobactine soit celle qui soit retrouvée le plus loin du biofilm, car étant plus soluble, elle diffuse plus loin dans le milieu de culture. Une hypothèse possible est que cette sulfonation permettrait alors aux cellules que leur sidérophore diffuse plus loin, augmentant la probabilité de rencontrer du fer. En revanche, lorsque les cellules sont en biofilm, l'absence de sulfonation limite la diffusion du sidérophore, l'empêchant ainsi de se retrouver trop loin du biofilm et réduisant le risque qu'il ne soit jamais récupéré par les organismes.

Il a également été proposé que le rôle de la sulfonation soit de stabiliser le groupe catéchol contre l'oxydation. (Homann *et al.*, 2009). La forme non sulfonée est donc plus sensible à l'oxydation, elle pourrait alors être plus efficace dans la protection de la cellule contre le stress oxydant. Des croissances planctoniques pauvres en oxygène ont eu pour conséquence d'augmenter la production de pétrobactine sulfonée (I. Caceres communication personnelle). Par conséquent, il est possible que la quantité d'oxygène présent dans le milieu de culture puisse influencer la production de pétrobactine sulfonée. Cette forme serait alors la majoritaire en absence d'oxygène. La pétrobactine étant un sidérophore photooxydable, la sulfonation pourrait donc être un moyen d'éviter cette oxydation via les rayons lumineux en milieu naturel. Une autre explication envisageable est que le fait d'ajouter un groupement sulfonate sur la pétrobactine permettrait d'éviter que le sidérophore soit utilisé par d'autres espèces.

3.8. Le rôle de la pétrobactine se limite-t-il à l'acquisition du fer ?

D'autres pistes sont également envisagées concernant l'utilité de la pétrobactine, comme un rôle dans la protection contre le stress oxydatif. En effet, il a été décrit dans la littérature qu'en plus de leur rôle de chélateurs de fer, les sidérophores à groupes catéchol protègent la cellule contre le stress oxydant (Eisendle *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2018). Des premières expérimentations ont été réalisées pour étudier si la pétrobactine joue également un rôle dans la protection contre le stress oxydant. Un mutant *asbF* ne produisant plus le 3-4 dihydroxybenzoate qui est le précurseur des groupements catéchol de la pétrobactine, a montré une plus grande sensibilité à l'eau oxygénée que la souche sauvage (I. Caceres communication personnelle). Ces résultats suggèrent donc que la pétrobactine jouerait un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydant. Il est encore nécessaire d'effectuer de nouveaux tests afin de confirmer ces observations. En parallèle, il serait intéressant d'aller plus loin en réalisant des suivis de croissance en présence d'eau oxygénée avec

des ajouts de pétrobactine ou de pétrobactine sulfonée, qui pourraient confirmer si le sidérophore protège la cellule contre le stress oxydant mais également de vérifier si une des deux formes est plus adaptée pour cette fonction que l'autre. Nous supposons que la pétrobactine sulfonée est moins efficace car la sulfonation stabilise le groupement catéchol contre l'oxydation, limitant donc la réaction entre le sidérophore et les ROS, faisant d'elle un mauvais anti-oxydant (Homann *et al.*, 2009).

4. Conclusions

Ce travail de recherche a mis en avant que les besoins en fer de *Mh* JM1, organisme modèle du laboratoire, varient en fonction du mode de vie, et de la source de carbone. Deux systèmes majeurs d'acquisition du fer sont impliqués, la production de la pétrobactine et de FbpA, une protéine périplasmique. L'importance de ces deux systèmes est elle aussi dépendante du mode de croissance. Cette étude a donc permis de mieux cerner les besoins en fer de *Mh* JM1 et d'apporter les premiers éléments de réponse concernant le transport de ce métal. Néanmoins, de très nombreux aspects restent encore à éclaircir. Il est notamment nécessaire de confirmer si ces deux voies d'acquisition du fer sont les seules existantes avec une étude plus approfondie du phénotype du double mutant.

Le rôle de la pétrobactine pose également question. Se limite-t-elle uniquement à l'acquisition du fer ? En effet, le fait que le complexe pétrobactine-fer n'est détecté qu'à des quantités très faibles dans le milieu de culture par rapport au sidérophore seul implique-t-il nécessairement qu'il soit immédiatement récupéré par les cellules, ou cela pourrait-il signifier que la pétrobactine joue un autre rôle, comme protéger les cellules contre le stress oxydant ? Le rôle de la forme sulfonée n'a pas encore été expliqué, et la possibilité qu'il s'agisse d'un phénomène biologique a été suggéré mais pas encore démontré. Il pourrait en effet s'agir d'une réaction chimique. *B. anthracis* ne produit pas de formes sulfonées de la pétrobactine et son milieu de culture contient peu de sulfates alors que le milieu MEM utilisé pour *Mh* JM1 a une concentration en sulfates de 26 mmol.L⁻¹. La forte concentration en sulfates du MEM favoriserait-elle la sulfonation de la pétrobactine ? Les résultats d'imagerie moléculaire réalisées en collaboration avec l'université de Liège permettront peut être de comparer la diffusion entre les différentes formes de pétrobactine et d'apporter un premier élément de réponse. En plus de cet objectif, l'imagerie de ces sidérophores dans le biofilm pourrait également permettre d'apporter de nouvelles connaissances.

En effet, la production de sidérophores au sein de biofilms n'a encore jamais été décrite dans la littérature. Par conséquent, de nombreuses interrogations subsistent, les sidérophores sont-ils produits par toutes les cellules du biofilm ou la répartition géographique des organismes influence-t-elle sur la production de ces molécules ? Les sidérophores sont-ils majoritairement exportés hors du biofilm dans la phase aqueuse, ou sont-ils aussi sécrétés au niveau du substrat ?

Comme déjà mentionné dans ce paragraphe, l'import de la pétrobactine, même s'il n'a pas encore pu être identifié, a été activement recherché et des mutants ont été créés. En revanche, l'export du sidérophore chez *Mh* n'a jamais été étudié. S'agit-il d'un exporteur de type RND comme pour *B. anthracis*, qui partage une homologie de séquence avec un transporteur RND chez *Mh* VT8 (Hagan *et al.*, 2017), qui a également été relevée chez *Mh* JM1 ? La délétion de ce gène pourrait nous renseigner sur le système d'export de la pétrobactine chez *Mh* JM1. S'il s'agit bien de ce transporteur et qu'il est le seul à assurer la sécrétion de la pétrobactine, le phénotype attendu de ce mutant est supposé ressembler à celui du mutant $\Delta asbABF$. Le dosage de la pétrobactine dans les milieux intra- et extra-cellulaires serait également intéressant pour confirmer le phénotype d'un tel mutant.

Finalement, ce travail a permis de poser les bases de l'étude de l'acquisition du fer chez *Mh* JM1 avec la création d'un nouveau milieu de culture plus proche des conditions environnementales et l'élaboration de protocoles adaptés réduisant fortement la concentration en fer dans le milieu. L'importance de la pétrobactine et de FbpA a été démontrée, néanmoins d'autres aspects sont encore à élucider, notamment la mise en lumière des transporteurs de la pétrobactine, tant pour l'import que pour l'export de ce sidérophore. Des expérimentations sont d'ores et déjà prévues avec des pistes envisagées quant aux gènes qui pourraient être impliqués et certains mutants déjà construits.

Références bibliographiques



- Abergel, R.J., Zawadzka, A.M., Raymond, K.N., 2008. Petrobactin-Mediated Iron Transport in Pathogenic Bacteria: Coordination Chemistry of an Unusual 3,4-Catecholate/Citrate Siderophore. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2124–2125. <https://doi.org/10.1021/ja077202g>
- Ahmed, E., Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7, 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Alexander, D.B., Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fert Soils* 12, 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Ali, M.B., Saidur, R., Hossain, M.S., 2011. A review on emission analysis in cement industries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 2252–2261. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.014>
- Amin, S.A., Green, D.H., Al Waheeb, D., Gärdes, A., Carrano, C.J., 2012a. Iron transport in the genus *Marinobacter*. *Biometals* 25, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9491-9>
- Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Küpper, F.C., Sunda, W.G., Carrano, C.J., 2009. Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 17071–17076. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905512106>
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M., 2008a. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 13, 1205–1218. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5>
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 215–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Arosio, P., Elia, L., Poli, M., 2017. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* 69, 414–422. <https://doi.org/10.1002/iub.1621>
- Arvidson, S., 2006. Extracellular Enzymes, in: *Gram-Positive Pathogens*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 478–485. <https://doi.org/10.1128/9781555816513.ch39>
- Aumont, O., Bopp, L., 2006. Globalizing results from ocean in situ iron fertilization studies. *Global Biogeochemical Cycles* 20. <https://doi.org/10.1029/2005GB002591>
- Austin, R.N., Groves, J.T., 2011a. Alkane-oxidizing metalloenzymes in the carbon cycle. *Metalomics* 3, 775–787. <https://doi.org/10.1039/c1mt00048a>
- Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Baars, O., Morel, F.M.M., Zhang, X., 2018. The purple non-sulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris* produces novel petrobactin-related siderophores under aerobic and anaerobic conditions. *Environmental Microbiology* 20, 1667–1676. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14078>

- Bagg, A., Neilands, J.B., 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, 5471–5477. <https://doi.org/10.1021/bi00391a039>
- Baichoo, N., Helmann, J.D., 2002. Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J Bacteriol* 184, 5826–5832. <https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5826-5832.2002>
- Baig, B.H., Wachsmuth, I.K., Morris, G.K., 1986. Utilization of exogenous siderophores by *Campylobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 431–433. <https://doi.org/10.1128/JCM.23.3.431-433.1986>
- Barbeau, K., Rue, E., Bruland, K., Butler, A., 2001. Photochemical Cycling of Iron in the Surface Ocean Mediated by Microbial Iron(III)-Binding Ligands. *Nature* 413, 409–13. <https://doi.org/10.1038/35096545>
- Barbeau, K., Rue, E.L., Trick, C.G., Bruland, K.W., Butler, A., 2003. Photochemical reactivity of siderophores produced by marine heterotrophic bacteria and cyanobacteria based on characteristic Fe(III) binding groups. *Limnology and Oceanography* 48, 1069–1078. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.3.1069>
- Barbeau, K., Zhang, G., Live, D.H., Butler, A., 2002a. Petrobactin, a Photoreactive Siderophore Produced by the Oil-Degrading Marine Bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 378–379. <https://doi.org/10.1021/ja0119088>
- Barker, R.A., Tisnado, J., Lambert, L.A., Gärdes, A., Carrano, M.W., Carrano, P.N., Gillian, C., Carrano, C.J., 2015. Molecular characterization of a homolog of the ferric-uptake regulator, Fur, from the marine bacterium *Marinobacter algicola* DG893. *Biometals* 28, 197–206. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9815-7>
- Beasley, F.C., Marolda, C.L., Cheung, J., Buac, S., Heinrichs, D.E., 2011. *Staphylococcus aureus* Transporters Hts, Sir, and Sst Capture Iron Liberated from Human Transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and Catecholamine Stress Hormones, Respectively, and Contribute to Virulence. *Infect Immun* 79, 2345–2355. <https://doi.org/10.1128/IAI.00117-11>
- Behnsen, J., Zhi, H., Aron, A.T., Subramanian, V., Santus, W., Lee, M.H., Gerner, R.R., Petras, D., Liu, J.Z., Green, K.D., Price, S.L., Camacho, J., Hillman, H., Tjokrosurjo, J., Montaldo, N.P., Hoover, E.M., Treacy-Abarca, S., Gilston, B.A., Skaar, E.P., Chazin, W.J., Garneau-Tsodikova, S., Lawrenz, M.B., Perry, R.D., Nuccio, S.-P., Dorrestein, P.C., Raffatellu, M., 2021. Siderophore-mediated zinc acquisition enhances enterobacterial colonization of the inflamed gut. *Nat Commun* 12, 7016. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27297-2>
- Beinert, H., Holm, R.H., Münck, E., 1997. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* 277, 653–659. <https://doi.org/10.1126/science.277.5326.653>
- Bianchi, M., Feliatra, F., Tréguer, P., Vincendeau, M.-A., Morvan, J., 1997. Nitrification rates, ammonium and nitrate distribution in upper layers of the water column and in sediments of the Indian sector of the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*,

Antares I: France JGOFS in the Indian Sector of the Southern Ocean; Benthic and Water Column Processes 44, 1017–1032. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(96\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(96)00109-9)

Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G.J., Nies, D.H., Grass, G., 2005. TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 6701–6707. <https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6701-6707.2005>

Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, M.H., Weber, T., 2021a. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 49, W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>

Bonin, P., Vieira, C., Grimaud, R., Militon, C., Cuny, P., Lima, O., Guasco, S., Brussaard, C.P.D., Michotey, V., 2015. Substrates specialization in lipid compounds and hydrocarbons of *Marinobacter* genus. *Environ Sci Pollut Res* 22, 15347–15359. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4009-y>

Bopp, L., Bowler, C., Guidi, L., Karsenti, E., De Vargas, C., 2019. L’océan, pompe à carbone. *Plateforme Océan & Climat* 23–28.

Boukhalfa, H., Crumbliss, A.L., n.d. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport 15.

Boyd, P.W., Ellwood, M.J., 2010. The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nature Geosci* 3, 675–682. <https://doi.org/10.1038/ngeo964>

Boyd, P.W., Jickells, T., Law, C.S., Blain, S., Boyle, E.A., Buesseler, K.O., Coale, K.H., Cullen, J.J., de Baar, H.J.W., Follows, M., Harvey, M., Lancelot, C., Levasseur, M., Owens, N.P.J., Pollard, R., Rivkin, R.B., Sarmiento, J., Schoemann, V., Smetacek, V., Takeda, S., Tsuda, A., Turner, S., Watson, A.J., 2007. Mesoscale Iron Enrichment Experiments 1993-2005: Synthesis and Future Directions. *Science* 315, 612–617. <https://doi.org/10.1126/science.1131669>

Boyd, P.W., Law, C.S., Hutchins, D.A., Abraham, E.R., Croot, P.L., Ellwood, M., Frew, R.D., Hadfield, M., Hall, J., Handy, S., Hare, C.E., Higgins, J., Hill, P., Hunter, K.A., Leblanc, K., Maldonado, M.T., McKay, R.M., Mioni, C., Oliver, M., Pickmere, S., Pinkerton, M., Safi, K., Sander, S., Sanudo-Wilhelmy, S.A., Smith, M., Strzepek, R., Tovar-Sanchez, A., Wilhem, S.W., 2005. Fe-Cycle: Attempting an iron biogeochemical budget from a mesoscale SF₆ tracer experiment in unperturbed low iron waters. *Global Biogeochemical Cycles* 19, 13 pp. <https://doi.org/10.1029/2005GB002494>

Boye, M., Aldrich, A., van den Berg, C.M.G., de Jong, J.T.M., Nirmaier, H., Veldhuis, M., Timmermans, K.R., de Baar, H.J.W., 2006. The chemical speciation of iron in the north-east Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 53, 667–683. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2005.12.015>

Boye, M., Aldrich, A.P., van den Berg, C.M.G., de Jong, J.T.M., Veldhuis, M., de Baar, H.J.W., 2003. Horizontal gradient of the chemical speciation of iron in surface waters of the northeast Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 80, 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(02\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(02)00102-0)

Boye, M., van den Berg, C.M.G., de Jong, J.T.M., Leach, H., Croot, P., de Baar, H.J.W., 2001. Organic complexation of iron in the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 48, 1477–1497. [https://doi.org/10.1016/S0967-0637\(00\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0967-0637(00)00099-6)

- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., Schalk, I.J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine–iron uptake pathway. *Environmental Microbiology* 11, 1079–1091. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x>
- Buchan, A., LeClerc, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology* 12, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>
- Buck, K.N., Bruland, K.W., 2007. The physicochemical speciation of dissolved iron in the Bering Sea, Alaska. *Limnology and Oceanography* 52, 1800–1808. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.1800>
- Buck, K.N., Sedwick, P.N., Sohst, B., Carlson, C.A., 2018. Organic complexation of iron in the eastern tropical South Pacific: Results from US GEOTRACES Eastern Pacific Zonal Transect (GEOTRACES cruise GP16). *Marine Chemistry, The U.S. GEOTRACES Eastern Tropical Pacific Transect (GP16)* 201, 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2017.11.007>
- BUFFLE, J., 1977. Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux.
- Bundy, R.M., Boiteau, R.M., McLean, C., Turk-Kubo, K.A., McIlvin, M.R., Saito, M.A., Van Mooy, B.A.S., Repeta, D.J., 2018. Distinct Siderophores Contribute to Iron Cycling in the Mesopelagic at Station ALOHA. *Frontiers in Marine Science* 5.
- Butler, A., 2005. Marine Siderophores and Microbial Iron Mobilization. *Biometals* 18, 369–374. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3711-0>
- Butler, A., Harder, T., Ostrowski, A.D., Carrano, C.J., 2021. Photoactive siderophores: Structure, function and biology. *Journal of Inorganic Biochemistry* 221, 111457. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111457>
- Butler, A., Theisen, R.M., 2010. Iron(III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coordination Chemistry Reviews, Inorganic Reaction Mechanisms* 254, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.010>
- Canette, A., Branchu, P., Grimaud, R., Naïtali, M., 2016. Imaging Bacterial Cells and Biofilms Adhering to Hydrophobic Organic Compound–Water Interfaces, in: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Ultrastructure and Imaging*, Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 71–83. https://doi.org/10.1007/8623_2015_80
- Cao, J., Woodhall, M.R., Alvarez, J., Cartron, M.L., Andrews, S.C., 2007. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 65, 857–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05802.x>
- Carmichael, J.R., Zhou, H., Butler, A., 2019. A suite of asymmetric citrate siderophores isolated from a marine *Shewanella* species. *Journal of Inorganic Biochemistry* 198, 110736. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110736>

- Carroll, C.S., Moore, M.M., 2018. Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 53, 356–381. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1476449>
- Cendrowski, S., MacArthur, W., Hanna, P., 2004. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Molecular Microbiology* 51, 407–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03861.x>
- CHAGNOT, C., ZORGANI, M.A., ASTRUC, T., Desvaux, M., 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Challis, G.L., 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* 6, 601–611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>
- Chen, J., Guo, Y., Lu, Y., Wang, B., Sun, J., Zhang, H., Wang, H., 2019. Chemistry and Biology of Siderophores from Marine Microbes. *Mar Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/md17100562>
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 2172–2175. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172>
- Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., Ferioli, L., Sakamoto, C., Rogers, P., Millero, F., Steinberg, P., Nightingale, P., Cooper, D., Cochlan, W.P., Landry, M.R., Constantinou, J., Rollwagen, G., Trasvina, A., Kudela, R., 1996. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 383, 495–501. <https://doi.org/10.1038/383495a0>
- Cooper, L.H.N., 1937. Oxidation-Reduction Potential in Sea Water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 22, 167–176. <https://doi.org/10.1017/S0025315400011929>
- Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F., Cellier, M.F.M., 2004. Determination of Transmembrane Topology of the *Escherichia coli* Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog *. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3318–3326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309913200>
- Croot, P., Anderson, K., Öztürk, M., Turner, D., 2004. The distribution and speciation of Iron along 6°E, in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 51, 2857–2879.
- Crosa, J.H., Walsh, C.T., 2002. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 223–249. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.223-249.2002>
- Dang, H., Lovell, C.R., 2015. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 91–138. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-15>

- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J., 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 317–364. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-07>
- Dean, C.R., Poole, K., 1993. Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology* 8, 1095–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01654.x>
- Desai, P.J., Angerer, A., Genco, C.A., 1996. Analysis of Fur binding to operator sequences within the *Neisseria gonorrhoeae* fbpA promoter. *Journal of Bacteriology* 178, 5020–5023. <https://doi.org/10.1128/jb.178.16.5020-5023.1996>
- Dixon, S.D., Janes, B.K., Bourgis, A., Jr, P.E.C., Hanna, P.C., 2012. Multiple ABC transporters are involved in the acquisition of petrobactin in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 84, 370–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08028.x>
- Domínguez-Acuña, L., García-del Portillo, F., 2022. Ferrous Iron Uptake Is Required for *Salmonella* to Persist within Vacuoles of Host Cells. *Infection and Immunity* 90, e00149-22. <https://doi.org/10.1128/iai.00149-22>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H.W., Pos, K.M., Piddock, L.J.V., Luisi, B.F., 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology* 16, 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- Duckworth, O.W., Bargar, J.R., Sposito, G., 2009. Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *Biometals* 22, 605–613. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9220-9>
- Dulaquais, G., Waeles, M., Gerringa, L.J.A., Middag, R., Rijkenberg, M.J.A., Riso, R., 2018. The Biogeochemistry of Electroactive Humic Substances and Its Connection to Iron Chemistry in the North East Atlantic and the Western Mediterranean Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 123, 5481–5499. <https://doi.org/10.1029/2018JC014211>
- Eisendle, M., Schrettl, M., Kragl, C., Müller, D., Illmer, P., Haas, H., 2006. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5, 1596–1603. <https://doi.org/10.1128/EC.00057-06>
- Ekins, A., Khan, A.G., Shouldice, S.R., Schryvers, A.B., 2004. Lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria: Insights into the iron acquisition process. *Biometals* 17, 235–243. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027698.43322.60>
- Ennouri, H., d'Abzac, P., Hakil, F., Branchu, P., Naïtali, M., Lomenech, A.-M., Oueslati, R., Desbrières, J., Sivadon, P., Grimaud, R., 2017. The extracellular matrix of the oleolytic biofilms of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* comprises cytoplasmic proteins and T2SS effectors that promote growth on hydrocarbons and lipids. *Environmental Microbiology* 19, 159–173. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13547>
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., de Lorenzo, V., 1999. Opening the iron box: transcriptional metal-loreulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223–6229.

- Farhana, A., Kumar, S., Rathore, S.S., Ghosh, P.C., Ehtesham, N.Z., Tyagi, A.K., Hasnain, S.E., 2008. Mechanistic Insights into a Novel Exporter-Importer System of *Mycobacterium tuberculosis* Unravel Its Role in Trafficking of Iron. PLoS ONE 3, e2087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002087>
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. Science 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Fillat, M.F., 2014. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. Archives of Biochemistry and Biophysics 546, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.029>
- Folschweiller, N., Schalk, I.J., Celia, H., Abdallah, A.A., Pattus, F., Kieffer, B., 2000. The pyoverdinin receptor FpvA, a TonB-dependent receptor involved in iron uptake by *Pseudomonas aeruginosa* (Review). Molecular Membrane Biology 17, 123–133. <https://doi.org/10.1080/09687680050197356>
- Fox, D.T., Hotta, K., Kim, C.-Y., Koppisch, A.T., 2008. The missing link in petrobactin biosynthesis: asbF encodes a (-)-3-dehydroshikimate dehydratase. Biochemistry 47, 12251–12253. <https://doi.org/10.1021/bi801876q>
- Frawley, E.R., Fang, F.C., 2014. The ins and outs of bacterial iron metabolism. Mol Microbiol 93, 609–616. <https://doi.org/10.1111/mmi.12709>
- Fujita, M., Mori, K., Hara, H., Hishiyama, S., Kamimura, N., Masai, E., 2019. A TonB-dependent receptor constitutes the outer membrane transport system for a lignin-derived aromatic compound. Commun Biol 2, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0676-z>
- Furrer, J.L., Sanders, D.N., Hook-Barnard, I.G., McIntosh, M.A., 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. Molecular Microbiology 44, 1225–1234. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02885.x>
- Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., Schalk, I.J., 2017a. Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. ACS Chem Biol 12, 1056–1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>
- Gärdes, A., Triana, C., Amin, S.A., Green, D.H., Romano, A., Trimble, L., Carrano, C.J., 2013. Detection of photoactive siderophore biosynthetic genes in the marine environment. Biometals 26, 507–516. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9635-1>
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.-C., 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a New, Extremely Halotolerant, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 42, 568–576. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-4-568>
- Ge, R., Sun, X., 2012. Iron trafficking system in *Helicobacter pylori*. Biometals 25, 247–258. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9512-8>

- Gerringa, L.J.A., Blain, S., Laan, P., Sarthou, G., Veldhuis, M.J.W., Brussaard, C.P.D., Viollier, E., Timmermans, K.R., 2008. Fe-binding dissolved organic ligands near the Kerguelen Archipelago in the Southern Ocean (Indian sector). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, KEOPS: Kerguelen Ocean and Plateau compared Study* 55, 606–621. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2007.12.007>
- Gerringa, L.J.A., Veldhuis, M.J.W., Timmermans, K.R., Sarthou, G., de Baar, H.J.W., 2006. Covariance of dissolved Fe-binding ligands with phytoplankton characteristics in the Canary Basin. *Marine Chemistry* 102, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.05.004>
- Gledhill, M., Buck, K., 2012. The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., Rensing, C., 2005. The Metal Permease ZupT from *Escherichia coli* Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *Journal of Bacteriology* 187, 1604–1611. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1604-1611.2005>
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L.A., Graumann, P.L., Schalk, I.J., 2007. Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem* 282, 2987–2995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609238200>
- Große, C., Scherer, J., Koch, D., Otto, M., Taudte, N., Grass, G., 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 62, 120–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05326.x>
- Gruber, N., Clement, D., Carter, B.R., Feely, R.A., van Heuven, S., Hoppema, M., Ishii, M., Key, R.M., Kozyr, A., Lauvset, S.K., Lo Monaco, C., Mathis, J.T., Murata, A., Olsen, A., Perez, F.F., Sabine, C.L., Tanhua, T., Wanninkhof, R., 2019. The oceanic sink for anthropogenic CO₂ from 1994 to 2007. *Science* 363, 1193–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aau5153>
- Guan, L.L., Kanoh, K., Kamino, K., 2001. Effect of Exogenous Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1710–1717. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1710-1717.2001>
- Haemig, H.A.H., Moen, P.J., Brooker, R.J., 2010. Evidence That Highly Conserved Residues of Transmembrane Segment 6 of *Escherichia coli* MntH Are Important for Transport Activity. *Biochemistry* 49, 4662–4671. <https://doi.org/10.1021/bi100320y>
- Hagan, A.K., Carlson, P.E., Hanna, P.C., 2016. Flying under the radar: The non-canonical biochemistry and molecular biology of petrobactin from *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 102, 196–206. <https://doi.org/10.1111/mmi.13465>
- Hagan, A.K., Tripathi, A., Berger, D., Sherman, D.H., Hanna, P.C., 2017. Petrobactin Is Exported from *Bacillus anthracis* by the RND-Type Exporter ApeX. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01238-17>
- Hantke, K., 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4, 172–177. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00184-3)

- Hantke, K., 1990. Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett. 55, 5–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90158-m](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90158-m)
- Hickford, S., Küpper, F., Zhang, G., Carrano, C., Blunt, J., Butler, A., 2004. Petrobactin Sulfonate, a New Siderophore Produced by the Marine Bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Journal of natural products 67, 1897–9. <https://doi.org/10.1021/np049823i>
- Homann, V.V., Edwards, K.J., Webb, E.A., Butler, A., 2009a. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives. Biometals 22, 565–571. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9237-0>
- Honarmand Ebrahimi, K., Hagedoorn, P.-L., Hagen, W.R., 2015. Unity in the Biochemistry of the Iron-Storage Proteins Ferritin and Bacterioferritin. Chem. Rev. 115, 295–326. <https://doi.org/10.1021/cr5004908>
- Hopkinson, B.M., Barbeau, K.A., 2007. Organic and redox speciation of iron in the eastern tropical North Pacific suboxic zone. Marine Chemistry, Special issue: Dedicated to the memory of Professor Roland Wollast 106, 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.02.008>
- Hopwood, M.J., Carroll, D., Höfer, J., Achterberg, E.P., Meire, L., Le Moigne, F.A.C., Bach, L.T., Eich, C., Sutherland, D.A., González, H.E., 2019. Highly variable iron content modulates iceberg-ocean fertilisation and potential carbon export. Nat Commun 10, 5261. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13231-0>
- Hotta, K., Kim, C.-Y., Fox, D.T., Koppisch, A.T., 2010. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. Microbiology, 156, 1918–1925. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039404-0>
- Hutchins, D.A., Boyd, P.W., 2016. Marine phytoplankton and the changing ocean iron cycle. Nature Clim Change 6, 1072–1079. <https://doi.org/10.1038/nclimate3147>
- Hutchins, D.A., Capone, D.G., 2022. The marine nitrogen cycle: new developments and global change. Nat Rev Microbiol 20, 401–414. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00687-z>
- Hutchins, D.A., Sañudo-Wilhelmy, S.A., 2022. The Enzymology of Ocean Global Change. Annu. Rev. Mar. Sci. 14, 187–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-032221-084230>
- Huu, N.B., Denner, E.B.M., Ha, D.T.C., Wanner, G., Stan-Lotter, H., 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 367–375. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-367>
- Ibisanmi, E., Sander, S.G., Boyd, P.W., Bowie, A.R., Hunter, K.A., 2011. Vertical distributions of iron-(III) complexing ligands in the Southern Ocean. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, Biogeochemistry of the Australian Sector of the Southern Ocean 58, 2113–2125. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2011.05.028>
- Imperi, F., Tiburzi, F., Visca, P., 2009. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 20440–20445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908760106>

- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases☆. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 29–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x>
- Jiang, J., Kappler, A., 2008. Kinetics of Microbial and Chemical Reduction of Humic Substances: Implications for Electron Shuttling. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3563–3569. <https://doi.org/10.1021/es7023803>
- Jr, P.E.C., Dixon, S.D., Janes, B.K., Carr, K.A., Nusca, T.D., Anderson, E.C., Keene, S.E., Sherman, D.H., Hanna, P.C., 2010. Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* 75, 900–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07025.x>
- Kammler, M., Schön, C., Hantke, K., 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175, 6212–6219. <https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6212-6219.1993>
- Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R., Ogawa, T., 2001a. Genes Essential to Iron Transport in the Cyanobacterium *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 183, 2779–2784. <https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2779-2784.2001>
- Katoh, H., Hagino, N., Ogawa, T., 2001b. Iron-Binding Activity of FutA1 Subunit of an ABC-type Iron Transporter in the Cyanobacterium *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* 42, 823–827. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce106>
- Khan, A., Singh, P., Srivastava, A., 2018. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research* 212–213, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kikuchi, T., Fujii, M., Terao, K., Jiwei, R., Lee, Y.P., Yoshimura, C., 2017. Correlations between aromaticity of dissolved organic matter and trace metal concentrations in natural and effluent waters: A case study in the Sagami River Basin, Japan. *Science of The Total Environment* 576, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.068>
- Klein, B., Bouriat, P., Goulas, P., Grimaud, R., 2010. Behavior of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 cells during initiation of biofilm formation at the alkane–water interface. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 461–468. <https://doi.org/10.1002/bit.22577>
- Klein, B., Grossi, V., Bouriat, P., Goulas, P., Grimaud, R., 2008. Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane–water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Research in Microbiology* 159, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.11.013>
- Klein, S., Boutin, S., Kocer, K., Fiedler, M.O., Störzinger, D., Weigand, M.A., Tan, B., Richter, D., Rupp, C., Mieth, M., Mehrabi, A., Hackert, T., Zimmermann, S., Heeg, K., Nurjadi, D., 2022. Rapid Development of Cefiderocol Resistance in Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* During Therapy Is Associated With Heterogeneous Mutations in the Catecholate Siderophore Receptor cirA. *Clinical Infectious Diseases* 74, 905–908. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab511>

Konhauser, K.O., Kappler, A., Roden, E.E., 2011. Iron in microbial metabolisms. *Elements* 7, 89–93. <https://doi.org/10.2113/gselements.7.2.89>

Koppisch, A.T., Browder, C.C., Moe, A.L., Shelley, J.T., Kinkel, B.A., Hersman, L.E., Iyer, S., Ruggiero, C.E., 2005. Petrobactin is the Primary Siderophore Synthesized by *Bacillus anthracis* Str. Sterne under Conditions of Iron Starvation. *BioMetals* 18, 577–585. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-1782-6>

Koppisch, A.T., Hotta, K., Fox, D.T., Ruggiero, C.E., Kim, C.-Y., Sanchez, T., Iyer, S., Browder, C.C., Unkefer, P.J., Unkefer, C.J., 2008. Biosynthesis of the 3,4-dihydroxybenzoate moieties of petrobactin by *Bacillus anthracis*. *J. Org. Chem.* 73, 5759–5765. <https://doi.org/10.1021/jo800427f>

Koropatkin, N., Randich, A.M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H.B., Smith, T.J., 2007. The Structure of the Iron-binding Protein, FutA1, from *Synechocystis* 6803 *. *Journal of Biological Chemistry* 282, 27468–27477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704136200>

Krachler, R., Krachler, R.F., Wallner, G., Hann, S., Laux, M., Cervantes Recalde, M.F., Jirsa, F., Neubauer, E., von der Kammer, F., Hofmann, T., Keppler, B.K., 2015. River-derived humic substances as iron chelators in seawater. *Marine Chemistry* 174, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.05.009>

Kramer, J., Özkaya, Ö., Kümmerli, R., 2020. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 18, 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>

Krumbein, W.C., Garrels, R.M., 1952. Origin and Classification of Chemical Sediments in Terms of pH and Oxidation-Reduction Potentials. *The Journal of Geology* 60, 1–33. <https://doi.org/10.1086/625929>

Laglera, L.M., van den Berg, C.M.G., 2009. Evidence for geochemical control of iron by humic substances in seawater. *Limnology and Oceanography* 54, 610–619. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.2.0610>

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7072–7077. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>

Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., Vogel, H.J., 2016. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiology Reviews* 40, 273–298. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049>

Lauderdale, J.M., Braakman, R., Forget, G., Dutkiewicz, S., Follows, M.J., 2020. Microbial feedbacks optimize ocean iron availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 4842–4849. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917277117>

Lee, J.Y., Janes, B.K., Passalacqua, K.D., Pflieger, B.F., Bergman, N.H., Liu, H., Håkansson, K., Somu, R.V., Aldrich, C.C., Cendrowski, S., Hanna, P.C., Sherman, D.H., 2007a. Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 189, 1698–1710. <https://doi.org/10.1128/JB.01526-06>

- Lee, J.Y., Passalacqua, K.D., Hanna, P.C., Sherman, D.H., 2011. Regulation of Petrobactin and Bacillibactin Biosynthesis in *Bacillus anthracis* under Iron and Oxygen Variation. PLOS ONE 6, e20777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020777>
- Lenneman, E.M., Ohlert, J.M., Palani, N.P., Barney, B.M., 2013. Fatty Alcohols for Wax Esters in *Marinobacter aquaeolei* VT8: Two Optional Routes in the Wax Biosynthesis Pathway. Appl. Environ. Microbiol. 79, 7055–7062. <https://doi.org/10.1128/AEM.02420-13>
- Leventhal, G.E., Ackermann, M., Schiessl, K.T., 2019. Why microbes secrete molecules to modify their environment: the case of iron-chelating siderophores. J. R. Soc. Interface. 16, 20180674. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0674>
- Li, K., Chen, W.-H., Bruner, S.D., 2016. Microbial siderophore-based iron assimilation and therapeutic applications. Biometals 29, 377–388. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9935-3>
- Libes, S., 2011. Introduction to Marine Biogeochemistry. Academic Press.
- Liu, Q., Xamxidini, M., Sun, C., Cheng, H., Meng, F.-X., Wu, Y.-H., Wang, C.-S., Xu, X.-W., 2018. *Marinobacter fuscus* sp. nov., a marine bacterium of Gammaproteobacteria isolated from surface seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68, 3156–3162. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002956>
- Liu, X., Millero, F.J., 2002. The solubility of iron in seawater. Marine Chemistry 77, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00074-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00074-3)
- Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jiménez, C.R., Vandembroucke-Grauls, C., Bitter, W., 2006. The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 188, 1882–1891. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006>
- Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., Cellier, M.F.M., 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. Molecular Microbiology 35, 1065–1078. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01774.x>
- Manck, L.E., Park, J., Tully, B.J., Poire, A.M., Bundy, R.M., Dupont, C.L., Barbeau, K.A., 2021. Petrobactin, a siderophore produced by *Alteromonas*, mediates community iron acquisition in the global ocean. ISME J. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01065-y>
- Manilla-Pérez, E., Lange, A.B., Hetzler, S., Steinbüchel, A., 2010. Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol 86, 1693–1706. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2515-5>
- Márquez, M.C., Ventosa, A., 2005. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1349–1351. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63591-0>
- Martin, J.H., Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S.J., Hunter, C.N., Elrod, V.A., Nowicki, J.L., Coley, T.L., Barber, R.T., Lindley, S., Watson, A.J., Van Scoy,

- K., Law, C.S., Liddicoat, M.I., Ling, R., Stanton, T., Stockel, J., Collins, C., Anderson, A., Bidigare, R., Ondrusek, M., Latasa, M., Millero, F.J., Lee, K., Yao, W., Zhang, J.Z., Friederich, G., Sakamoto, C., Chavez, F., Buck, K., Kolber, Z., Greene, R., Falkowski, P., Chisholm, S.W., Hoge, F., Swift, R., Yungel, J., Turner, S., Nightingale, P., Hatton, A., Liss, P., Tindale, N.W., 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 371, 123–129. <https://doi.org/10.1038/371123a0>
- Martin, J.H., Fitzwater, S.E., 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* 331, 341–343. <https://doi.org/10.1038/331341a0>
- Martinez, J.S., Carter-Franklin, J.N., Mann, E.L., Martin, J.D., Haygood, M.G., Butler, A., 2003. Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 3754–3759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0637444100>
- Matzanke, B.F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A.X., Hantke, K., 2004. FhuF, Part of a Siderophore–Reductase System. *Biochemistry* 43, 1386–1392. <https://doi.org/10.1021/bi0357661>
- McRose, D.L., Baars, O., Seyedsayamdost, M.R., Morel, F.M.M., 2018. Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 7581–7586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805791115>
- Melton, E.D., Swanner, E.D., Behrens, S., Schmidt, C., Kappler, A., 2014. The interplay of microbially mediated and abiotic reactions in the biogeochemical Fe cycle. *Nat Rev Microbiol* 12, 797–808. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3347>
- Mey, A.R., Wyckoff, E.E., Kanukurthy, V., Fisher, C.R., Payne, S.M., 2005. Iron and Fur Regulation in *Vibrio cholerae* and the Role of Fur in Virulence. *Infection and Immunity* 73, 8167–8178. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8167-8178.2005>
- Miethke, M., Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Miethke, M., Schmidt, S., Marahiel, M.A., 2008. The major facilitator superfamily-type transporter YmfE and the multidrug-efflux activator Mta mediate bacillibactin secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 190, 5143–5152. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-08>
- Mietzner, T.A., Tencza, S.B., Adhikari, P., Vaughan, K.G., Nowalk, A.J., 1998. Fe(III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 225, 113–135. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80451-9_7
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Millero, F.J., Feistel, R., Wright, D.G., McDougall, T.J., 2008. The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 55, 50–72. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2007.10.001>

- Mohamed, K.N., Steigenberger, S., Nielsdottir, M.C., Gledhill, M., Achterberg, E.P., 2011. Dissolved iron(III) speciation in the high latitude North Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 58, 1049–1059. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2011.08.011>
- Montes, M.J., Bozal, N., Mercadé, E., 2008. *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 1346–1349. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65298-0>
- Moormeier, D.E., Bayles, K.W., 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* 104, 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>
- Moran, M.A., Kujawinski, E.B., Schroer, W.F., Amin, S.A., Bates, N.R., Bertrand, E.M., Braakman, R., Brown, C.T., Covert, M.W., Doney, S.C., Dyhrman, S.T., Edison, A.S., Eren, A.M., Levine, N.M., Li, L., Ross, A.C., Saito, M.A., Santoro, A.E., Segrè, D., Shade, A., Sullivan, M.B., Vardi, A., 2022. Microbial metabolites in the marine carbon cycle. *Nat Microbiol* 7, 508–523. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01090-3>
- Moreno-Vivián, C., Flores, E., 2007. Chapter 17 - Nitrate Assimilation in Bacteria, in: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (Eds.), *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier, Amsterdam, pp. 263–282. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50018-7>
- Mounier, J., 2013. Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes (thesis). Pau.
- Mounier, J., Camus, A., Mitteau, I., Vaysse, P.-J., Goulas, P., Grimaud, R., Sivadon, P., 2014a. The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 90, 816–831. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12439>
- Mounier, J., Hakil, F., Branchu, P., Naïtali, M., Goulas, P., Sivadon, P., Grimaud, R., 2018. AupA and AupB Are Outer and Inner Membrane Proteins Involved in Alkane Uptake in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *mBio* 9, e00520-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00520-18>
- Müller, K., Matzanke, B.F., Schünemann, V., Trautwein, A.X., Hantke, K., 1998. FhuF, an iron-regulated protein of *Escherichia coli* with a new type of [2Fe-2S] center. *European Journal of Biochemistry* 258, 1001–1008. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2581001.x>
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26723–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Nielsen, L.P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P.B., Sayama, M., 2010. Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment. *Nature* 463, 1071–1074. <https://doi.org/10.1038/nature08790>
- Nikaido, H., 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>

- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K., 2010a. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Ojha, A., Hatfull, G.F., 2007. The role of iron in *Mycobacterium smegmatis* biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. *Mol Microbiol* 66, 468–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x>
- Oves-Costales, D., Kadi, N., Fogg, M.J., Song, L., Wilson, K.S., Challis, G.L., 2008. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with N8-citryl-spermidine and its N1-(3,4-dihydroxybenzoyl) derivative. *Chem. Commun. (Camb.)* 4034–4036. <https://doi.org/10.1039/b809353a>
- Ozenberger, B.A., Nahlik, M.S., McIntosh, M.A., 1987. Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169, 3638–3646. <https://doi.org/10.1128/jb.169.8.3638-3646.1987>
- Parker Siburt, C.J., Mietzner, T.A., Crumbliss, A.L., 2012. FbpA--a bacterial transferrin with more to offer. *Biochim Biophys Acta* 1820, 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.001>
- Passow, U., Carlson, C.A., 2012. The biological pump in a high CO₂ world. *Marine Ecology Progress Series* 470, 249–272.
- Peralta, D.R., Adler, C., Corbalán, N.S., Paz García, E.C., Pomares, M.F., Vincent, P.A., 2016. Enterobactin as Part of the Oxidative Stress Response Repertoire. *PLoS ONE* 11, e0157799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157799>
- Perry, R.D., Mier, I., Fetherston, J.D., 2007. Roles of the Yfe and Feo transporters of *Yersinia pestis* in iron uptake and intracellular growth. *Biometals* 20, 699. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9051-x>
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2009. A Novel Signaling Network Essential for Regulating *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *PLOS Pathogens* 5, e1000668. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000668>
- Pfleger, B.F., Kim, Y., Nusca, T.D., Maltseva, N., Lee, J.Y., Rath, C.M., Scaglione, J.B., Janes, B.K., Anderson, E.C., Bergman, N.H., Hanna, P.C., Joachimiak, A., Sherman, D.H., 2008. Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17133–17138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808118105>
- Pfleger, B.F., Lee, J.Y., Somu, R.V., Aldrich, C.C., Hanna, P.C., Sherman, D.H., 2007. Characterization and analysis of early enzymes for petrobactin biosynthesis in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* 46, 4147–4157. <https://doi.org/10.1021/bi6023995>
- Pierre, J.L., Fontecave, M., Crichton, R.R., n.d. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron 6.

- Quéguiner, B., 2013. Iron fertilization and the structure of planktonic communities in high nutrient regions of the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, Southern Ocean Natural Iron Fertilization* 90, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.07.024>
- Raiswell, R., 2011. Iron Transport from the Continents to the Open Ocean: The Aging-Rejuvenation Cycle. *Elements* 7, 101–106. <https://doi.org/10.2113/gselements.7.2.101>
- Rauscher, L., Expert, D., Matzanke, B.F., Trautwein, A.X., 2002. Chrysobactin-dependent iron acquisition in *Erwinia chrysanthemi*. Functional study of a homolog of the *Escherichia coli* ferric enterobactin esterase. *J. Biol. Chem.* 277, 2385–2395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107530200>
- Raven, J.A., Evans, M.C.W., Korb, R.E., 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research* 60, 111–150. <https://doi.org/10.1023/A:1006282714942>
- Ribeiro, A.J.M., Holliday, G.L., Furnham, N., Tyzack, J.D., Ferris, K., Thornton, J.M., 2018. Mechanism and Catalytic Site Atlas (M-CSA): a database of enzyme reaction mechanisms and active sites. *Nucleic Acids Research* 46, D618–D623. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1012>
- Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J.-P., Beaugard, P.B., 2019. Iron Homeostasis in *Bacillus subtilis* Requires Siderophore Production and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.02439-18>
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology* 11, 2477–2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>
- Rue, E.L., Bruland, K.W., 1995. Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Marine Chemistry, The Chemistry of Iron in Seawater and its Interaction with Phytoplankton* 50, 117–138. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00031-L](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00031-L)
- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A.F., 2004. The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂. *Science* 305, 367–371. <https://doi.org/10.1126/science.1097403>
- Sabine, C.L., Tanhua, T., 2010. Estimation of Anthropogenic CO₂ Inventories in the Ocean. *Annual Review of Marine Science* 2, 175–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-080947>
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L.L., 2013. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53, 303–317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Sandy, M., Butler, A., 2009. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. *Chem Rev* 109, 4580–4595. <https://doi.org/10.1021/cr9002787>
- Sato, M., Takeda, S., Furuya, K., 2007. Iron regeneration and organic iron(III)-binding ligand production during in situ zooplankton grazing experiment. *Marine Chemistry* 106, 471–488. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.05.001>

- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184, 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T., 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* 20, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sauer, M., Hantke, K., Braun, V., 1990. Sequence of the *fluE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants. *Molecular Microbiology* 4, 427–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00609.x>
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2002. Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41, 1663–1671. <https://doi.org/10.1021/bi0157767>
- Schalk, I.J., Guillon, L., 2013a. 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, 1267–1277. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1468-2>
- Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., Brillet, K., 2012. Chapter Two - Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters, in: Argüello, J.M., Lutsenko, S. (Eds.), *Current Topics in Membranes, Metal Transporters*. Academic Press, pp. 37–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>
- Schoffman, H., Lis, H., Shaked, Y., Keren, N., 2016. Iron–Nutrient Interactions within Phytoplankton. *Frontiers in Plant Science* 7.
- Schröder, I., Johnson, E., de Vries, S., 2003. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 427–447. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00043-3)
- Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A., 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* 20, 275–287. <https://doi.org/10.1039/b111145k>
- Schwertmann, null, Friedl, null, Stanjek, null, 1999. From Fe(III) Ions to Ferrihydrite and then to Hematite. *J Colloid Interface Sci* 209, 215–223. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5899>
- Shao, Z., Wang, W., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00116>
- Shi, L., Richardson, D.J., Wang, Z., Kerisit, S.N., Rosso, K.M., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., 2009. The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer. *Environmental Microbiology Reports* 1, 220–227. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00035.x>
- Siderophore Base - The Web Data Base of Microbial Siderophores [WWW Document], n.d. URL http://bertrandsamuel.free.fr/siderophore_base/about_us.php (accessed 3.9.22).

Silva, J.J.R.F. da, Williams, R.J.P., 2001. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. OUP Oxford.

Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de las Heras, A., Páez-Espino, A.D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nickel, P.I., Platero, R., de Lorenzo, V., 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41, D666–D675. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1119>

Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1, 784. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>

Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L., Grimaud, R., 2019. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environmental Microbiology Reports* 11, 749–764. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12785>

Sivadon, P., Grimaud, Regis., 2017. Assimilation of Hydrocarbons and Lipids by Means of Biofilm Formation, in: *Cellular Ecophysiology of Microbe*.

Snider, R.M., Strycharz-Glaven, S.M., Tsoi, S.D., Erickson, J.S., Tender, L.M., 2012. Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 15467–15472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209829109>

Soares, E.V., 2022. Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 3985–4004. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11995-y>

Sparacino-Watkins, C., Stolz, J.F., Basu, P., 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.* 43, 676–706. <https://doi.org/10.1039/C3CS60249D>

Stefánsson, A., 2007. Iron(III) Hydrolysis and Solubility at 25 °C. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6117–6123. <https://doi.org/10.1021/es070174h>

Stevenson, F.J., 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley & Sons.

Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J.M., Poole, K., 1998. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 341–345. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13910.x>

Stojiljkovic, I., Perkins-Balding, D., 2002. Processing of Heme and Heme-Containing Proteins by Bacteria. *DNA and Cell Biology* 21, 281–295. <https://doi.org/10.1089/104454902753759708>

Susanto, H., 2020. *Chemistry and Industrial Techniques for Chemical Engineers*. <https://doi.org/10.1201/9780429286674>

Sutak, R., Camadro, J.-M., Lesuisse, E., 2020. Iron Uptake Mechanisms in Marine Phytoplankton. *Frontiers in Microbiology* 11.

- Sutcliffe, I.C., 2010. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* 18, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.005>
- Tagliabue, A., Bowie, A.R., Boyd, P.W., Buck, K.N., Johnson, K.S., Saito, M.A., 2017. The integral role of iron in ocean biogeochemistry. *Nature* 543, 51–59. <https://doi.org/10.1038/nature21058>
- Teramoto, M., Suzuki, M., Okazaki, F., Hatmanti, A., Harayama, S., 2009. Oceanobacter-related bacteria are important for the degradation of petroleum aliphatic hydrocarbons in the tropical marine environment. *Microbiology* 155, 3362–3370. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030411-0>
- Tian, F., Frew, R., Sander, S., Hunter, K., Ellwood, M., 2006. Organic iron(III) speciation in surface transects across a frontal zone: The Chatham Rise, New Zealand. *Marine and Freshwater Research* 57, 533–544. <https://doi.org/10.1071/MF05209>
- Tong, Y., Guo, M., 2009. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 481, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.10.013>
- Tortell, P.D., Maldonado, M.T., Granger, J., Price, N.M., 1999. Marine bacteria and biogeochemical cycling of iron in the oceans. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00593.x>
- Touati, D., 2000. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 1–6. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>
- van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0748-0>
- van den Berg, C.M.G., 2006. Chemical Speciation of Iron in Seawater by Cathodic Stripping Voltammetry with Dihydroxynaphthalene. *Anal. Chem.* 78, 156–163. <https://doi.org/10.1021/ac051441+>
- van den Berg, C.M.G., 1995. Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Marine Chemistry, The Chemistry of Iron in Seawater and its Interaction with Phytoplankton* 50, 139–157. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00032-M](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00032-M)
- Vaysse, P.-J., Prat, L., Mangenot, S., Cruveiller, S., Goulas, P., Grimaud, R., 2009. Proteomic analysis of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation at the alkane-water interface reveals novel proteins and cellular processes involved in hexadecane assimilation. *Research in Microbiology* 160, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.09.010>
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., Ma, S., 2015. RND-type Drug Efflux Pumps from Gram-negative bacteria: Molecular Mechanism and Inhibition. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00377>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugerard, P., Losick, R., Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11, 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmi-cro2960>

- von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., Lloyd, J.R., 2008. Secretion of Flavins by *Shewanella* Species and Their Role in Extracellular Electron Transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 615–623. <https://doi.org/10.1128/AEM.01387-07>
- Vraspir, J.M., Butler, A., 2009. Chemistry of marine ligands and siderophores. *Ann Rev Mar Sci* 1, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163712>
- Wagener, T., Pulido-Villena, E., Guieu, C., 2008. Dust iron dissolution in seawater: Results from a one-year time-series in the Mediterranean Sea. *Geophysical Research Letters* 35, L16601. <https://doi.org/10.1029/2008GL034581>
- Wahlen, B.D., Oswald, W.S., Seefeldt, L.C., Barney, B.M., 2009. Purification, Characterization, and Potential Bacterial Wax Production Role of an NADPH-Dependent Fatty Aldehyde Reductase from *Marinobacter aquaeolei* VT8. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2758–2764. <https://doi.org/10.1128/AEM.02578-08>
- Wandersman, C., Stojiljkovic, I., 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* 3, 215–220. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00078-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00078-3)
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2006. Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environ Geochem Health* 28, 197–214. <https://doi.org/10.1007/s10653-005-9032-y>
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* 4, 752–764. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Weerasinghe, Aruna J., Amin, S.A., Barker, R.A., Othman, T., Romano, A.N., Siburt, C.J.P., Tisnado, J., Lambert, L.A., Huxford, T., Carrano, C.J., Crumbliss, A.L., 2013. Borate as a Synergistic Anion for *Marinobacter algicola* Ferric Binding Protein, FbpA: A Role for Boron in Iron Transport in Marine Life. <https://doi.org/10.1021/ja406609s>
- Weinberg, E.D., 1997. The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine* 40, 578–583. <https://doi.org/10.1353/pbm.1997.0072>
- Whitby, H., Planquette, H., Cassar, N., Bucciarelli, E., Osburn, C.L., Janssen, D.J., Cullen, J.T., González, A.G., Völker, C., Sarthou, G., 2020. A call for refining the role of humic-like substances in the oceanic iron cycle. *Sci Rep* 10, 6144. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62266-7>
- Williams, P., Griffiths, E., 1992. Bacterial transferrin receptors — structure, function and contribution to virulence. *Med Microbiol Immunol* 181, 301–322. <https://doi.org/10.1007/BF00191543>
- Wilson, M.K., Abergel, R.J., Arceneaux, J.E.L., Raymond, K.N., Byers, B.R., 2009. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals* 23, 129. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9272-x>

- Wu, J., Boyle, E., 2002. Iron in the Sargasso Sea: Implications for the processes controlling dissolved Fe distribution in the ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 16, 33-1-33-8. <https://doi.org/10.1029/2001GB001453>
- Xu, N., Qiu, G.-W., Lou, W.-J., Li, Z.-K., Jiang, H.-B., Price, N.M., Qiu, B.-S., 2016. Identification of an iron permease, cFTR1, in cyanobacteria involved in the iron reduction/re-oxidation uptake pathway. *Environmental Microbiology* 18, 5005–5017. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13464>
- Yan, N., 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* 38, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.01.003>
- Yao, W., Millero, F.J., 1996. Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Marine Chemistry* 52, 1–16. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00072-0](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00072-0)
- Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., Schalk, I.J., 2010. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 2, 412–418. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x>
- You, C., Zhang, X.-Z., Zhang, Y.-H.P., 2012. Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 78, 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
- Zhong, Z.-P., Liu, Y., Liu, H.-C., Wang, F., Zhou, Y.-G., Liu, Z.-P., 2015. *Marinobacter halophilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 2838–2845. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000338>

Annexes

Supplément de Matériel & méthodes

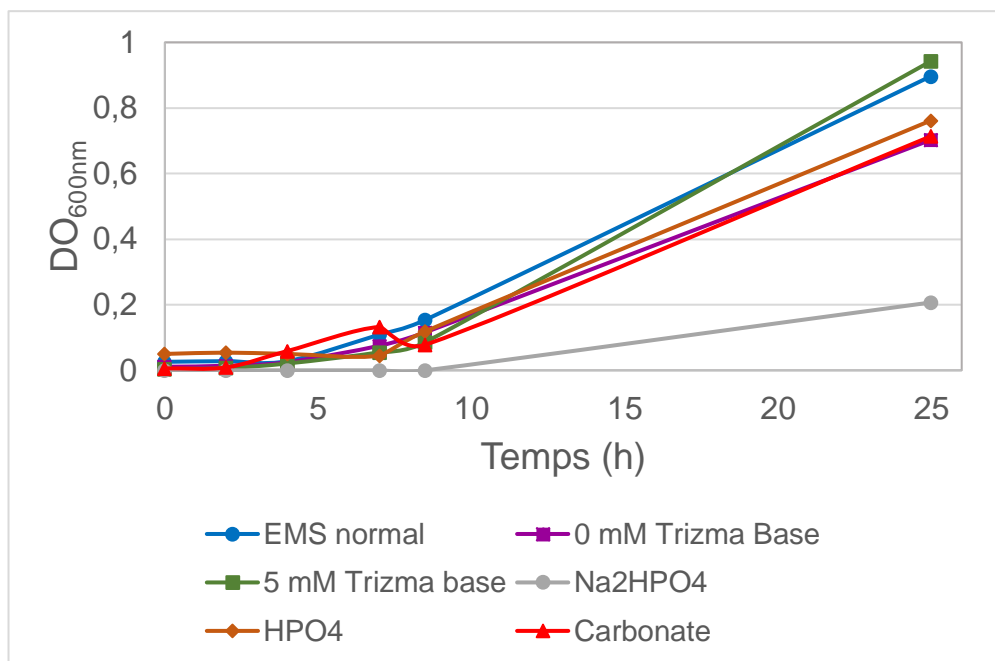
1.1 Préparation de cellules d'*E. coli* DH5- α λ pir électro-compétentes

Pour rendre électrocompétente *E. coli* DH5- α λ pir, une culture de 50 mL a été réalisée dans du LB à partir d'une culture de nuit diluée au 1/100^{ème} et incubée pendant 2-3 heures à 37°C à 200 rpm jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6. Une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm et 4°C a été effectuée, puis le culot a été repris dans un volume identique à celui de la culture avec de l'eau milli Q stérile froide. Cette même étape a été renouvelée trois fois et le culot resuspendu respectivement dans 25 mL d'eau milli Q froide, 25 mL d'une solution froide contenant de l'eau milli Q et 10 % de glycérol (v/v) et enfin dans 500 μ L de cette même solution froide d'eau et de glycérol. Les cellules compétentes sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

1.2 Préparation de cellules d'*E. coli* S17-1 λ pir chimio-compétentes

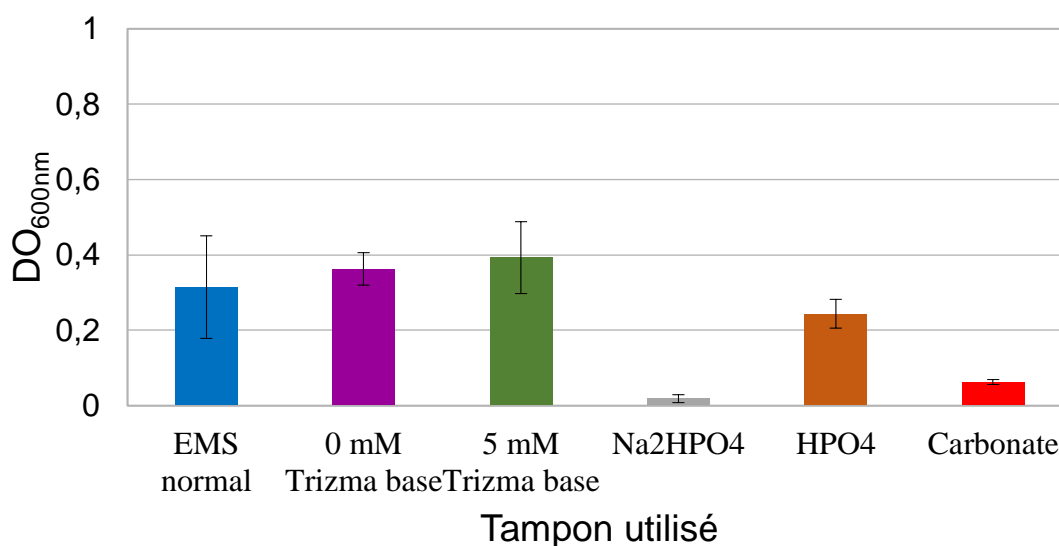
Pour rendre chimiocompétente les cellules d'*E. coli* S17-1 λ pir, une culture de 50 mL a été réalisée dans du LB à partir d'une culture de nuit diluée au 1/100^{ème} et incubée pendant 2-3 heures à 37°C à 200 rpm jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} de 0,4. La culture a ensuite été placée 20 minutes sur de la glace puis centrifugée 10 minutes à 5000 rpm à 4°C. Le culot a été repris dans 20 mL de CaCl₂ à 0,1 mol.L⁻¹ froid puis placé sur de la glace durant 30 minutes. Une nouvelle centrifugation a été réalisée puis le culot a été resuspendu dans 2 mL d'une solution froide contenant du CaCl₂ à 0,1 mol.L⁻¹ et 15 % de glycérol.

Figures supplémentaires



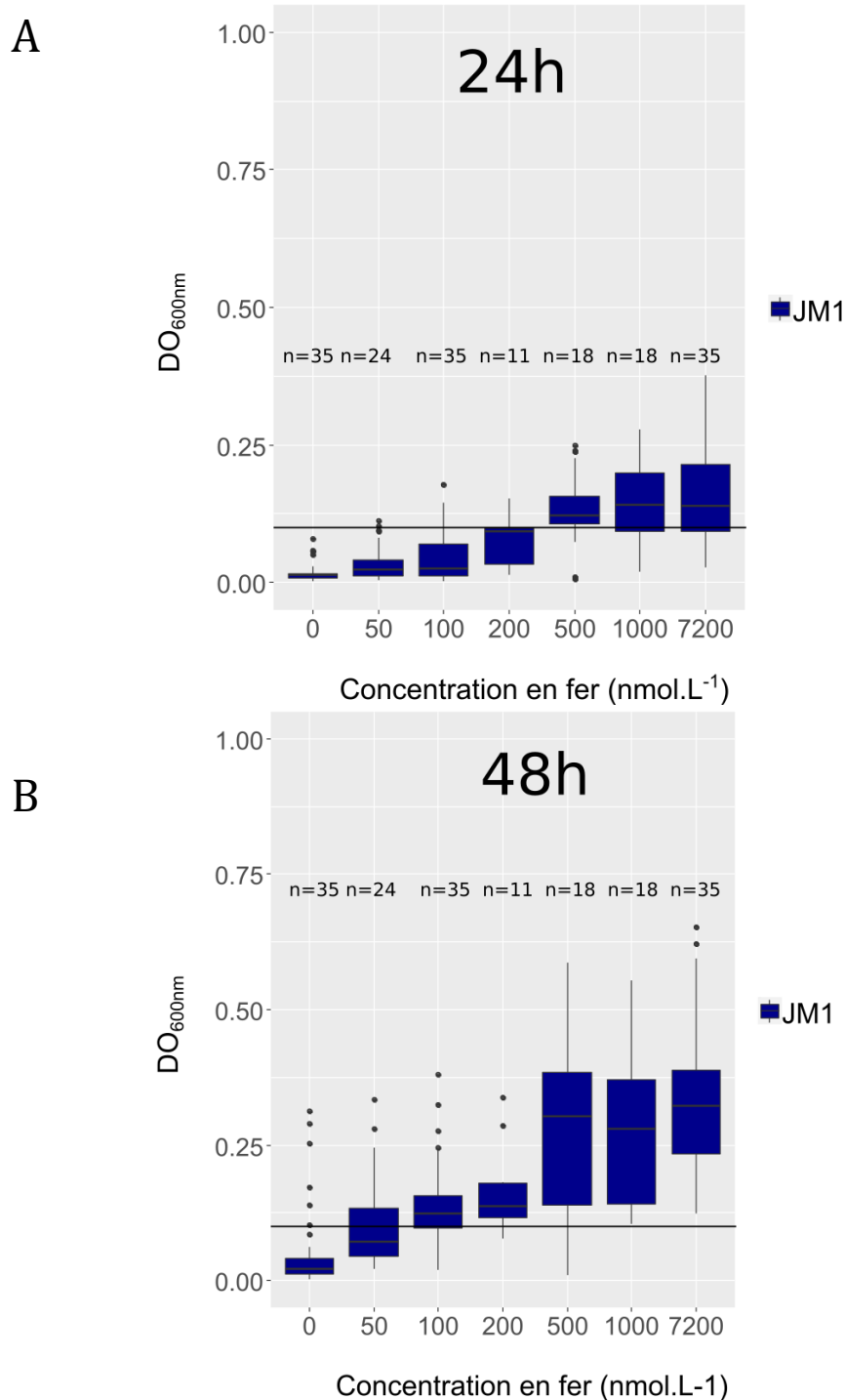
Annexe 1. Suivi de croissance planctonique sur acétate durant 25h de *Mh* JM1 dans du milieu EMS avec différents tampons.

Les mesures ont été réalisées avec un seul réplicat.



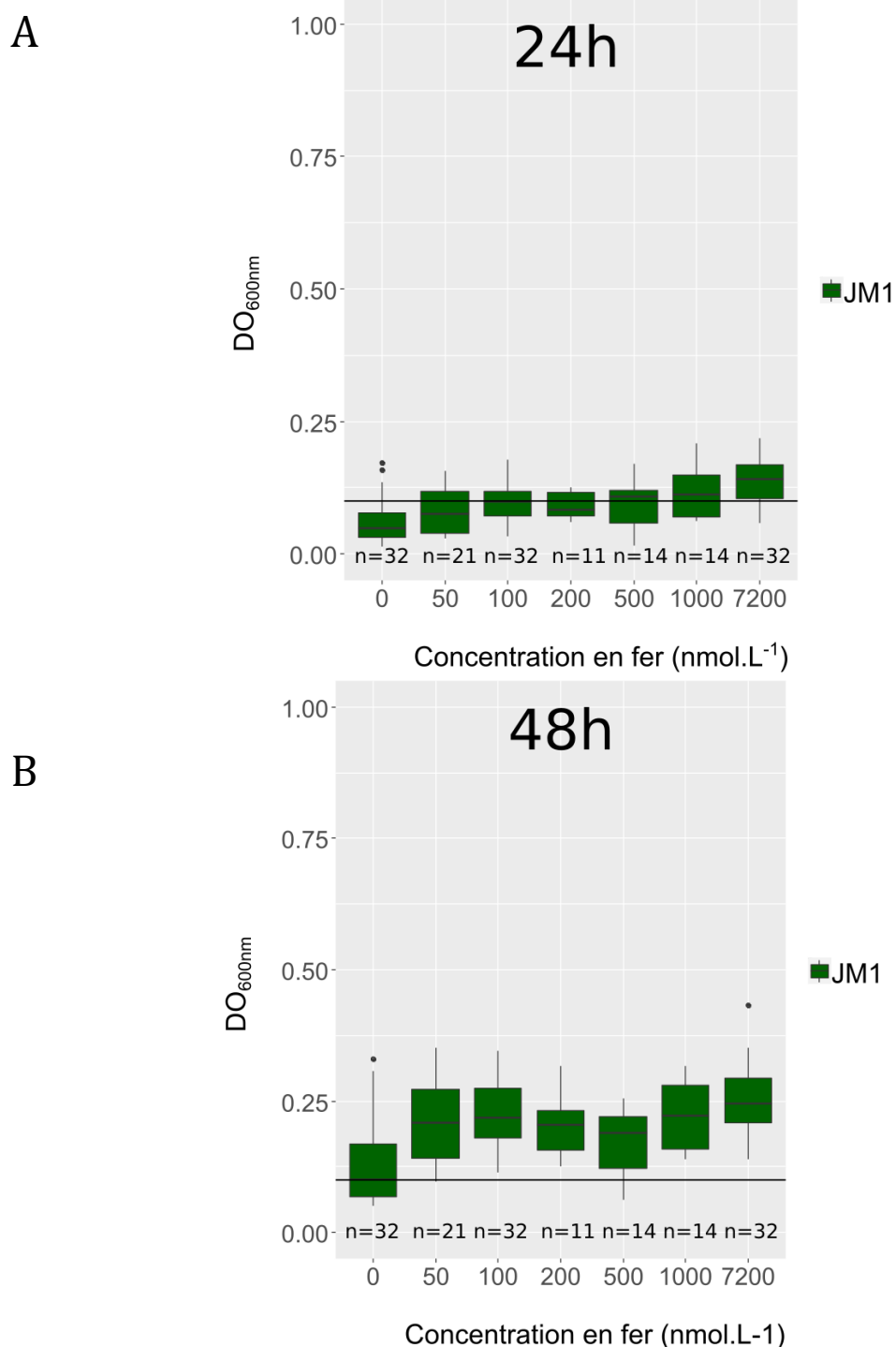
Annexe 2. Quantification du biofilm de *Mh* JM1 à 24h sur paraffine dans du milieu EMS avec différents tampons.

Les mesures ont été réalisées en triplicat, et les barres d'erreurs associées représentées en noir.



Annexe 3. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur paraffine.

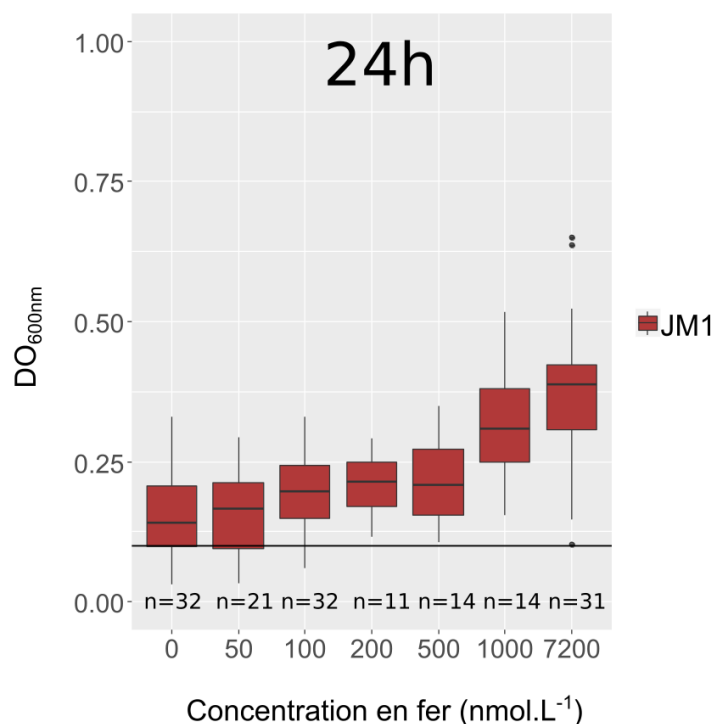
Les valeurs de biomasse après croissance en biofilm sur paraffine ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de réplicats est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.



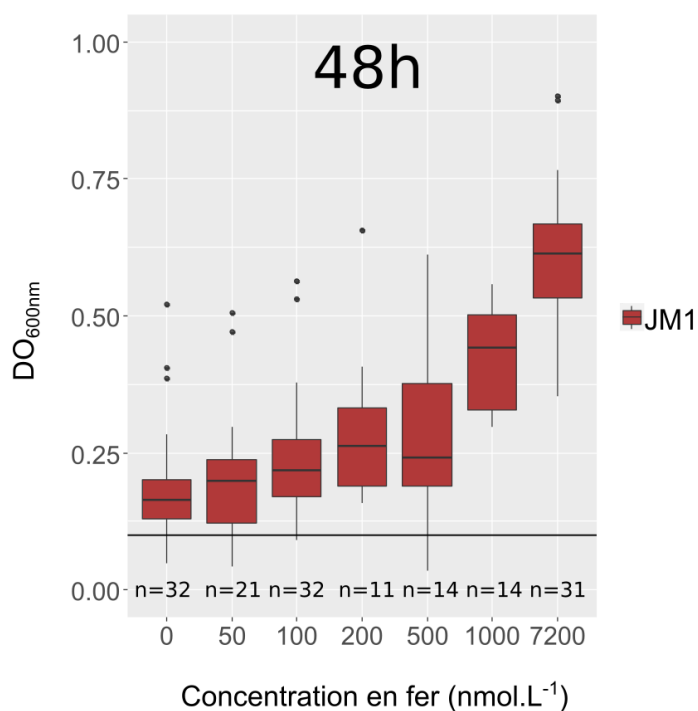
Annexe 4. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur tristéarine.

Les valeurs de biomasse après croissance en biofilm sur tristéarine ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de réplicats est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

A



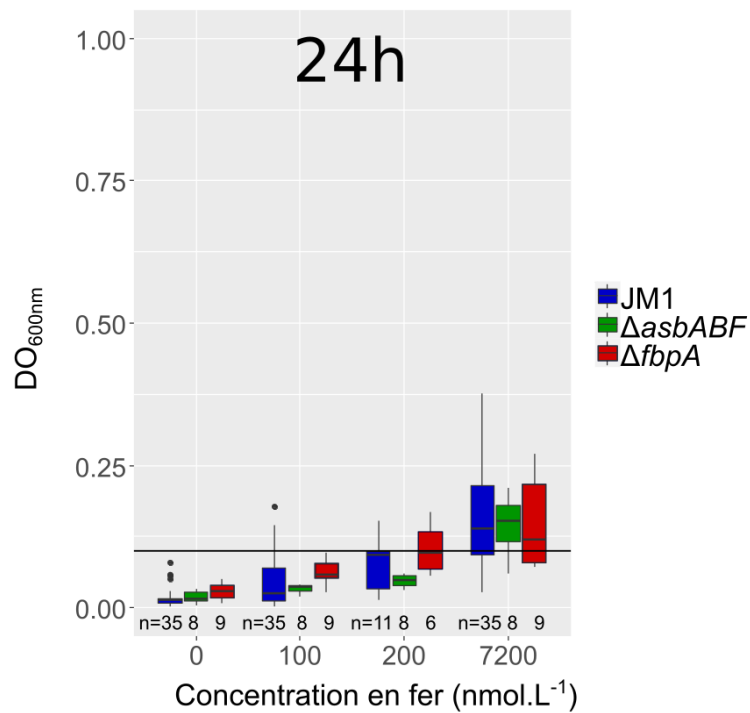
B



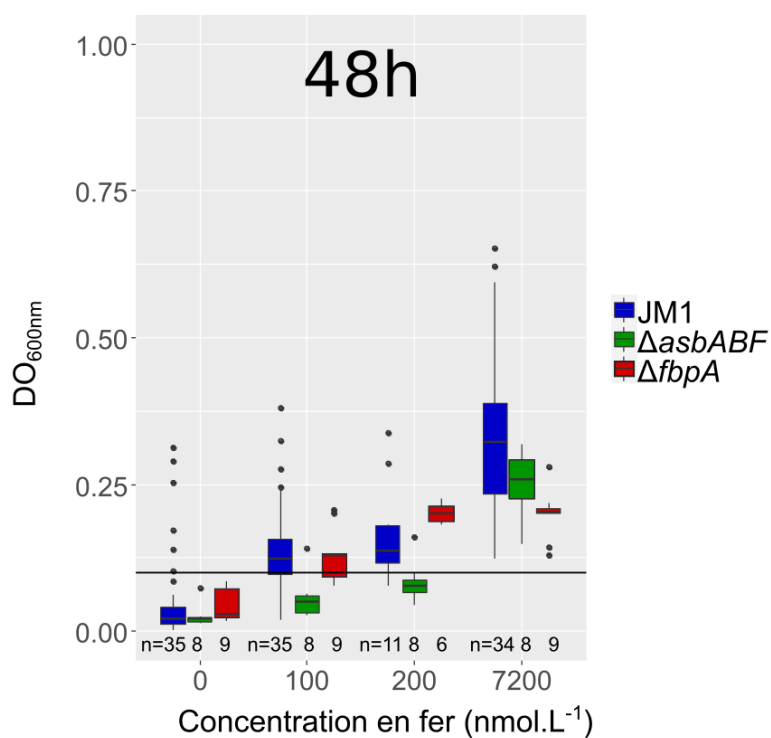
Annexe 5. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer sur acétate.

Les valeurs de biomasse après croissance planctonique sur acétate ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de répliqués est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

A



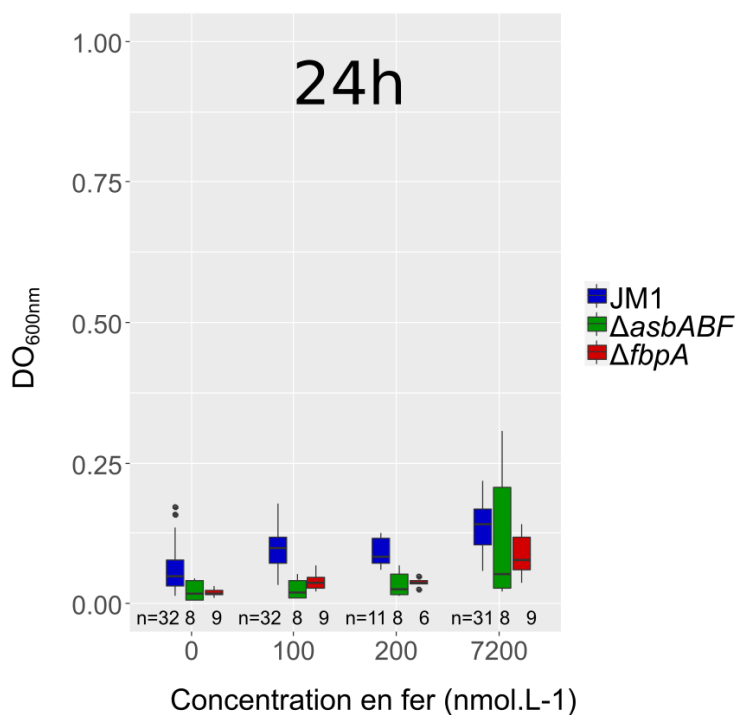
B



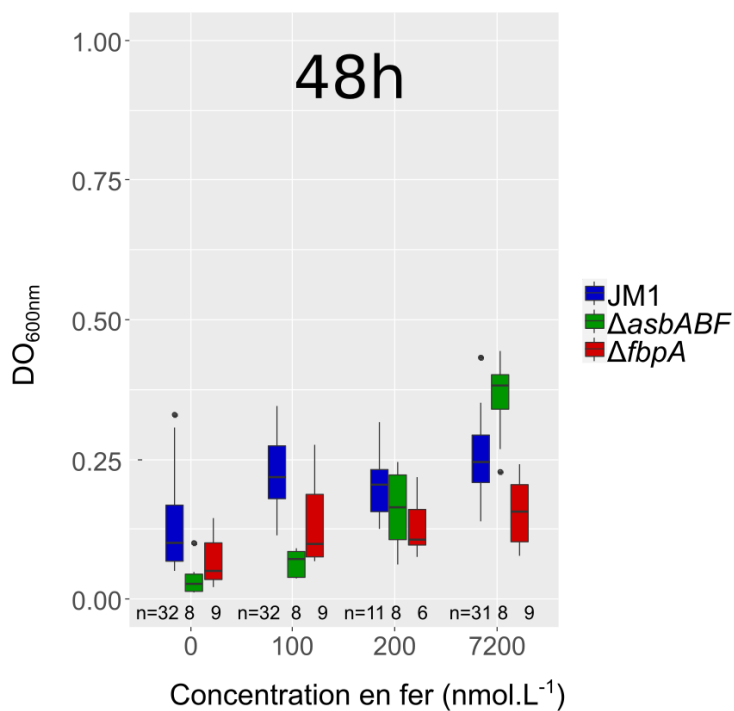
Annexe 6. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ sur paraffine.

Les valeurs de biomasse après croissance en biofilm sur paraffine ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de répliqués est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

A



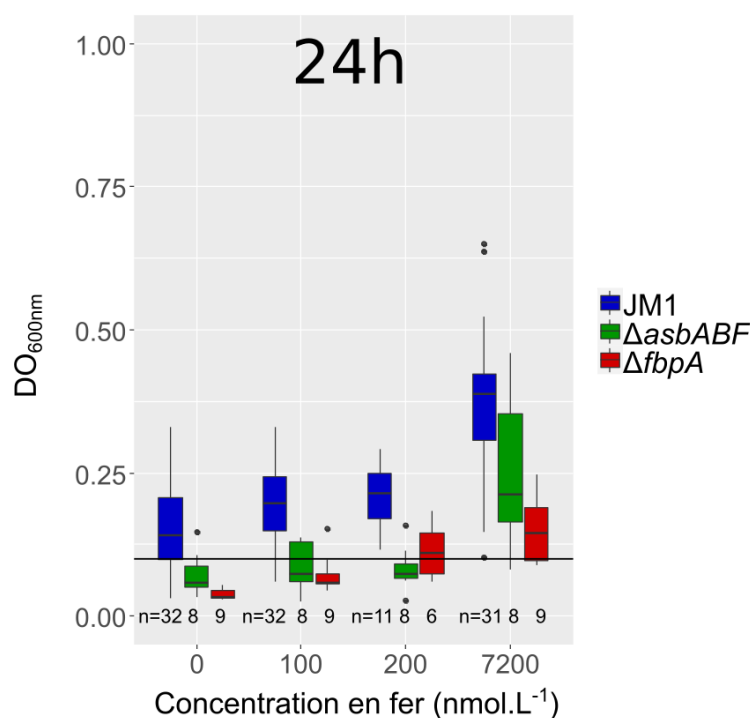
B



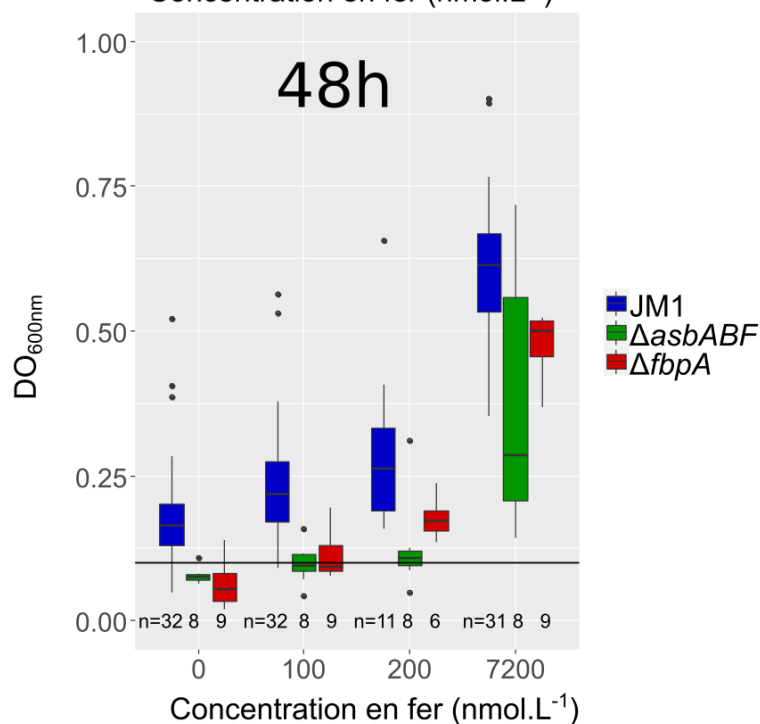
Annexe 7. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, $\Delta asbABF$ et $\Delta fbpA$ sur tristéarine.

Les valeurs de biomasse après croissance en biofilm sur tristéarine ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de réplicats est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

A



B



Annexe 8. Boxplots de la biomasse totale (fractions biofilm et planctonique) à 24h et 48h à différentes concentrations en fer de la souche sauvage, *ΔasbABF* et *ΔfbpA* sur acétate.

Les valeurs de biomasse après croissance planctonique sur acétate ont été mesurées à 24h (A) et 48h (B). La médiane est indiquée par une ligne noire et les valeurs aberrantes par des cercles noirs. La concentration en fer correspond à des valeurs théoriques ajoutées dans le milieu de culture. La ligne noire représente l'*inoculum* à une valeur de DO_{600nm} de 0,1. Le nombre de répliqués est indiqué pour chaque condition au-dessus de la concentration en fer et est indiqué par la lettre n.

Résumé

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants car il est présent dans des groupements prosthétiques de très nombreuses enzymes, notamment celles de la chaîne respiratoire. Les microorganismes marins doivent puiser le fer directement dans l'eau de mer, où sa concentration est particulièrement faible (inférieure à 1 nmol.L^{-1}) et où il est majoritairement lié à des molécules organiques. Le fer est donc peu disponible pour la croissance des microorganismes et par conséquent, il contrôle indirectement des activités microbiennes essentielles pour les cycles biogéochimiques d'éléments majeurs, tels que le carbone et l'azote. L'utilisation de sidérophores, molécules ayant une très forte affinité pour le fer, par les bactéries marines est reconnu depuis plusieurs années comme un moyen efficace de récupérer le fer peu disponible. En revanche, peu d'études se sont intéressées à l'effet de la limitation en fer sur la physiologie de la cellule selon son mode de croissance : planctonique, où les cellules sont libres, ou en biofilm, où les cellules adhèrent à un support.

Pour déterminer l'importance du fer sur le mode de vie, nous avons utilisé comme modèle *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, une bactérie marine hétérotrophe qui se développe sous forme planctonique lorsque la source de carbone est soluble, comme de l'acétate, ou sous forme de biofilm lorsque la source de carbone est insoluble, tels que des alcanes ou des triglycérides. Nous avons observé qu'une croissance planctonique nécessite plus de fer qu'une croissance en biofilm et qu'une croissance sur alcane nécessite plus de fer qu'une croissance sur triglycéride. Cette variabilité selon le mode de croissance et la source de carbone peut s'expliquer par des différences en besoins en fer et/ou dans l'efficacité de l'acquisition du fer.

Pour mesurer l'importance de la production de sidérophores et de la formation de biofilms, des techniques de génétiques et d'analyses chimiques ont été utilisées. Un standard du sidérophore produit par *M. hydrocarbonoclasticus*, la pétrobactine, a été obtenu. Il a permis de quantifier par spectrométrie de masse la pétrobactine produite dans le milieu de culture dans différentes conditions de croissance. Les résultats obtenus ont montré que le sidérophore est surproduit en faibles concentrations en fer, suggérant un rôle plus important dans ces conditions. Pour confirmer l'implication de la pétrobactine et comprendre quels sont les autres mécanismes d'acquisition du fer impliqués, des mutants de la voie de biosynthèse de la pétrobactine et du transport potentiel des ions Fe^{3+} ont été construits. Bien que l'étude des phénotypes de tous les simples et doubles mutants construits n'a pas pu être finalisée au cours de ce travail, les résultats obtenus suggèrent deux voies principales d'acquisition du fer, l'une dépendante de la pétrobactine et l'autre dépendante de la protéine périplasmique FbpA. La double mutation semblerait être létale mais l'étude du mutant conditionnel construit permettra de confirmer ces résultats et apportera également une meilleure compréhension des voies d'acquisition du fer impliquées dans les différents modes de croissance.

Abstract

Iron is an essential element for most living organisms because it is present in prosthetic groups of many enzymes, especially those of the respiratory chain. Marine microorganisms must extract iron directly from seawater, where its concentration is particularly low (less than 1 nmol.L^{-1}) and where it is mostly bound to organic molecules. The iron is consequently poorly available for the growth of microorganisms and therefore, it controls indirectly essential microbial activities for the biogeochemical cycles of major elements such as carbon and nitrogen for example. The use of siderophores, molecules with high affinity for iron, has been recognized for several years as an effective way for marine bacteria to recover poorly available iron. However, only few studies have focused on the effect of iron limitation on the physiology of the cell according to its mode of growth: planktonic, where the cells are free or in biofilm, where the cells adhere to a substrate.

To determine the importance of iron on the lifestyle of bacteria, we used as a model *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, a heterotrophic marine bacterium that grows as a planktonic population when the carbon source is soluble, like acetate, or as a biofilm when the carbon source is insoluble, such as alkanes or triglycerides. We observed that planktonic growth requires more iron than biofilm growth and that alkane growth requires more iron than triglyceride growth. This variability according to the growth mode and the carbon source can be explained by differences in iron requirements and/or in the efficiency of iron acquisition.

To measure the importance of siderophore production and biofilm formation, genetic and chemical analyses techniques were used. A standard of the siderophore produced by *M. hydrocarbonoclasticus*, the petrobactin, was obtained. It allowed to quantify by mass spectrometry the petrobactin in the extracellular medium under different growth conditions. The results obtained showed an overproduction of the siderophore at low iron concentration, suggesting a more important role in this condition. To confirm the petrobactin involvement and to understand what are the other mechanisms involved in iron acquisition, mutants of the biosynthesis pathway of petrobactin and of the potential transport of Fe^{3+} ions were constructed. Although the study of the phenotypes of all simple and double mutants constructed could not be completed during this work, the results obtained suggest the presence of two main iron acquisition pathways, one petrobactin dependent, and another dependent on the periplasmic protein FbpA. The double mutation seems to be lethal, but the study of the conditional mutant constructed will allow confirmation of these results and will give a better understanding of the iron acquisition pathways involved in the different growth modes.

ECOLE DOCTORALE :
Ecole Doctorale des Sciences Exactes et leurs Applications (ED 211 SEA)

LABORATOIRE :
Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux
(IPREM)

CONTACT
Kilian DUCOS
kducos1@univ-pau.fr