

# Thèse de M<sup>me</sup> Mélissa Hannauer soutenue le 5 octobre 2011

**Biotechnologie et signalisation cellulaire, CNRS-UMR 7242**

**Equipe « Transport membranaire bactérien »** Bourse MRT  
Directrice de thèse : Isabelle Schalk

Titre de la thèse : Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition du fer par la pyoverdine et le desferrichrome chez *Pseudomonas aeruginosa*

## Résumé

Le fer est un élément essentiel à la croissance de la plupart des organismes vivants. Malgré sa forte abondance au niveau de la croûte terrestre, le fer présente une faible biodisponibilité à pH physiologique. Afin de contourner ce problème, de nombreux micro-organismes produisent et sécrètent des sidérophores, de petites molécules ayant une forte affinité pour le fer. *Pseudomonas aeruginosa* produit en condition de carence en fer, deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline. Ces deux voies d'acquisition du fer impliquent de nombreuses protéines intervenant dans la biosynthèse des sidérophores, dans leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, dans l'acquisition du fer par les sidérophores et dans la régulation de l'ensemble de ces deux systèmes.

Durant cette thèse, nous avons étudié l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la Pvd néo-synthétisée. De précédentes études avaient déjà montré que cette pompe à efflux de type ATP intervenait dans le recyclage de la Pvd vers le milieu extracellulaire après dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasma bactérien. Par des approches de biologie moléculaire et cellulaire (microscopie à fluorescence et fractionnement cellulaire) et en utilisant les propriétés de fluorescence de la Pvd, nous avons pu montrer que cette pompe était aussi impliquée dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée. Tout en utilisant toujours la même approche, nous avons également pu mettre en évidence que cette pompe contrôle la sélectivité vis-à-vis du fer de la voie Pvd. En effet, la Pvd dans le milieu extracellulaire peut chélater de nombreux métaux autre que le fer. Nous avons montré par ICP-AES, que ces différents complexes Pvd-métaux peuvent être transportés à travers la membrane externe par le récepteur FpvA. Mais, tous les complexes Pvd-métaux autre que le complexe Pvd-Fe sont immédiatement réexcrétés par PvdRT-OpmQ. En absence de PvdRRT-OpmQ, tous les complexes Pvd-métaux incubés en présence de *P. aeruginosa* s'accumulent dans le périplasma de la bactérie

Nous avons également essayé de comprendre les mécanismes impliqués dans le transport du complexe Pvd-Fe à travers la membrane externe par FpvA, après formation du complexe ferrisidérophore dans le milieu extracellulaire. FpvA est composé de deux domaines : un tonneau beta composé de 22 brins et un domaine globulaire qui obture le pore du tonneau. Nous avons essayé de comprendre comment se forme un canal dans ce type de structure pour permettre le passage de Pvd-Fe. Pour cette étude, nous avons utilisé les propriétés de fluorescence de la Pvd ainsi que sa capacité à faire du FRET avec les tryptophanes des protéines. FpvA possède 17 Trps dans sa séquence, mais ils sont tous localisés dans le domaine en tonneau beta. Dans cette étude, nous avons inséré, par mutagenèse dirigée, des tryptophanes dans le bouchon du récepteur afin de suivre les interactions entre ce domaine et Pvd-Fe durant le transport.

Enfin, nous avons étudié l'acquisition du fer par le desferrichrome chez *P. aeruginosa*. Très peu de choses étaient connues au sujet de cette voie chez cette bactérie. Seul, le récepteur

présent au niveau de la membrane externe avait été identifié par des études protéomiques. En utilisant des mutants ponctuels issus de la collection de Washington, nous avons pu clairement identifier les transporteurs de la membrane externe et interne impliqués dans cette voie, ainsi qu'une enzyme intervenant dans la dissociation du complexe ferrichrome-fer dans le cytoplasme. Un analogue fluorescent du ferrichrome a aussi été utilisé afin d'effectuer toute les cinétiques de dissociation avec les outils de fluorescence couramment utilisés au laboratoire.