

Études structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif

RESUME

Le fer est un élément important de plusieurs métabolismes et fonctions physiologiques. Il possède la propriété de gagner ou de perdre facilement un électron, passant ainsi de la forme ferreuse (Fe^{2+}) à la forme ferrique (Fe^{3+}), et inversement. C'est cette propriété qui lui confère un rôle primordial dans les phénomènes d'oxydations et de réductions biologiques. Bien qu'il soit très abondant dans la croûte terrestre, le fer est très peu soluble en milieu aérobie et à pH physiologique et est de ce fait est très peu biodisponible. La concentration de Fe^{3+} libre dans l'environnement est d'environ 10^{-18} M, bien trop basse pour les bactéries pathogènes qui exigent une concentration de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} M pour établir et maintenir une infection. Pour contourner le problème de la faible disponibilité de fer, les bactéries ont développé différents mécanismes d'acquisition de ce métal. Le mécanisme le plus répandu implique la synthèse et la sécrétion des sidérophores, ayant une très forte affinité pour le Fe^{3+} . Après leur sécrétion, les sidérophores chélatent le Fe^{3+} dans le milieu extracellulaire et le transportent au travers de la membrane externe *via* les récepteurs TonB-dépendants (RTBDs). Les RTBDs sont également impliqués dans le transport d'autres molécules comme l'hème. Durant cette thèse nous nous sommes intéressés à l'étude structurale des RTBDs de différentes bactéries à Gram-négatif et aussi au devenir, au niveau du périplasme, de la ferri-pyoverdine, après son transport à travers la membrane externe *via* le RTBD FpvA chez *P. aeruginosa*.

Pour les **études structurales**, nous nous sommes intéressés à 4 RTBDs (ShuA, SuxA, FauA et FetA). Nous avons défini et optimisé un protocole de surexpression, de purification et de cristallisation pour les RTBDs. Le protocole mis en place est rapide, efficace et reproductible. Il nous a permis de purifier, de cristalliser rapidement et de collecter des données de diffraction pour 4 RTBDs. La structure de ShuA a ensuite été résolue à 2,6 Å, celle de FauA à 2,3 Å de résolution par le Dr D. Cobessi. Celle de FetA est actuellement en cours d'affinement à 3,2 Å.

Pour les **études fonctionnelles**, nous nous sommes intéressés à l'implication des gènes du cluster *fpvCDEFGHJK* dans l'acquisition du fer par la voie Pvd chez *P. aeruginosa*. Ce cluster est conservé chez toutes les espèces de *Pseudomonas* produisant la Pvd, il est organisé en 2 opérons, *fpvCDEF* et *fpvGHJK*, séparés par 32 paires de bases. Les résultats obtenus pendant cette thèse, suggèrent l'implication des protéines FpvCDEF dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . En effet, la mutation de ces gènes abolie complètement le transport du fer par la Pvd. Le phénotype sauvage a été restauré par l'addition du DTT, suggérant l'implication de ses protéines dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Nous avons également montré que la protéine FpvG est une protéine périplasmique dont l'expression est régulée par les niveaux de fer. Les études de spectrométrie de masse et de dosage des métaux ont montré que cette protéine était également capable de lier directement le fer. Enfin, l'étude des interactions protéine-protéine a montré une interaction entre les protéines FpvG et FpvA, confirmant l'implication de la protéine FpvG dans le transport du fer par la Pvd. FpvG serait probablement impliquée dans la prise en charge du fer dans le périplasme après sa dissociation de la Pvd et assurant ensuite son transport vers le cytoplasme *via* le transporteur ABC FpvHJ. L'ensemble de ces résultats a permis également de montrer que le transport du fer *via* la Pvd implique des mécanismes très différents de ceux qui sont décrits précédemment pour les sidérophores utilisés par *E. coli*.

Mots clés : fer, ferri-pyoverdine, RTBDs, études structurales, études fonctionnelles, *P. aeruginosa*

Ahmed MEKSEM

Directeur de thèse : Dr Isabelle SCHALK

Laboratoire « métaux et micro-organismes : chimie, biologie & applications »

Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg

École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg