

Résumé

En conditions de carence en fer, *P. aeruginosa* produit majoritairement un sidérophore fluorescent, la pyoverdine. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire, sécrétées par les bactéries dans le milieu extracellulaire et capables de chélater le fer ferrique avec une très forte affinité. Lorsque le complexe ferrisidérophore est formé, il est transporté dans la cellule bactérienne via des voies spécifiques d'assimilation.

La pyoverdine est constituée d'un peptide de huit acides aminés en partie cyclisé et d'un chromophore, qui confère à la molécule ses propriétés de fluorescence. La biosynthèse de la pyoverdine est réalisée par un mécanisme non ribosomique dans le cytoplasme et aboutit à la formation d'un précurseur peptidique non fluorescent.

Dans cette thèse, nous montrons que ce précurseur cytoplasmique non fluorescent est exporté dans le périplasma par le transporteur ABC PvdE. Par différentes techniques impliquant des fractionnements cellulaires et de la microscopie de fluorescence, nous montrons également que ce précurseur subit dans le périplasma plusieurs étapes de maturation, catalysées par les enzymes PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ. Cette étude a par ailleurs permis d'isoler et de caractériser un nouvel intermédiaire de synthèse. Dans ce travail, nous mettons également en évidence dans cette bactérie une accumulation de pyoverdine ou de son précurseur dans le périplasma, ceci se traduisant en microscopie de fluorescence par un anneau de fluorescence périplasmique.

Enfin, nous avons identifié la pompe d'efflux, PvdRT-OpmQ, responsable de la sécrétion de la pyoverdine du périplasma vers le milieu extracellulaire. Cette pompe est également impliquée dans le recyclage hors de la cellule de la pyoverdine ayant transporté du fer.

Summary

Under iron-limited conditions, *P. aeruginosa* produces majoritarily a fluorescent siderophore called pyoverdine. Siderophores are molecules of low molecular weight, secreted into the extracellular medium by the bacteria in order to get access to iron. Siderophores have a high affinity for ferric iron. Once the ferrisiderophore complexes formed they are transported back into the bacterial cells via specific assimilation pathways.

Pyoverdine is composed of a fluorescent chromophore linked to a partly cyclic octapeptide. Its biosynthesis involves non-ribosomal mechanisms taking place in the cytoplasm, and ends in the formation of a non-fluorescent peptidic precursor.

In this thesis, we have shown that this cytoplasmic non-fluorescent precursor is exported into the periplasm by the ABC PvdE transporter. Using cellular fractionation and fluorescence microscopy techniques, we have also shown that this precursor undergoes, in the periplasm, several stages of maturation, which are catalyzed by PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ enzymes. This work has also permitted to isolate and characterize a new intermediary of synthesis. Fluorescence microscopy allowed us to show that pyoverdine or pyoverdine precursor accumulate in the periplasm. This can be visualized on bacteria by a periplasmic fluorescent ring.

Finally, the efflux pump PvdRT-OpmQ involved in the secretion of pyoverdine from the periplasm to the extracellular medium has been identified. This pump is also involved in the recycling of pyoverdine having already transported iron into periplasm.