

Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg

Laboratoire de Biotechnologie et signalisation cellulaire, UMR 7242, Equipe « Transports membranaires bactériens »

300 Boulevard Sébastien Brant CS 10413
67412 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN
Responsable de l'équipe : Isabelle SCHALK, DR CNRS
Site web : <http://irebs.u-strasbg.fr>

Les compétences du laboratoire sont pluridisciplinaires, allant de la microbiologie à la synthèse organique, en passant par la biochimie des protéines et la biologie moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée). L'équipe a une reconnaissance internationale dans le domaine des sidérophores et une expertise dans la spectroscopie de fluorescence et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert).

Disciplines scientifiques : Microbiologie, Biochimie, Biologie moléculaire, Chimie Organique, Chimie inorganique

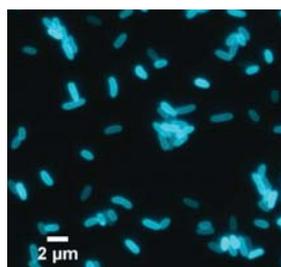
Mots clés : Métabolisme et transport des métaux dans les bactéries, sidérophores, métalloprotéines, protéines membranaires, techniques de bioremédiation

LES RECHERCHES MENÉES

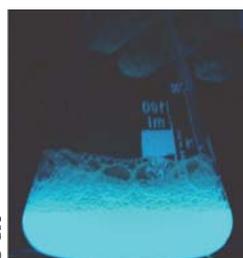
L'équipe « Transports membranaires bactériens » travaille sur 3 axes de recherche : 1) les mécanismes moléculaires du transport du fer chez *Pseudomonas aeruginosa*, 2) la synthèse d'antibiotiques ciblant les mécanismes de transport du fer de bactéries pathogènes et 3) le transport de métaux toxiques par les sidérophores et la dépollution biologique. Le troisième axe est impliqué dans le Réseau Alsace de Laboratoires en Ingénierie et Sciences pour l'Environnement (REALISE), en étroite relation avec le premier axe.

L'équipe s'intéresse à la chimie des sidérophores vis-à-vis des métaux, aux mécanismes d'interactions entre ces molécules et différents matériaux contenant des métaux potentiellement toxiques pour l'environnement. Les métaux peuvent être adsorbés sur des minéraux ou inclus dans ceux-ci au moment de la genèse des minéraux en présence de métaux. Ces études visent à mieux comprendre la mobilité des métaux dans les sols en présence de facteurs biologiques tels que les sidérophores pour, à termes, améliorer les possibilités d'utiliser ceux-ci comme outils de bioremédiation de sols et des effluents pollués par les métaux. Il est donc primordial de connaître la mobilité des métaux à partir des matériaux en fonction de la présence de sidérophores.

La bactérie modèle du laboratoire est *Pseudomonas aeruginosa*, qui synthétise deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline. Il existe plus d'une centaine de structures de pyoverdines. Pour chacun des complexes formés sidérophore-métal, les chercheurs déterminent ses possibilités d'être transporté et son mode d'assimilation dans la cellule bactérienne. Il existe une très grande diversité de sidérophores puisque plus de 500 molécules ont été décrites.



Observation en microscopie à fluorescence d'un *Pseudomonas* fluorescent, bactérie produisant le sidérophore pyoverdine.



Culture de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu carencé en fer après 48h d'incubation observée sous lumière UV. La pyoverdine est un pigment jaune-vert fluorescent qui est excrété dans le milieu extérieur.

La production de sidérophores

Le fer est un élément essentiel à la vie de tout organisme vivant. Bien que le fer soit un élément très abondant sur la terre, sa disponibilité pour les êtres vivants est très faible dans les milieux aérobies (contenant de l'oxygène). En effet, en présence d'oxygène, l'ion ferrique (Fe^{3+}) va former des hydroxydes ferriques insolubles. De ce fait, le fer devient un facteur limitant dans le développement des micro-organismes.

Pour s'affranchir de cette limite, les bactéries produisent de petites molécules de faibles poids moléculaires, les sidérophores (du grec *pherein* et *sideros* signifiant «porter le fer»). Ils ont une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+} . Les sidérophores vont complexer le fer sous forme d'ions Fe^{3+} , (désorption et solubilisation) au sein de l'environnement et former ainsi des complexes [sidérophores- Fe^{3+}] qui sont ensuite pris en charge dans des mécanismes de transport actifs vers la cellule.

Une fois dans la cellule, le complexe va se dissocier, et le fer ferrique Fe^{3+} est réduit en fer ferreux Fe^{2+} , essentiel au développement des bactéries. Ainsi, Fe^{2+} va pouvoir être utilisé par la cellule notamment pour le fonctionnement des enzymes et de la chaîne respiratoire. Le sidérophore dissocié du fer est alors recyclé vers le milieu extracellulaire par une pompe à efflux (mécanisme nécessitant de l'énergie qui permet le passage de molécules à travers la paroi bactérienne).

Le biofilm

Dans la nature, les bactéries vivent en majorité dans des colonies de surface appelées biofilm. Sa structure est hétérogène, souvent sous forme d'une matrice complexe extracellulaire, et composée de substances polymères (exopolysaccharides, ADN, protéines). Les sidérophores sont produits en son sein. Le biofilm constitue l'interaction «bactéries (sidérophores)-minéral» et est capable de piéger de nombreux métaux. Il protège les bactéries des métaux toxiques.

Il a été récemment montré au laboratoire, grâce aux propriétés de fluorescence des sidérophores, que le biofilm est capable de piéger de nombreux métaux tels que fer, nickel, plomb, cobalt, cadmium, zinc, aluminium, chrome, cuivre sous des formes ionisées, conduisant à l'immobilisation de ces éléments toxiques.

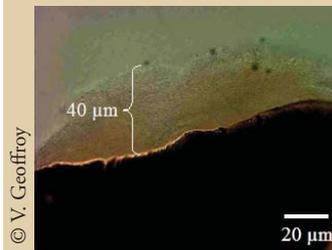


Photo de microscopie confocale par lumière transmise d'un biofilm de 40µm couvrant la surface du grain de mâchefer

Étude des sidérophores bactériens pour la détection et la quantification de métaux toxiques à l'état de traces

La chimie des sidérophores permet également de développer des outils environnementaux avec la synthèse de métallophores fluorescents. En effet, les sidérophores sont des molécules qui se caractérisent par une affinité extraordinaire pour le fer et des affinités moindres pour les autres métaux (zinc, cuivre et manganèse en particulier), mais toujours remarquables.

Ces métallophores fluorescents peuvent trouver des applications dans le domaine du diagnostic environnemental pour la détection et/ou le dosage (colorimétrique/fluorimétrique) des métaux toxiques.

Les sidérophores bactériens, des outils pour la dépollution *in situ* de sols contaminés par des métaux

Actuellement, les chercheurs s'attachent à élucider les mécanismes complexes régissant la mobilité des métaux immobilisés dans les sols et leur possible transfert vers les plantes au niveau de la rhizosphère (bien que des évidences montrent que les sidérophores et le biofilm sont impliqués dans le transfert et l'accumulation des métaux au niveau de la plante).

Les sidérophores représentent des molécules intéressantes pour mobiliser les métaux toxiques dans les sols. En effet, les données obtenues au laboratoire ainsi que dans la littérature indiquent que les sidérophores synthétisés par les micro-organismes modifient l'état et les formes chimiques des métaux du sol vers des formes qui pourraient être plus facilement et rapidement mobilisables par les plantes.

Le laboratoire a récemment montré que ces sidérophores sont également capables de complexer plus de 16 métaux toxiques tels que le cuivre, le cadmium ou le nickel. En présence de ces métaux toxiques, les bactéries produisent des quantités plus importantes de sidérophores, leur conférant un rôle protecteur pour la bactérie vis-à-vis des métaux en les séquestrant en dehors de la cellule bactérienne. Récemment, le laboratoire a montré que la pyoverdine est capable de solubiliser du cuivre dans un sol augmentant ainsi le rendement de phytoextraction. Par contre, la pyoverdine aurait plutôt un rôle de stabilisation en ce qui concerne le cadmium et le nickel. Les métaux se comportent donc différemment vis-à-vis des sidérophores.

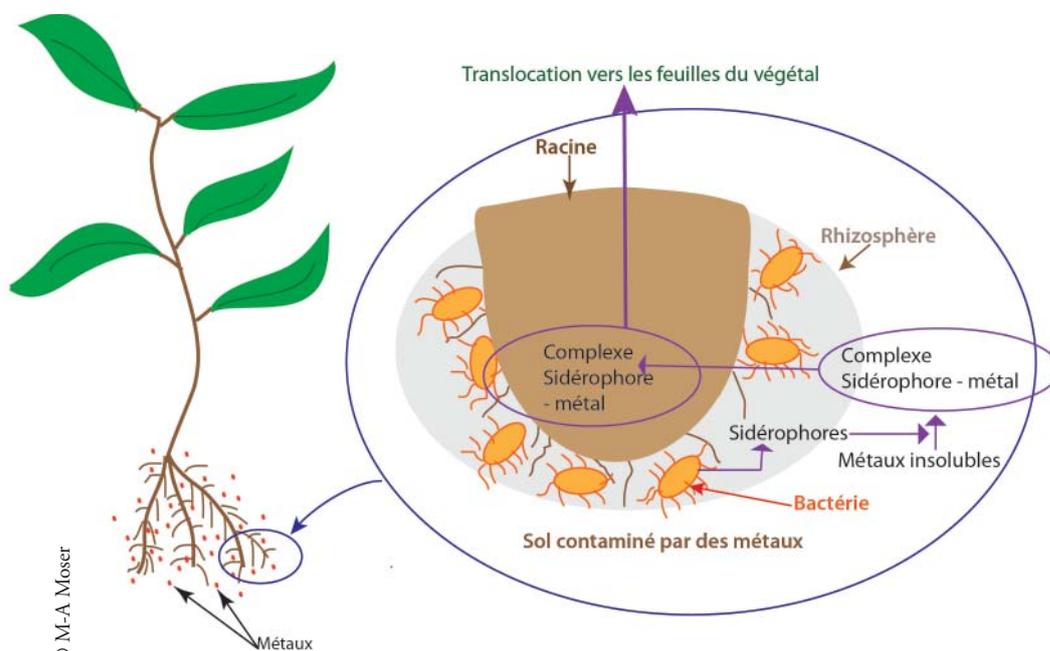
La bioremédiation

Accélération d'un processus métabolique naturel dans lequel les bactéries décomposent des molécules organiques en molécules plus simples ou transforment des molécules inorganiques par voie chimique (réduction, oxydation) vers des formes moins toxiques.

La rhizomédiation

Elle consiste à inoculer le sol avec certains micro-organismes d'intérêt et à cultiver des plantes hyperaccumulatrices de métaux. Dans le cadre de **phytoextraction bioaugmentée**, le rôle des bactéries est de produire des métabolites tels que les sidérophores qui vont augmenter la biodisponibilité des métaux dans la rhizosphère (voir schéma ci-dessous). Dans ce processus, la plante absorbe les métaux lourds par la racine et les accumule dans la partie aérienne (les tiges et les feuilles). On emploie souvent des plantes dites hyper-accumulatrices pour leur capacité à extraire un grand volume de polluants de leur environnement périphérique.

Les bactéries productrices de sidérophores sont également des cibles intéressantes en **phytostabilisation**. Cette technique consiste à utiliser des plantes pour réduire la mobilité de contaminants et empêcher leur migration dans le sol et vers les eaux souterraines et leur entrée dans la chaîne alimentaire.



Phytoextraction de métaux de sol contaminé

Métaux dans les sols adsorbés dans les minéraux, solubilisés par les sidérophores, incorporés dans les plantes par les racines

La rhizosphère est la zone entourant les racines de la plante et dans laquelle existent des relations complexes entre les micro-organismes du sol, la plante et le sol lui-même. Les racines et le biofilm associé peuvent profondément influencer la chimie du sol, y compris son pH et les transformations de l'azote.

Les micro-organismes produisent naturellement des sidérophores en quantité importante qui sont de puissants chélateurs d'ions métalliques, permettant à ceux-ci de rester en solution et de se déplacer dans la rhizosphère.



Expérience de phytoextraction au laboratoire :

croissance de plants de tomate en phytotron en présence de métaux toxiques et de sidérophores (ou de bactéries productrices de sidérophores)

Les sidérophores bactériens, des outils pour la bioremédiation d'effluents liquides contaminés par des métaux

Au sein de l'équipe, la possibilité d'utiliser les bactéries productrices de sidérophores dans de nouveaux procédés de bioremédiation des effluents liquides contaminés en métaux est envisagée. Dans ce contexte, l'utilisation de bactéries, surtout sous forme de biofilm, devrait permettre de concentrer les polluants dans la matière organique.

LES APPLICATIONS

REMEDICATION, DEPOLLUTION

- Détection et quantification de métaux toxiques à l'état de traces
- Dépollution de l'eau et des boues, sols et eaux pollués par des métaux

SOLS

- Dépollution des sols contaminés par des métaux toxiques : bioremédiation, phytoextraction associée à la bioaugmentation (ajout de micro-organismes d'intérêt), rhizomédiation

DECHETS

- Effluents liquides contaminés en métaux.
- Détermination de l'influence des micro-organismes sur l'altération de matériaux/minéraux : mâchefers résultant de l'incinération d'ordures ménagères utilisées en soubassements routiers, vitrifiats de mâchefer industriel, verres (silicates) utilisés dans le confinement de déchets chimiques ou nucléaires (Les bactéries peuvent utiliser ces silicates complexes comme sources d'oligoéléments).
- Valorisation de déchets minéraux

LES PRESTATIONS DU LABORATOIRE

Le laboratoire met à disposition des entreprises ses équipements et son personnel hautement qualifié pour effectuer différents types de prestations :

- purification de sidérophores (banque de 100 pyoverdines, pyochéline, cépabactine, cépaciachéline,...),
- purification de récepteurs de sidérophores,
- sidérotypage de souches de *Pseudomonas* (isoélectrophorèse et incorporation radioactive),
- synthèse de métallophores bioinspirés.

LES PARTENARIATS DU LABORATOIRE

Partenariats universitaires :

- Laboratoire de Chimie Moléculaire, Strasbourg, UMR 7509 CNRS-UdS, équipe de Chimie Bio(In)organique et Médicinale
- Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie de Strasbourg, UMR 7517 CNRS-UdS, équipes « Transferts Réactifs dans les Hydrosystèmes Anthropisés » et « Géochimie Isotopique et Chimie de l'Environnement »
- Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg, UMR 7178 LC4, CNRS-UdS, équipe de Radiochimie
- Equipe « Dépollution biologique des sols » de Colmar (UHA)
- Laboratoire « Sols et environnement » de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Nancy
- Ecole Nationale Supérieure de physique de Paris
- Ecole des Mines de Douai
- Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie de Banyuls
- Département de microbiologie fondamentale, Université de Lausanne
- Department of Biochemistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand

Participation à des programmes nationaux et européens : ADEME, CEMAGREF, French membrane college of membrane proteins Polymères, Membranes de Rouen, ANR, Projets européens

Collaboration avec un organisme lié à l'innovation : CRITT Rittmo, Colmar

Collaborations industrielles: SOMEZ (Société méditerranéenne des zéolithes), Montpellier, Groupe Kernéos (Lafarge Aluminates) et Sanofi

L'équipe « Transports membranaires bactériens » de l'École de Biotechnologie de Strasbourg

L'équipe « Transports membranaires bactériens » regroupe 3 chercheurs permanents et 3 ingénieurs. Elle fait partie de l'Institut de Recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg, unité mixte de recherche Université de Strasbourg et CNRS.

L'équipe fait partie du Réseau Alsace de Laboratoires en Ingénierie et Sciences pour l'Environnement (REALISE), partenaire du réseau des éco-entreprises