

Analyse du mode de biosynthèse de l'isopyoverdine, un sidérophore produit par *Pseudomonas putida* BTP1

Auteur : Obchette, Thibault

Promoteur(s) : Jacques, Philippe

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/13242>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**ANALYSE DU MODE DE BIOSYNTHESE DE
L'ISOPYOVERDINE, UN
SIDEROPHORE PRODUIT PAR *PSEUDOMONAS*
PUTIDA BTP1**

THIBAUT OBCHETTE

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIE**

ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021

(CO)-PROMOTEUR(S): PHILIPPE JACQUES

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

**ANALYSE DU MODE DE BIOSYNTHESE DE
L'ISOPYOVERDINE, UN
SIDEROPHORE PRODUIT PAR *PSEUDOMONAS*
PUTIDA BTP1**

THIBAUT OBCHETTE

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIE**

ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021

(CO)-PROMOTEUR(S): PHILIPPE JACQUES

Remerciements

En cette fin de ce travail de fin d'étude, je désire exprimer toutes ma gratitude aux personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord je voudrais remercier mon promoteur, Philippe Jacques, professeur de la faculté Agro-Bio Tech de Gembloux, de l'unité « Microbial Processes and Interactions » (MiPI), et Président du Centre de Recherche Terra (Teaching and Research Center), pour m'avoir suggéré de travailler sur ce sujet. Je le remercie pour ces conseils pour m'aider à m'améliorer et son enthousiasme lors des réunions effectuées tout au long de ces six mois. Je le remercie aussi de m'avoir écouté et rassuré quand ça n'allait pas tellement bien au début de ce TFE.

Je tiens ensuite à remercier, Félicie Goudot, doctorante à l'unité « Microbial Processes and Interactions », pour m'avoir énormément aidé au nouveau des manipulations, de l'interprétation des résultats. Merci aussi pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa motivation et de son implication dans cette thèse de master.

Je remercie également Sébastien Steels pour son aide précieuse au laboratoire pour que je puisse comprendre et effectuer les manipulations correctement en biologie moléculaire. Ainsi que sa bonne humeur tout le long des manipulations.

Je n'oublie pas le personnel de TERRA, les doctorants ainsi que les autres étudiants présent dans le laboratoire réalisant leur TFE pour l'ambiance de travail créée.

Pour finir, je ne peux oublier l'impact qu'a eu ma famille le long de ces six mois surtout au début où c'était énormément compliqué au vu des problèmes de santé que j'avais. Ils ont continué à me soutenir, à me motiver et m'encourager dans ce voyage.

Résumé

La pyoverdine est un sidérophore, molécule capable de chélater le fer, principalement produite par les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Récemment, le mécanisme de biosynthèse de ce chromopeptide a été entièrement décodé.

Ce travail est consacré à l'analyse du mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine produite par la bactérie *Pseudomonas putida* BTP1. Cette molécule diffère de la pyoverdine par la liaison de la chaîne peptidique au chromophore, celle-ci se trouve liée au carbone C3 du chromophore à la place du carbone C1 pour les pyoverdines.

Une analyse bio-informatique a été réalisée pour déterminer les différences entre les gènes impliqués dans la formation de l'isopyoverdine de *P. putida* BTP1 et de la pyoverdine chez d'autres souches. Cette analyse a montré notamment que le gène *pvdP* de BTP1, impliqué dans la maturation et la cyclisation du chromophore, possède un pourcentage d'identité assez faible quand il est comparé au même gène provenant de souches produisant de la pyoverdine. De plus, en étudiant la structure primaire, secondaire et tertiaire de l'enzyme PvdP, des différences notables sont apparues principalement dans le domaine N-terminal de la protéine. Sur la base des résultats obtenus, un mutant de BTP1 délété du gène *pvdP* susceptible d'être responsable de la synthèse d'une isopyoverdine à la place d'une pyoverdine a donc été construit. Ce mutant a ensuite été complété avec le même gène d'intérêt provenant soit de *P. putida* BTP1, soit d'une souche produisant de la pyoverdine. Des cinétiques de croissance microbienne et de production du sidérophore de ces différents mutants ont été réalisées sur trois milieux de culture différents. Les surnageants de culture ont été analysés par LC-QTOF-MS. Le surnageant du mutant délété du gène *pvdP* ne fluoresce plus du fait qu'il produit le précurseur de l'isopyoverdine, la ferribactine, ne possédant pas un chromophore mature synonyme de fluorescence. Le mutant complété par le gène *pvdP* de la souche *P. putida* BTP1 et de la souche *P. putida* KT2440 permet de faire réapparaître la fluorescence et de confirmer par analyse par LC-QTOF-MS la présence d'un pic correspondant au poids moléculaire de l'isopyoverdine produite par la souche sauvage de BTP1.

En conclusion, l'enzyme PvdP pourrait être responsable de la formation de l'isopyoverdine de BTP1. Une confirmation de cette hypothèse pourrait être établie en purifiant les sidérophores produits par les différentes souches mutantes et en comparant leur structure par résonance magnétique nucléaire, seule technique permettant de faire la différence entre une pyoverdine et une isopyoverdine.

Abstract

Pyoverdine is a siderophore, a molecule capable of chelating iron, mainly produced by bacteria belonging to the fluorescent *Pseudomonas* group. Recently, the biosynthetic mechanism of this chromopeptide has been fully decoded.

This work is devoted to the analysis of the biosynthetic mechanism of isopyoverdine produced by the bacterium *Pseudomonas putida* BTP1. This molecule differs from pyoverdine by the binding of the peptide chain to the chromophore, which is linked to the C3 carbon of the chromophore instead of the C1 carbon for pyoverdines.

A bioinformatics analysis was performed to determine the differences between the genes involved in the formation of isopyoverdine in *P. putida* BTP1 and pyoverdine in other strains. In particular, this analysis showed that the *pvdP* gene of BTP1, involved in the maturation and cyclisation of the chromophore, has a rather low percentage of identity when compared to the same gene from pyoverdine producing strains. Furthermore, when studying the primary, secondary and tertiary structure of the PvdP enzyme, notable differences appeared mainly in the N-terminal domain of the protein.

Based on the results obtained, a BTP1 mutant deleted from the *pvdP* gene that could be responsible for the synthesis of an isopyoverdine instead of a pyoverdine was constructed.

This mutant was then complemented with the same gene of interest from either *P. putida* BTP1 or a pyoverdine producing strain. Microbial growth and siderophore production kinetics of these different mutants were performed on three different culture media. The culture supernatants were analysed by LC-QTOF-MS. The supernatant of the *pvdP* gene-deleted mutant no longer fluoresces because it produces the isopyoverdine precursor, ferribactin, which does not possess a mature chromophore synonymous with fluorescence. The mutant complemented with the *pvdP* gene of *P. putida* BTP1 and *P. putida* KT2440 allows the fluorescence to reappear and to confirm by LC-QTOF-MS analysis the presence of a peak corresponding to the molecular weight of the isopyoverdine produced by the wild type BTP1 strain

In conclusion, the PvdP enzyme could be responsible for the formation of isopyoverdine from BTP1. A confirmation of this hypothesis could be established by purifying the siderophores produced by the different mutant strains and by comparing their structure by nuclear magnetic resonance, the only technique that can distinguish between a pyoverdine and an isopyoverdine.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Résumé	6
Abstract	6
Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
1. Contexte	15
2. Etat de l'art	15
2.1. Le fer en général	15
2.1.1. Propriétés physico-chimiques du fer	15
2.1.2. Propriétés biologiques du fer	15
2.1.3. Acquisition du fer	16
2.2. Pseudomonas	16
2.2.1. Informations générales	16
2.2.2. Application de <i>Pseudomonas</i>	17
2.2.3. Nomenclature	17
2.2.4. Caractéristique de culture	17
2.3. Sidérophore	18
2.3.1. Mécanisme d'action des sidérophores	18
2.3.2. Diversité structurale	19
2.3.3. Les sidérophores produits par <i>Pseudomonas</i>	20
2.4. (Iso)pyoverdine	20
2.4.1. Histoire	20
2.4.2. Structure générale	20
2.4.2.1. Chromophore	20
2.4.2.2. Chaîne peptidique	21
2.4.2.3. Chaîne secondaire	21
2.4.3. Fonctions	22
2.4.4. Isopyoverdine	22
2.5. Mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine	23
2.5.1. Introduction générale	23
2.5.2. Partie cytoplasmique	24
2.5.2.1. Mécanisme de formation du précurseur de la pyoverdine	25
2.5.3. Partie périplasme	27
2.5.4. Mécanisme d'export de la pyoverdine	31
2.5.5. Régulation de la production de pyoverdine	31

3. Objectifs	32
4. Matériels et méthodes	33
4.1. Milieux de culture, solutions et gel d'agarose	33
4.1.1. Milieu CasaminoAcids (CAA)	33
4.1.2. Milieu Lysogeny Broth (LB)	33
4.1.3. Milieu King B (KB)	33
4.1.4. Milieu Succinate	33
4.1.5. Préparation de solution X-Gal et IPTG	34
4.1.5.1. Préparation d'une solution 20mg/ml de X-Gal :	34
4.1.5.2. Préparation d'une solution d'IPTG (100mM)	34
4.1.5.3. Préparation d'une solution de MOPS (3-(n-morpholino)propanesulfonic acid) glycérol	34
4.1.6. Gel d'agarose 1%	34
4.2. Mutagénèse	35
4.2.1. Création du mutant BTP1 $\Delta pvdP$	35
4.2.1.1. Extraction de l'ADN de <i>Pseudomonas putida</i> BTP1 et des plasmides	37
4.2.1.2. PCR des fragments Up et Down	38
4.2.1.3. Overlap PCR	39
4.2.1.4. Digestion par enzymes de restriction	40
4.2.1.5. Ligation	41
4.2.1.6. Transformation des cellules chimio-compétente par choc thermique	42
4.2.1.6.1. Préparation des cellules compétentes	42
4.2.1.6.2. Transformation des cellules compétentes	42
4.2.1.7. Conjugaison	42
4.2.1.8. Transformation par électroporation	43
4.2.2. Complémentation génétique	43
4.2.3. Séquençage	45
4.2.4. Suivi de la croissance cellulaire et de la production de isopyoverdine au cours du temps	45
4.2.4.1. Tecan Spark ^R	45
4.2.4.2. Culture en fioles	45
4.2.4.3. LC-Q-TOF-MS	46
5. Résultats et discussion	47
5.1. Partie bio-informatique	47
5.1.1. Comparaison du génome de la souche <i>Pseudomonas putida</i> BTP1 avec différentes souches de pseudomonas	47
5.1.2. Structure de la tyrosinase PvdP de <i>Pseudomonas putida</i> BTP1	49
5.1.2.1. Structure primaire	50
5.1.2.2. Structure secondaire	51
5.1.2.3. Acides aminés importants dans la structure de la tyrosinase PvdP	52
5.1.3. Analyse des chaînes peptidiques de (iso)pyoverdines produites par <i>Pseudomonas</i>	53
5.1.3.1. Chaîne peptidique de <i>Pseudomonas putida</i> BTP1	54
5.2. Partie mutagénèse	56

5.2.1.	Délétion du gène <i>pvdP</i> de la souche <i>Pseudomonas putida</i> BTP1	56
5.2.1.1.	Construction du plasmide pEMG-overlap	56
5.2.1.2.	Transformation dans <i>Pseudomonas putida</i> BTP1	57
5.2.2.	Complémentation du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ avec le gène <i>pvdP</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	59
5.2.2.1.	Choix de la souche pour réaliser la complémentation	59
5.2.2.2.	Construction du plasmide pME6010 – overlap	59
5.3.	<i>Cinétique de croissance et de production de pyoverdine/isopyoverdine et spectre d'absorbance</i>	61
5.3.1.	Cinétique de croissance microbienne de BTP1 et des mutants dans différents milieux	61
5.3.1.1.	Milieu CAA	61
5.3.1.2.	Milieu CAA + EDTA	64
5.3.2.	Spectre d'absorption	65
6.	<i>Conclusion et perspectives</i>	66
7.	<i>Références</i>	68
8.	<i>Annexes</i>	76

Liste des figures

Figure n°1 - Mécanisme d'action des sidérophores en tant que chélateurs d'ions ferriques Fe³⁺.

Figure n°2 - Structures chélatantes présentes chez les sidérophores^[74]

Figure n°3 - Représentation de la structure du chromophore de la pyoverdine^[15]

Figure n°4 - Représentation du chromophore de la pyoverdine (gauche) et de l'isopyoverdine (droite)^[3]

Figure n°5 - Représentation schématique de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1

Figure n°6 - Représentation schématique de la biosynthèse de la pyoverdine produite par *Pseudomonas fluorescens* A506^[4]. La ferribactine acylée est synthétisée dans le cytoplasme par différentes NRPS et des enzymes auxiliaires modifiant les acides aminés de la chaîne peptidique (bas de la figure). Elle est ensuite exportée dans le périplasme par la protéine PvdE pour être déacylée par l'enzyme PvdQ et devenir la ferribactine. Cette dernière va subir des réactions de maturation catalysées par PvdP et PvdO pour former le chromophore mature de la pyoverdine. De plus, des enzymes participent à la modification de la chaîne secondaire transformant l'acide L-glutamique en succinamide (PvdN) ou en α -ketoglutarate (PtaA). La pyoverdine est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire par différents systèmes de transport pour chélater les ions ferriques^[4]

Figure n°7 - Réaction d'adénylation catalysée par le domaine A des NRPS^[50]

Figure n°8 - Fonction du domaine de condensation des NRPS

Figure n°9 - Représentation des réactions intervenant dans la maturation du chromophore. A = structure de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* A506. B = réaction de condensation de l'acide aminé L-Dab avec le groupement carbonyle de la L-Tyrosine pour former le cycle tétrahydropyrimidine de la ferribactine. C = réaction de maturation pour obtenir le chromophore mature de la pyoverdine^[4]

Figure n°10 - Réaction catalysant la formation d'une ortho-quinone à partir d'un monophénol

Figure n°11 - Modélisation du site actif de l'enzyme PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1^[34]. Les 6 histidines représentées en jaune sont impliquées dans la liaison avec le cuivre.

Figure n°12 - Voies métaboliques périplasmiques pour la formation de la chaîne secondaire latérale des pyoverdines. PvdN catalyse la formation du résidu succinamide à partir de l'acide glutamique tandis que PtaA catalyse la formation du résidu α -ketoglutarate. Une troisième enzyme catalyse la formation du résidu malamide à partir de l'acide glutamique ou du succinamide mais elle reste encore inconnue^[4]

Figure n°13 - Représentation schématique des voies de régulations de la pyoverdine en réponse à un déficit en fer^[4]

Figure n°14 - Schéma représentant le procédé d'obtention du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$.

Figure n°15 - Principe de fonctionnement de la PCR overlap. Deux réactions PCR sont réalisées en amont pour amplifier le fragment Up et Down possédant une région homologe chacun grâce aux amorces utilisés. Ces régions homologues vont s'hybrider entre elles lors de

la PCR overlap. Le produit final de la PCR overlap est de 1,8kb. Encadré rouge = codon start de *pvdP* et encadré violet = codon stop de *pvdP*.

Figure n°16 - Représentation schématique de la stratégie de complémentation génétique du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$

Figure n°17 – Représentation schématique de l’overlap PCR. Deux PCR sont réalisées en amont pour amplifier le gène *pvdP* de *Pseudomonas putida* KT2440 et le promoteur pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry. Le produit final est de 1776 pb. Région verte = région homologue obtenus grâce aux amorces utilisées ; région rouge = site de restriction Sac-1

Figure n°18 - Phylogramme représentant les relations de parentés entre les différentes souches de *Pseudomonas*.

Figure n°19 - Représentation de la prédiction de la structure secondaire du domaine C-terminal de *Pseudomonas putida* BTP1 (haut) et de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (bas)

Figure n°20 - Représentation de la prédiction de la structure secondaire du domaine N-terminal de *Pseudomonas putida* BTP1 (haut) et de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (bas)

Figure n°21 – Représentation de la structure générale de la tyrosinase PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Partie jaune = domaine N-terminal. Partie bleue = domaine C-terminal

Figure n°22 – Migration sur gel d’agarose 1% des amplifications par PCR overlap de la cassette de substitution avec ajout des amorces après 15 cycles ; L’encadré rouge correspond à l’amplicon overlap ayant une taille de 1,8kb. Les amorces utilisées sont: Up *pvdP* F Bam-H1/Dwn *pvdP* R Bam-H1. MT= marqueur de taille

Figure n°23 – Migration sur gel d’agarose 1% des amplifications par PCR sur colonies de la cassette de résistance à la kanamycine. Les amplicons ont une taille de 800 paires de base. Les amorces utilisées sont: nptIIF/nptIIR. Les chiffres 1 à 6 correspondent aux colonies obtenues après conjugaison. MT = marqueur de taille.

Figure n°24 – Migration sur gel d’agarose 1% des amplifications par PCR sur colonies pour confirmer la délétion du gène *pvdP*. Les chiffres 1 à 8 correspondent aux transformants obtenus après électroporation. Les amplicons ont une taille d’approximativement 1,1kb excepté pour le transformant 6 et la souche sauvage de *Pseudomonas putida* BTP1 qui ont une taille d’environ 2,6-2,7kb. La différence de taille entre les transformants (excepté le 6) et la souche sauvage est dû à la perte du gène *pvdP* qui fait 1,5-1,6kb. Les amorces utilisées sont : Seq *pvdP* F et Dwn *pvdP* R Bam-H1. MT = marqueur de taille.

Figure n°25 – Image obtenue sous lumière UV de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (gauche) et *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (droite)

Figure n°26 – Migration sur gel d’agarose 1% de l’amplification par PCR de l’overlap (encadré rouge) avec ajout des amorces après 15 cycles et du gène *pvdP* de KT2440. Les amplicons ont une taille de 1,8kb et 1,6 kb respectivement. Les amorces utilisées sont : pTac F/*pvdP* KT2440 R Sac1 pour l’overlap et *pvdP* KT2440 F/*pvdP* KT2440 R Sac1 pour le gène *pvdP* de KT2440. MT = marqueur de taille.

Figure n°27 – Migration sur gel d’agarose 1% de l’amplification par PCR sur colonies du gène *pvdP*. Les chiffres 1 à 5 correspondent aux transformants obtenus après transformation dans *E.coli* DH5 α . Les amplicons ont une taille de 1,6 kb. Les amorces utilisées sont : *pvdP* KT2440 F/*pvdP* KT2440 R Sac1. Le contrôle négatif est le plasmide pME6010 sans l’overlap. MT= marqueur de taille

Figure n°28 – Image obtenue sous lumière UV de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (haut à gauche), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (haut à droite), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (haut au milieu) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (bas au milieu)

Figure n°29 – Courbes de croissance microbienne (DO_{600nm}) sur milieu CAA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

Figure n°30 - Courbes de production d'(iso)pyoverdine sous flasque sur milieu CAA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

Figure n°31 – Résultats du LC-Q-TOF-MS vis-à-vis du sidérophore et de la ferribactine obtenu après culture de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage, de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$, de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} sur milieu CAA durant 24 heures

Figure n°32 – Courbes de croissance microbienne (DO_{600nm}) sur milieu CAA avec ajout de EDTA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

Figure n°33 - Courbes de production d'(iso)pyoverdine sous flasque sur milieu CAA avec ajout de EDTA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

Figure n°34 – Spectre d'absorption (300nm à 700nm) du surnageant de culture sur milieu CAA (24 heures) de la souche *Pseudomonas putida* BTP1 (bleu), du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange) et des deux mutants complémentés (gris et jaune) obtenu après centrifugation et ajustement à pH7.

Liste des tableaux

Tableau n°1 - Composition milieu CAA

Tableau n°2 - Composition milieu LB

Tableau n°3 - Composition milieu KB

Tableau n°4 – Composition milieu succinate

Tableau n°5 – Composition solution MOPS

Tableau n°6 - Souches bactériennes utilisées dans ce travail

Tableau n°7 - Plasmides utilisés dans ce travail

Tableau n°8 - Amorces utilisées dans ce travail. **Gras** = site de restriction

Tableau n°9 - Composition et volume (μL) pour réaliser une PCR

Tableau n°10 - Programme PCR utilisé pour l'enzyme Q5

Tableau n°11 - Composition et volume nécessaire pour digérer l'overlap et le plasmide pEMG

Tableau n°12 - Composition et volume nécessaire pour réaliser la ligation

Tableau n°13 – Protocole d'élution de la méthode d'analyse du sidérophore par UPLC-Q-TOF MS

Tableau n°14 - Paramètres Q-TOF MS

Tableau n°15 - Liste des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'(iso)pyoverdine et leurs fonctions

Tableau n°16 - Résultats obtenus par BLAST en alignant le génome de *Pseudomonas putida* BTP1 avec une séquence primaire d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la pyoverdine provenant d'une autre souche de *Pseudomonas*.

Tableau n°17 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issue de l'alignement multiple de différentes séquences primaires de PvdP

Tableau n°18 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issue de l'alignement multiple de séquence primaire du domaine tyrosinase à l'extrémité C-terminale de différentes PvdP

Tableau n°19 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issu de l'alignement multiple de séquence primaire du domaine barillet β à l'extrémité N-terminale de différentes PvdP

Tableau n°20 - Acides aminés décrits dans l'article Poppe et al. (2018) ayant une importance dans la structure de la tyrosinase PvdP

Tableau n°21 – Acides aminés composant la chaîne peptidique de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1

Tableau n°22 - Comparaison de la chaîne peptidique de *Pseudomonas putida* BTP1 avec les chaînes peptidiques provenant d'autres souches produisant de l'(iso)pyoverdine en utilisant l'algorithme MCFS. **Gras** = souche produisant de l'isopyoverdine ; surligné = souches présentes de la collection du MiPI ; * = pas d'information sur les épimérisations

1. Contexte

Dans les années 1990, des chercheurs de l'université Gembloux Agro Bio-Tech en collaboration avec l'Université de Cologne ont été les premiers à découvrir une forme structurale un peu particulière de la pyoverdine, un sidérophore capable de chélater le fer, qui fut nommée isopyoverdine. Cette dernière étant produite par la souche *Pseudomonas putida* BTP1^[3].

A l'époque les connaissances sur le mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine étaient encore peu connues mais ces dernières années une équipe de recherche allemande a décrypté ce mécanisme en se basant sur la pyoverdine produite par *Pseudomonas fluorescens* A506^[4]. Cela a permis d'identifier le rôle des principaux gènes impliqués dans la formation de cette molécule.

Ces nouvelles découvertes ont donné un regain d'intérêt vis-à-vis de l'isopyoverdine. Récemment, le laboratoire MiPI a pu séquencer le génome de la souche *Pseudomonas putida* BTP1 permettant de pouvoir analyser et comparer ce génome à ceux des autres espèces de *Pseudomonas*.

De plus, dans le cadre d'une thèse de doctorat réalisée au laboratoire sur les propriétés de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1. Il a été découvert, en analysant des échantillons de production, une nouvelle forme mineure d'isopyoverdine possédant une chaîne glutamate acétylée lorsque la souche est cultivée en milieu succinate.

Le but de ce travail de fin d'étude est de développer une approche de biologie synthétique pour décrypter le mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine.

2. Etat de l'art

2.1. Le fer en général

2.1.1. Propriétés physico-chimiques du fer

Le fer est un élément chimique métallique possédant un nombre de charge de 26. Il fait partie des métaux de transition signifiant qu'il possède une sous-couche électronique « d » incomplète^[29]. Il s'agit d'un métal malléable pouvant être modelé sans être fondu.

De par sa structure électronique, le fer est considéré comme un élément très réactif qui peut subir des changements au niveau de son état d'oxydation. Il possède trois degrés d'oxydation : Fe, Fe²⁺ et Fe³⁺^[1,8,11,29], il peut donc échanger et acquérir des électrons lui permettant de passer d'une forme à l'autre^[12].

2.1.2. Propriétés biologiques du fer

Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur Terre (4^{ème} élément et second métal). Il est considéré comme un nutriment essentiel dans le développement des organismes vivants allant des bactéries à l'homme, principalement dû à la réactivité chimique de ce dernier^[1,8,11-13,23,26,29].

Le fer joue un rôle important dans de nombreux processus métaboliques comme la photosynthèse, la respiration, la régulation des gènes, le transport et le métabolisme de l'oxygène ou la synthèse d'hormone^[8,12-13,23,29]. Le fer est aussi l'un des constituants de certaines enzymes et prend donc part à des nombreuses activités enzymatiques et la régulation

de la biosynthèse de différentes molécules telles que des sidérophores, des vitamines, certaines toxines, ...^[65]. Il est souvent incorporé sous forme d'hème (catalase, peroxydase, cytochromes) ou sous forme de cluster fer-soufre^[8,13,29].

Néanmoins, malgré sa forte abondance dans les sols, le fer est peu disponible pour les micro-organismes et les plantes car il est sous forme d'oxyde de fer ou précipite sous forme de minéraux secondaires faiblement solubles^[11,29]. L'indisponibilité du fer s'explique par le fait que les oxydes de fer possèdent une très faible constante de solubilité (10^{-39}). De plus, à pH neutre et dans des sols aérés, la concentration en fer biodisponible vaut 10^{-17} M, ce qui est très faible pour subvenir aux besoins des organismes vivants^[1,15,29]. Dans des environnements de nature biologique tels que le lait ou le sang, cette indisponibilité peut être dû aux fortes liaisons du fer sur certaines protéines (lactoferrine, ferritine, transferrine)^[8,11,13,15-16,20,23,26,33,35]. Cette indisponibilité engendre un impact sur la croissance des plantes (chlorose ferriques) et des micro-organismes (mortalité).

Pour une croissance optimale, la concentration en fer dans les sols doit être comprise entre 10^{-4} et 10^{-9} M pour les végétaux et 10^{-5} et 10^{-7} M pour les micro-organismes^[1,66].

2.1.3. Acquisition du fer

Pour contrer la déficience en fer biodisponible dans l'environnement dû à une concentration en ion ferrique trop basse, les micro-organismes, notamment les hétérotrophes aérobies présents dans la rhizosphère, ont développés différentes stratégies d'acquisition du fer^[1,4,8,11-13,26,29,34,35]:

- Synthétiser des sidérophores extracellulaires permettant de chélater le fer ferrique dû à leur haute affinité pour ce dernier.
- Utiliser les sidérophores non produit par l'organisme lui-même.
- Absorber des molécules d'hèmes contenant le fer.
- Utiliser la réduction extracellulaire de l'ion ferrique insoluble en ion ferreux très soluble permettant la diffusion à travers la membrane des bactéries gram négatives.

2.2. *Pseudomonas*

Le sol renferme une grande diversité de micro-organismes au niveau de la rhizosphère. Ces bactéries apportent des fonctions variées qui vont avoir un impact sur la croissance et développement des plantes. On y retrouve plusieurs genres comme *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, ou *Rhizobium sp.*

Ces bactéries suscitent un intérêt scientifique comme alternative aux fertilisants chimiques car elles permettent d'apporter des nutriments aux plantes de par les composés qu'elles synthétisent, permettant de garantir un bon rendement des cultures. Elles sont donc considérées comme des biofertilisants naturels.

2.2.1. Informations générales

Etymologiquement, le mot *Pseudomonas* provient du grec pseudo (= 'simili' ou 'imitation') et monas (= 'unité') désignant les « germes ». Les *Pseudomonas* sont des bactéries gram-négatives, largement répandues dans la nature (eau, sol, hôte, ...). Les *Pseudomonas* typiques sont retrouvées soit sous forme planctonique soit dans un biofilm, attaché à une surface ou un substrat. Il existe une centaine d'espèces de *Pseudomonas* recensées. Elles ont pour caractéristiques morphologiques d'être assez fines, en forme de bâtonnet et non sporulantes. Ces bactéries sont fortement mobiles dû à la présence de flagelles polaires. Les

Pseudomonas sont réputées aérobies strictes même s'il peut y avoir une croissance en condition anaérobie en présence d'une source de nitrate. De plus, elles sont oxydases positives^[1,6,14-15,21,24-25,27,29,32].

Les *Pseudomonas* joue un rôle dans le biocontrôle des maladies des plantes grâce à leurs productions d'antibiotiques, de sidérophores et de lipopeptides cycliques^[67,83]. Elles sont caractérisées par un système d'acquisition performant du fer. En effet, quand les *Pseudomonas* sont dans un milieu déficient en fer, elles produisent des sidérophores primaires (pyoverdines) et secondaires (pyochéline) afin de l'acquérir^[1,3,68].

2.2.2. Application de *Pseudomonas*

Certaines espèces de *Pseudomonas putida* et *fluorescens* sont capables de stimuler la croissance des plantes. Ces bactéries colonisent les racines des plantes et améliorent leurs rendements. La présence de *Pseudomonas* permet l'élimination de micro-organismes ayant un impact négatif sur les plantes. Cela se fait par la production de substance inhibitrice de la croissance de ces derniers ou de sidérophore possédant une forte affinité pour le fer le rendant ainsi indisponible pour d'autres organismes pathogènes^[15,83].

Néanmoins certaines souches de *Pseudomonas* sont nuisibles pour les végétaux car elles produisent des composés toxiques impactant leur croissance^[15].

Pseudomonas putida est aussi capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques présent dans les déchets industriels et ménagers. De plus, elles produisent de nombreuses substances possédant des applications industrielles comme des rhamnolipides, des terpénoïdes, des polyketides, des peptides non ribosomiques et des métabolites secondaires dérivé d'acide aminé^[15,27].

2.2.3. Nomenclature

Les *Pseudomonas* sont souvent séparés en deux groupes sur base de la fluorescence^[1,4,14-15] :

- Les *Pseudomonas* du groupe fluorescent : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossidica*, *P. simiae*, *P. syringae*.
- Les *Pseudomonas* du groupe non fluorescent : *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*.

Le premier groupe contenant les *Pseudomonas* fluorescents peut encore être divisé en fonction du type d'hôte qu'elles contaminent. Elles peuvent être pathogènes opportunistes vis-à-vis des animaux (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*), cela signifie que le micro-organisme ne cause pas de dégât à l'hôte en temps normal mais peut provoquer des maladies lorsque l'immunité de ce dernier est faible. Tandis que d'autres sont phytopathogènes (*P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. cichorii*)^[1,10,14-15,21,39].

2.2.4. Caractéristique de culture

Les souches de *Pseudomonas* ont la capacité de croître dans des milieux ne possédant qu'une seule source de carbone comme source d'énergie et en présence de nitrate ou d'ammonium comme source d'azote^[2].

La température optimale de croissance des *Pseudomonas* est aux alentours des 28°C. Néanmoins, certaines espèces sont capables de croître à des températures plus faible (4°C) et

peuvent donc être considérées comme psychotropes. L'inverse existe aussi, où certaines espèces se développent à des températures plus élevées (45°C)^[2,6].

2.3. Sidérophore

Afin de survivre dans un environnement pauvre en fer, les bactéries se sont adaptées et mises à produire des molécules appelées sidérophores. Ces molécules ont pour but d'acquérir le fer à partir de formes insolubles contenant du fer ferrique et donc d'éviter des effets nuisibles sur le métabolisme des organismes vivants^[16,41]. Ces molécules sont capables de complexer le fer provenant d'autres complexes ainsi que le fer lié à des enzymes.

Etymologiquement, le mot sidérophore signifie « porteur de fer » (sidéros = fer, phore = porteur)^[29,65]. Un sidérophore est une molécule produite par des micro-organismes, procaryotes ou eucaryotes, dont la plupart sont aérobiques ou anaérobiques facultatif, pour chélater le fer présent dans le milieu dans des conditions de stress ferrique^[3,15,18,23,37,39]. Leur principale fonction est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique insoluble pour réussir à l'assimiler^[8,65]. L'ion Fe^{3+} est chélaté par le sidérophore selon la denticité de ce dernier. La denticité correspond au nombre d'atome d'un ligand capable de se lier à un métal dans un complexe. Dans le cas d'un sidérophore, s'il est bidenté, la stabilité du complexe sera moindre que s'il est hexadenté^[13]. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire (500 à 2500 Da) qui servent de transporteurs d'ion ferrique dans la cellule microbienne^[5,8,29]. Ils possèdent une très forte affinité et sélectivité pour les ions ferriques^[8,12].

2.3.1. Mécanisme d'action des sidérophores

Le mécanisme de chélation du fer ferrique par les sidérophores est séparé en trois étapes (*Figure n°1*). D'abord, les sidérophores synthétisés par les organismes vivants sont excrétés dans le milieu extracellulaire. Ensuite, ils vont complexer les ions ferriques présent dans le sol grâce à leurs ligands. Les complexes sidérophores- Fe^{3+} ainsi formés vont être assimilés par les cellules microbiennes grâce à des transporteurs spécifiques se trouvant à la surface de leur membrane. Chez les bactéries gram-négatives, le transport est réalisé par une force protomotrice au niveau de la membrane cytoplasmique à travers un complexe comprenant trois protéines: TonB, ExbB et ExbD^[26]. Tandis que chez les bactéries gram-positives, des protéines de liaison aux sidérophores, des perméases et des ATPases sont impliqués dans le transport du complexe sidérophore- Fe^{3+} dans la membrane cellulaire^[65]. Au sein de la bactérie, le fer va être détaché généralement du sidérophore par réduction du fer ferrique en fer ferreux ainsi qu'une modification du sidérophore pour que son affinité pour le fer soit moindre^[12,24]. Après libération du fer, les sidérophores sont soit dégradés, soit recyclés par excrétion dans le milieu extracellulaire via une pompe à efflux^[65].

La fonction principale des sidérophores est de chélater le fer pour le rendre disponible pour le micro-organisme afin d'assurer sa croissance. Néanmoins, ils possèdent d'autres applications dans différents domaines comme celui de l'écologie microbienne en favorisant la croissance de communauté microbienne non cultivable en laboratoire ou de l'agriculture en favorisant la croissance des plantes. Le fer est, en effet, un métal important pour la synthèse des chlorophylles, pour les réactions redox et d'autres activités physiologiques. Les sidérophores sont aussi utilisés comme agent de biocontrôle contre certains phytopathogènes. Dans le domaine de la médecine, les sidérophores sont exploités contre les bactéries qui sont résistantes aux antibiotiques ainsi que dans le traitement de certaines maladies humaines (ex: malaria, cancer, ...)^[65].

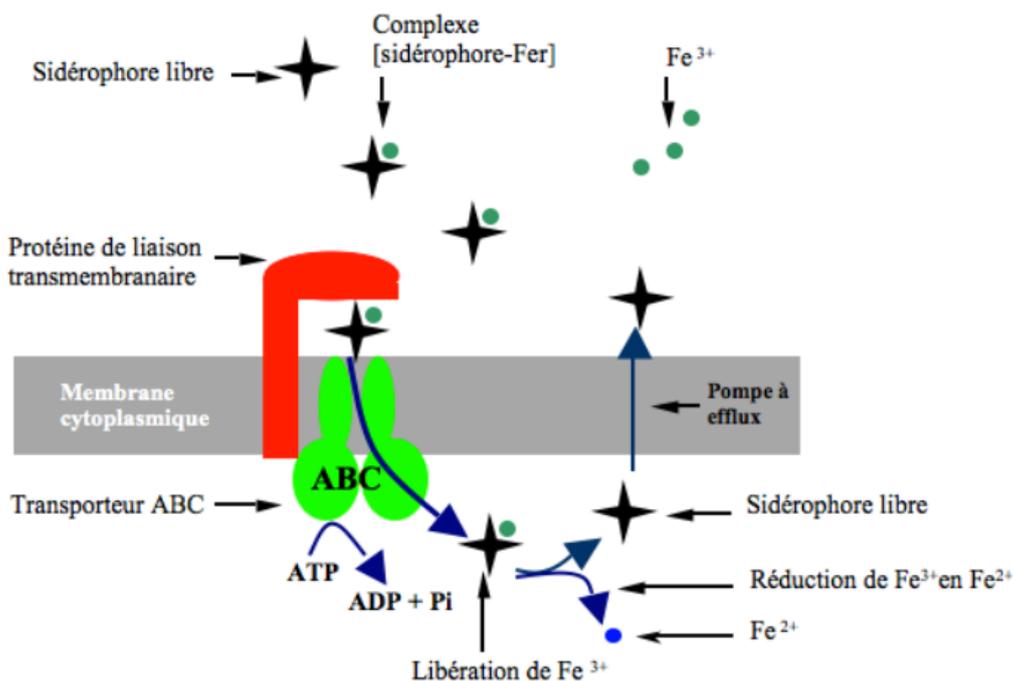


Figure n°1 - Mécanisme d'action des sidérophores en tant que chélateurs d'ions ferriques Fe^{3+} .

2.3.2. Diversité structurale

Il existe une très grande diversité de sidérophore connu à ce jour possédant des structures différentes. Plus de 500 sidérophores microbiens ont été identifiés dont une certaine correspondant à des pyoverdines. Les sidérophores sont classés en différentes catégories (Figure n°2) en fonction de la nature chimique des ligands du Fe^{3+} ^[8,12,29,53,65]:

- Les catécholates permettent de fournir deux atomes d'oxygènes pour la chélation du fer. Il existe certains sidérophores dans ce groupe comme l'entérochéline produite par des bactéries comme *Escherichia coli* qui possède une très forte constante de liaison pour l'ion ferrique ($10^{52}M^{-1}$).
- Les hydroxymates constituent le groupe le plus commun de sidérophores trouvés dans la nature. Les sidérophores de ce groupe possèdent des constantes de liaison pour le fer ferrique variant de 10^{22} à $10^{32}M^{-1}$. Cette forte liaison permet de protéger le complexe sidérophore- Fe^{3+} contre l'hydrolyse et la dégradation enzymatique pouvant se produire dans l'environnement.
- Les carboxylates, groupe de sidérophores produit principalement par les bactéries de type *Rhizobium* et *Staphylococcus* ainsi que certains champignons. Dans ce cas, la liaison avec le fer ferrique se fait par l'intermédiaire des groupes carboxyles et hydroxyles.

La prédominance des atomes d'oxygènes dans les groupes chélatants des sidérophores entraîne une meilleure affinité pour le fer ferrique que le fer ferreux^[8].

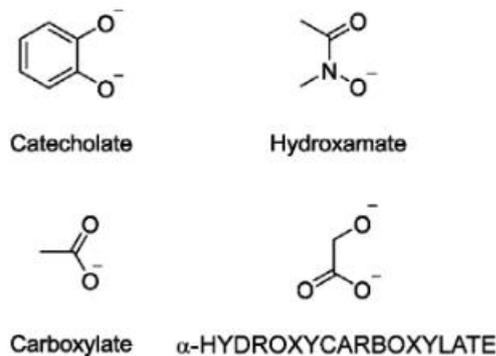


Figure n°2 - Structures chélatantes présentes chez les sidérophores^[74]

2.3.3. Les sidérophores produits par *Pseudomonas*

Il existe plusieurs types de sidérophores produit par les *Pseudomonas* fluorescents : pyoverdines, pseudobactine, pyochéline même si ce dernier n'est pas pigmenté (il n'a donc pas de spectre d'absorption dans la région visible) et semble avoir une plus faible efficacité à piéger le fer^[2-3,5,9,15,39,55-56].

2.4. (Iso)pyoverdine

2.4.1. Histoire

Au 19^{ème} siècle a été découvert un pigment jaune-vert fluorescent produit par les *Pseudomonas* fluorescents. Ce pigment a d'abord été nommé « fluorescéine ». En 1942, Turfрейer propose un autre nom pour cette molécule, « pyoverdine », en se référant à un autre pigment, la pyocyanine, lui-même produit par une espèce de *Pseudomonas*. Un siècle après la découverte de ce pigment, une équipe a pu mettre en évidence une corrélation entre la fluorescence de ce pigment et la concentration en fer présent dans le milieu, plus elle est faible plus la production de pyoverdine et l'apparition de fluorescence est forte. Tandis que la synthèse de la pyoverdine est réprimée lorsque les conditions environnementales ne présentent aucun stress ferrique. Mais le rôle de la pyoverdine dans l'acquisition du fer a seulement été décrit au cours de l'année 1978 par Meyer et al. La première structure de la pyoverdine a été établie début des années 1980 en utilisant la cristallographie. Depuis, d'autres structures chimiques des pyoverdines ont été soumises par divers groupes de recherche en utilisant des techniques comme la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire. De plus, il a été démontré que lorsque le fer est chélaté à la pyoverdine, il y a une perte de fluorescence. Une apo-pyoverdine présente la fluorescence jaune-vert tandis que la ferripyoverdine présente une couleur brun foncé^[1,4-5,8,22,24,29].

2.4.2. Structure générale

Depuis leur découverte, une centaine de pyoverdine ont été recensées et identifiées. Toutes sont composées de trois parties : un chromophore commun à toutes les pyoverdines, une chaîne peptidique spécifiques à chaque souches de *Pseudomonas* et une chaîne secondaire liée au chromophore^[1-2,9,14,18-19,22,24-26,31,33,38].

2.4.2.1. Chromophore

Le chromophore est responsable de la fluorescence de la pyoverdine lorsque cette dernière n'est pas lié au fer. Il est dérivé d'un 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoléine. Il est

présent chez toutes les espèces et souches de *Pseudomonas* et à la capacité de lier le fer ferrique par sa fonction catéchole (Figure n°3)^[1,4,20,24,29].

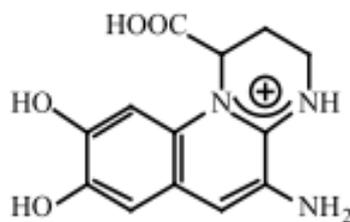


Figure n°3 - Représentation de la structure du chromophore de la pyoverdine^[15]

2.4.2.2. Chaîne peptidique

La partie peptidique est liée au groupe carboxyle du chromophore par son extrémité N-terminal. Cette chaîne est composée de 6 à 14 acides aminés et peut être sous forme linéaire ou cyclique (entièrement ou partiellement). Elle interagit avec les ions Fe^{3+} par le biais de deux fonctions: la fonction hydroxamate et/ou la fonction alpha-hydroxycarboxylate d'acides aminés particuliers. Cette fraction peptidique est importante car elle est unique pour chaque souche de *Pseudomonas* d'un point de vue composition et longueur. Cela permet de faciliter la reconnaissance par les récepteurs membranaires de par le type d'acide aminé présent dans la chaîne. Cette chaîne est liée au chromophore par une liaison amide entre l'acide aminé à l'extrémité N-terminale et l'acide carboxylique porté par le C1 du chromophore ou C3 pour les isopyoverdines^[1,4,8,15,20,22,24,29,37].

La plupart des acides aminés entrant dans la composition de la chaîne peptidique sont polaires (Ser, Lys, Thr, Asp, Orn, ...) afin d'assurer une interaction avec les récepteurs et de pouvoir être soluble dans l'eau. Des acides aminés aliphatiques (Gly, Ala et Val) sont aussi présents mais de manière plus restreintes tandis que les acides aminés aromatiques et sulfurés ne sont généralement pas présents dans la chaîne peptidique malgré quelques exceptions. De plus, il est aussi possible d'observer chez certains types de pyoverdines, des acides aminés non protéinogéniques (l'acide diamino-butérique (Dab)). Enfin, les acides aminés peuvent aussi subir une isomérisation pour former des acides aminés de configuration D^[1,4,8,15].

Ce squelette peptidique est assemblé avec l'aide des synthétases peptidiques non ribosomiques (NonRibosomal Peptide Synthetase ou NRPS) et modifié par des enzymes accessoires dans le cytoplasme et dans le périplasme^[18,21,41].

2.4.2.3. Chaîne secondaire

La chaîne secondaire est une petite chaîne acyle latérale correspondant à un dérivé d'acide dicarboxylique et est liée au niveau du chromophore par une liaison amide avec le groupement NH_2 porté par le chromophore au niveau du carbone C5. Cette chaîne est dérivée du cycle de l'acide citrique/cycle de Krebs. Selon les souches et les conditions de croissance, cette chaîne peut être représentée sous forme succinate, succinamide, malate, malamide, α -kétoglutarate ou glutamate. Cette chaîne ne contribue ni à la chélation du fer ni à son transport et n'a pas de fonction chimique connue. Néanmoins, elle joue un rôle lors de la biosynthèse de la pyoverdine^[1,4,22,24,26,29].

2.4.3. Fonctions

La synthèse des pyoverdines est fortement liée à la privation de fer dans le milieu. Leur fonction principale est de chélater les ions ferriques et de les fournir à la cellule productrice sous forme ferreuse après internalisation. Les pyoverdines possèdent une plus grande affinité pour le fer ferrique que le fer ferreux et forme un complexe avec le fer ferrique beaucoup plus stable (constante de stabilité $K_a = 10^{31}M^{-1}$) contrairement au fer ferreux (constante de stabilité $K_a = 10^9M^{-1}$). De plus, outre le fer, les pyoverdines sont également capable de chélater d'autres cations métalliques : aluminium, manganèse, chrome et d'autres encore^[1-2,4,8-9,37].

Les pyoverdines participent à la virulence en prélevant le fer sur des structures telles que l'hémoglobine pour le développement de *Pseudomonas* dans le corps humain^[1,8-9,16-17,33,39,57].

Les pyoverdines sont considérées comme des agents de biocontrôle impliqués dans les processus végétaux. Elles sont capables de supprimer les micro-organismes nuisibles aux plantes tout en permettant la croissance de la plante en apportant du fer dont la biodisponibilité dans la rhizosphère est faible. Cependant, les pyoverdines peuvent aussi contribuer à la formation de biofilm chez les pathogènes en leur procurant du fer^[17].

Des études ont aussi démontrés que la capacité des pyoverdines à chélater les métaux peut susciter une intérêt dans l'élimination des métaux toxiques présents dans les déchets^[1,8,54].

2.4.4. Isopyoverdine

La souche BTP1 est une souche de l'espèce *Pseudomonas putida*. Cette souche à la particularité de ne produire qu'un seul type de sidérophore, la pyoverdine. Cette pyoverdine sous sa forme non chélatée possède une masse moléculaire de 1076 Da. Sa formule moléculaire est $C_{44}H_{60}N_{12}O_{20}$.

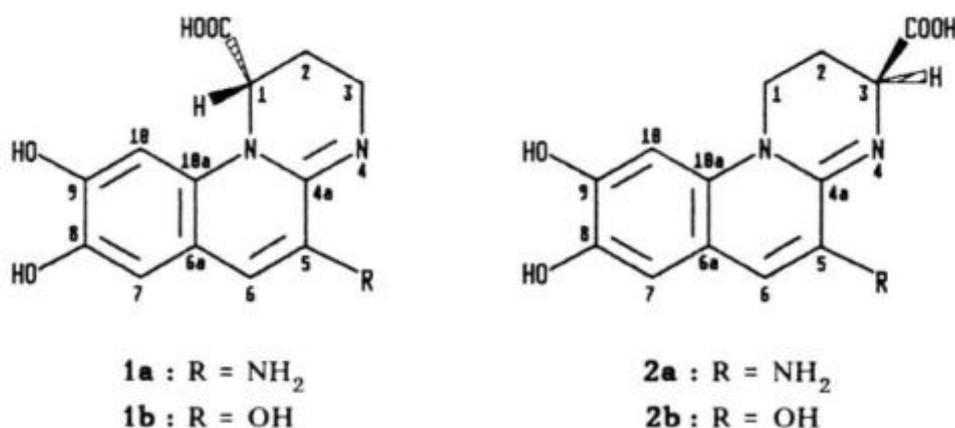


Figure n°4 - Représentation du chromophore de la pyoverdine (gauche) et de l'isopyoverdine (droite)^[3]

La particularité de la pyoverdine produite par la souche BTP1 contrairement aux autres souche *Pseudomonas* est liée à son chromophore. En effet, la chaîne peptidique est liée en position C3 plutôt qu'en position C1 (Figure n°4). Cette pyoverdine particulière produite par BTP1 est appelée isopyoverdine (Figure n°5)^[3]. Sa chaîne peptidique est composé de 6 acides

aminés dont un étant apolaire (L-Ala). Une particularité de cette isopyoverdine est qu'elle est produite sous une forme unique avec un acide glutamique comme chaîne secondaire.

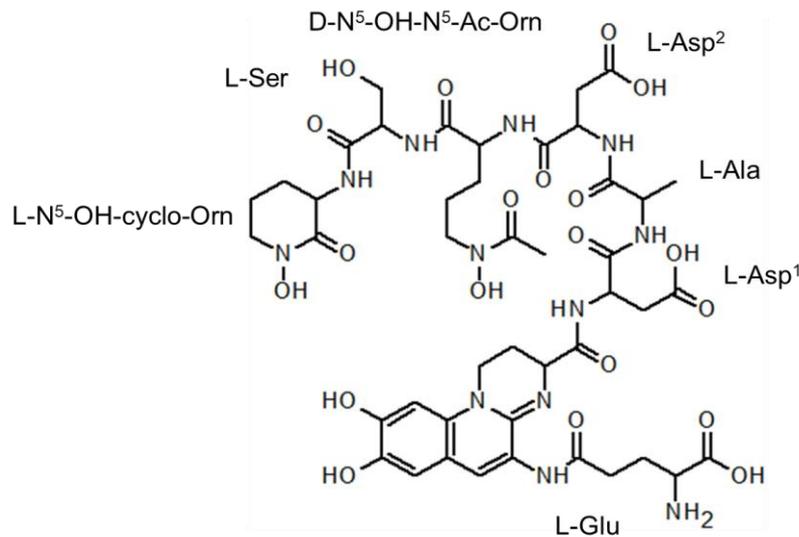


Figure n°5 – Représentation de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1

La position de la chaîne peptidique de l'isopyoverdine lui confère certaines propriétés. D'abord, l'incapacité des autres souches de *Pseudomonas* de prélever les ferripyoverdines de BTP1, cela s'explique par une très faible reconnaissance au niveau des récepteurs des autres souches. Inversement, la souche BTP1 est capable de prélever les ferripyoverdines produites par des autres souches par la présence de multiples récepteurs au niveau de sa membrane externe^[3,31].

Ensuite, l'isopyoverdine de BTP1 a une plus grande affinité pour les ions ferriques que les pyoverdines. Cela s'explique par une constante de stabilité des ferri-isopyoverdines plus élevée. Cette constante à pH neutre est de 10^{27} pour les complexes Fe^{3+} -isopyoverdines de BTP1 contre 10^{26} pour d'autres complexes Fe^{3+} -pyoverdines. De plus, les complexes de BTP1 ont une plus faible cinétique de décomplexation que les complexes formés par les pyoverdines^[31].

2.5. Mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine

2.5.1. Introduction générale

Le schéma général du mécanisme de la biosynthèse de la pyoverdine a été décodé et décrit dans sa quasi-totalité par une équipe allemande^[4].

Cette biosynthèse englobe une voie complexe de synthèse de peptide non ribosomique, s'effectuant dans le cytoplasme, produisant un précurseur peptidique. Tandis que des enzymes périplasmiques vont convertir ce précurseur en un chromopeptide final, mature, la pyoverdine. Ce fût à travers plusieurs travaux de recherche que les rôles de ces enzymes, intervenant de la biosynthèse de la pyoverdine, ont pu être identifiés^[33]. Lorsque que la pyoverdine est synthétisée, elle est excrétée vers l'environnement externe par une pompe à efflux^[8,22]

Pour décrire le mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine, le cas de la pyoverdine produite par la souche *Pseudomonas fluorescens* A506 a été choisi (Figure n°6).

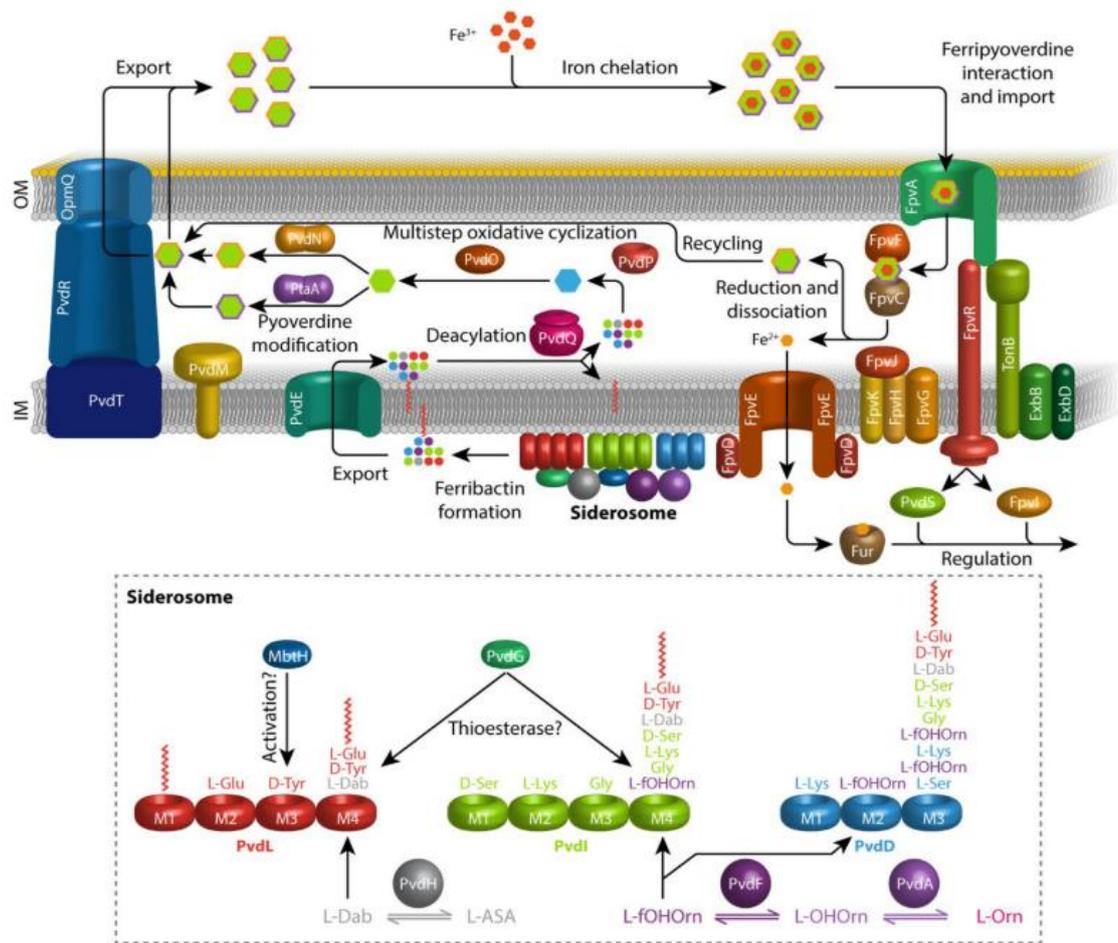


Figure n°6 - Représentation schématique de la biosynthèse de la pyoverdine produite par *Pseudomonas fluorescens* A506^[4]. La ferribactine acylée est synthétisée dans le cytoplasme par différentes NRPS et des enzymes auxiliaires modifiant les acides aminés de la chaîne peptidique (bas de la figure). Elle est ensuite exportée dans le périplasma par la protéine PvdE pour être déacylée par l'enzyme PvdQ et devenir la ferribactine. Cette dernière va subir des réactions de maturation catalysées par PvdP et PvdO pour former le chromophore mature de la pyoverdine. De plus, des enzymes participent à la modification de la chaîne secondaire transformant l'acide L-glutamique en succinamide (PvdN) ou en α -ketoglutarate (PtaA). La pyoverdine est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire par différents systèmes de transport pour chélater les ions ferriques.

2.5.2. Partie cytoplasmique

Les gènes responsables de la biosynthèse de la pyoverdine se situent sur le locus *pvd*^[1]. Le gène *pvdS* code pour une protéine, PvdS, un facteur sigma alternatif nécessaire pour l'expression de tous les autres gènes *pvd*^[18,38]. La biosynthèse débute dans le cytoplasme où des enzymes de synthèse de peptides non ribosomiques (NRPS) permettent la création du précurseur de la pyoverdine à savoir la ferribactine.

Les synthétases peptidiques non ribosomiques sont des grandes enzymes multi-modulaires qui effectuent la formation de peptides non ribosomiques (non synthétisés par des ribosomes). Cette voie a été découverte en 1971 par Lipmann et al. qui démontrent la synthèse de la gramicidine S, un peptide antibiotique, par *Bacillus brevis*^[49]. Les NRPS sont codées par plusieurs gènes structurés en opéron au niveau du génome. Elles ajoutent des acides aminés spécifiques, un par module, à un peptide en formation dont la taille est variable.

Le peptide est toujours synthétisé dans une direction allant du N-terminal vers le C-terminal^[4,8,22,24-25,29].

Il a été démontré que les NRPS participent à la biosynthèse de métabolites secondaires comme les pigments, les toxines ou encore les sidérophores chez différentes espèces bactériennes^[13,23].

Chaque module de base NRPS possède des domaines principaux : adénylation, thiolation et condensation et des domaines secondaires facultatifs agissant spécifiquement sur un acide aminé^[4,13,18,24].

Le domaine d'adénylation permet de sélectionner et d'activer un acide aminé. La sélection de l'acide aminé est spécifique à la composition du site de fixation du substrat^[51]. L'acide aminé sélectionné réagit avec l'ATP, en présence de magnésium, pour former un aminoacyladénylate et un pyrophosphate (PPi) (*Figure n°7*)^[13,18-19,23-25,50].

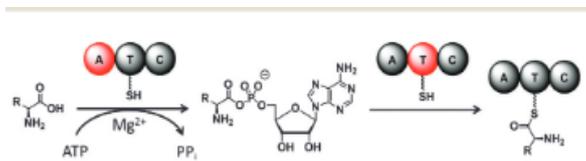


Figure n°7 - Réaction d'adénylation catalysée par le domaine A des NRPS^[50]

Le domaine de thiolation ou PCP (peptidyl carrier protein) fixe l'acide aminé, préalablement activé par le domaine adénylation, de manière covalente par un lien thioester^[4,18,23-25,29].

Le domaine de condensation catalyse le transfert d'un acide aminé sur le module adjacent en aval pour former une liaison peptidique (*Figure n°8*). Ce domaine est situé au début de chaque module excepté pour le premier module qui initie la synthèse de peptide^[18,23,25,29]. Il existe un domaine de condensation particulier, le domaine C starter, qui intervient dans la liaison entre un acide gras et un acide aminé. Ce type de domaine de condensation est souvent présent dans le premier module^[24].

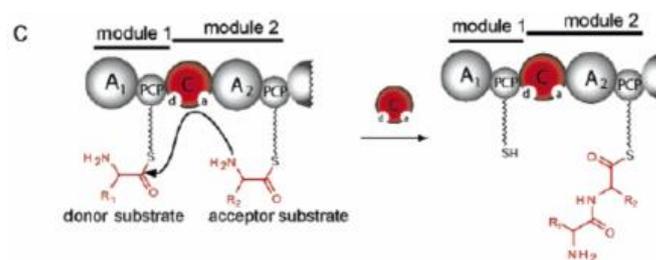


Figure n°8 - Fonction du domaine de condensation des NRPS

Le domaine thioestérase est le dernier module de la synthétase, il libère le peptide formé par hydrolyse en clivant la liaison thioester et intervient, le cas échéant, dans la cyclisation du peptide^[18,23-24,29].

2.5.2.1. Mécanisme de formation du précurseur de la pyoverdine

Les gènes intervenant dans la formation de la ferribactine sont communément appelés *pvdL*, *pvdI*, *pvdJ* et *pvdD*. Ces gènes codent pour des NRPS. Ces synthétases cytoplasmiques

synthétisent à la fois le squelette du chromophore et la fraction peptidique de la pyoverdine^[22,26,33]

Le premier gène à intervenir dans la formation du sidérophore est le gène *pvdL*. Ce gène possède une particularité en comparaison avec les autres NRPS identifiées, celle de ne pas posséder le domaine de condensation initial au niveau de son premier module. C'est sur base de cette particularité qu'il a été suggéré que le gène *pvdL* est le premier à intervenir dans la biosynthèse de la pyoverdine^[22,26,29]. Le gène *pvdL* est composé de quatre modules. La particularité du module 1 est qu'il contient un domaine inhabituel similaire à l'acyl-coenzymeA ligase. Ce premier module possède une poche de liaison qui permet la liaison d'un acide gras (myristique ou myristoléique). Cet acide gras a pour fonction de retenir le précurseur de la pyoverdine au niveau de la membrane pour prévenir la diffusion du sidérophore dans le cytoplasme, empêcher la chélation de métaux présent dans la cellule et permettre le transfert de la ferribactine dans le périplasme^[4,22]. Le premier module permet à l'enzyme PvdL de coupler le coenzymeA à un acide gras dans une réaction ATP dépendante^[1,22,28]. S'en suit, l'incorporation de l'acide L-glutamique (L-Glu) porté par le second module de PvdL à l'acide gras. Par après, deux acides aminés sont ajoutés par les deux modules suivants : la D-tyrosine (D-Tyr) et le L-2,4 diaminobutyrate (L-Dab). L'enzyme PvdH permet de catalyser une réaction aminotransférase interconvertissant l'aspartate β -semialdéhyde (L-ASA) et la L-2,4-diaminobutyrate (L-Dab)^[4,8,76]. Le troisième module apportant la D-Tyr, possède un domaine d'épimérisation d'où présence de la forme D^[29]. PvdL va permettre de catalyser la réaction de condensation de ces deux acides aminés avec le L-Glu et former un cycle tétrahydropyrimidine, précurseur du chromophore dihydroquinoléine^[1,22,28-29]. Le gène *pvdL* est le seul gène à être conservé chez toutes les espèces de *Pseudomonas* fluorescents, cela conclut que les premières étapes dans l'assemblage du sidérophore sont communes^[24].

PvdI est une NRPS à quatre module dont le premier possède un domaine de condensation qui recrute et lie le précurseur formé par PvdL à un acide aminé. PvdI va ensuite catalyser l'activation et la condensation de trois autres acides aminés dont la L-N5- formyl-N5-hydroxyornithine (L-fOH-Orn) préalablement modifiée par les enzymes cytoplasmiques PvdF et PvdA. PvdA est une L-Ornithine N5-oxygénase, une enzyme catalysant la synthèse de la L-N5-hydroxyornithine par hydroxylation de la L-Ornithine^[75]. Tandis que PvdF catalyse la formylation de l'acide aminé particulier produit par PvdA^[4,8]. Ce gène est d'ailleurs uniquement retrouvé dans le génome des souches de *Pseudomonas aeruginosa*^[29].

PvdJ est une troisième NRPS à intervenir pour réaliser l'élongation de la chaîne peptidique après PvdI^[29]. La dernière NRPS à entrer en action est PvdD. Elle est la seule à posséder un domaine thioestérase qui permet de libérer le peptide^[29].

Néanmoins, il ne faut pas oublier que les enzymes PvdI, PvdJ et PvdD sont très divergentes chez les *Pseudomonas*^[1].

Outres ces NRPSs, une protéine de type MbtH a été identifiée dans le cytoplasme. Sa structure a démontré qu'elle joue un rôle dans la production ou dans la sécrétion de la pyoverdine^[4].

Une thioestérase soluble nommée PvdG serait aussi impliquée dans la production de la pyoverdine. Le gène de cette enzyme aurait un lien avec le gène *pvdL*^[4,18].

À la fin des réactions se produisant dans le cytoplasme, la molécule obtenue est un précurseur de la pyoverdine nommée la ferribactine, composé non fluorescent jaunâtre. Il diffère de la pyoverdine par un chromophore non mature.^[1,22,24,29,33]

2.5.3. Partie périplasma

Une fois que l'action des synthétases est terminée, la ferribactine acylée est transportée vers le périplasma par PvdE, un transporteur de type ABC qui est retrouvé communément chez les organismes vivants^[4,22,26,29,33-34,38]. Il s'agit d'un vaste ensemble de protéines transmembranaires dont la fonction est de transporter dans une seule direction, de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, plusieurs substances. Ces transporteurs utilisent l'ATP comme source d'énergie pour réaliser le transport. Il s'agit donc d'un transport actif primaire. La délétion du gène *pvdE* chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 abolit la sécrétion de la pyoverdine^[4]

Quand la ferribactine acylée est présente dans le périplasma, elle va subir des étapes de maturation pour devenir de la pyoverdine. Quatre gènes sont impliqués dans la processus de maturation du chromophore de la pyoverdine : *pvdN*, *pvdO*, *pvdP* et *pvdQ*^[33]. Ces gènes sont hautement conservés dans le génome de toutes les espèces et souches de *Pseudomonas* productrices de pyoverdines^[35].

Le premier gène à entrer en action est *pvdQ* codant pour une Ntn-hydrolase retirant la chaîne d'acide gras^[40]. Initialement découverte comme enzyme du quorum quenching^[4]. La délétion du gène *pvdQ* a démontré que l'enzyme PvdQ est nécessaire dans la formation de biofilm et dans la virulence dans des conditions pauvres en fer^[4,8,33-34]. Les mutants générés ne présentaient pas de perte de croissance par rapport à la souche sauvage^[39].

Après déacylation de la ferribactine, celle-ci va subir des réactions formant un cycle dihydroquinoléine fluorescent. La ferribactine avait la particularité de posséder un chromophore non mature. Dans la ferribactine, le L-Dab est condensé avec le groupe carbonyle de la D-Tyr donnant un cycle tétrahydropyrimidine. Pour former le cycle dihydroquinoléine, il y a d'abord une réaction d'hydroxylation de la chaîne secondaire de la D-Tyr pour former un groupement catéchol puis une réaction d'oxydation pour former une o-quinone. Cela facilite l'addition intramoléculaire impliquant l'atome d'azote du cycle L-Dab et le cycle quinone. Cela résulte en la formation du cycle dihydroquinoléine après une réaction de tautomérisation^[4].

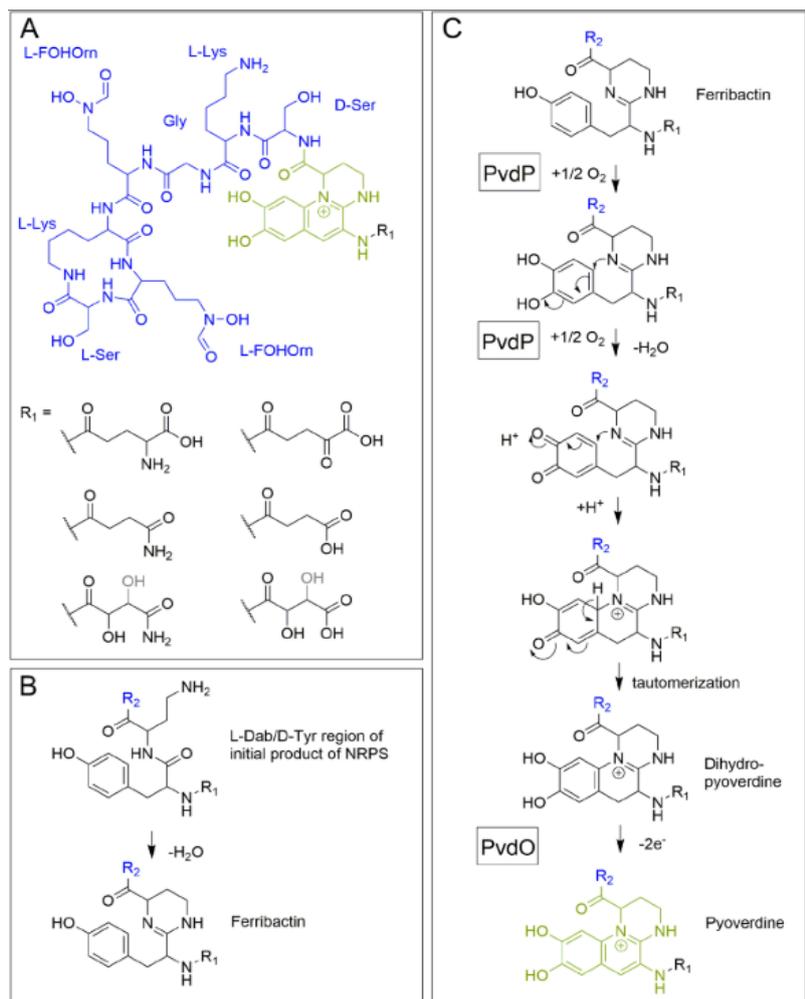


Figure n°9 - Représentation des réactions intervenant dans la maturation du chromophore. A = structure de la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* A506. B = réaction de condensation de l'acide aminé L-Dab avec le groupement carbonyle de la L-Tyrosine pour former le cycle tétrahydropyrimidine de la ferribactine. C = réaction de maturation pour obtenir le chromophore mature de la pyoverdine^[4]

Les étapes d'hydroxylation et d'oxydation sont catalysées par l'enzyme PvdP (Figure n°9), une tyrosinase facilitant la cyclisation et la formation de la dihydropyoverdine^[40]. Cette protéine PvdP a besoin d'un système de sécrétion TAT (Twin Arginine Translocation) pour être sécrétée dans le périplasma^[34]. Cette tyrosinase agit comme une crésolase (mono-oxydase) qui transforme un mono-phénol en ortho-diphénol, permettant de former un site catéchol à partir de la D-Tyr de la ferribactine^[33]. S'en suit, une activité catécholoxydase pour former l'ortho-quinone qui subira une cyclisation intramolécule (Figure n°10).

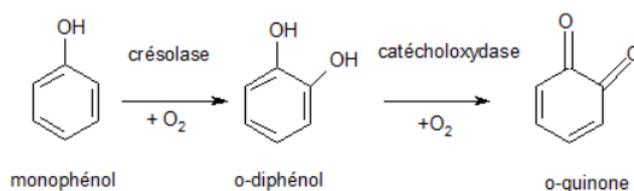


Figure n°10 - Réaction catalysant la formation d'une ortho-quinone à partir d'un monophénol

Des études ont permis de démontrer que PvdP ne catalyse que l'hydroxylation initiale et la première oxydation tandis que PvdO, une oxydoréductase, catalyse l'oxydation finale

pour former la pyoverdine^[4,8]. De par leur rôle, il est attendu que PvdO doit toujours fonctionner avec PvdP^[40].

Une étude de modélisation a permis de révéler que la tyrosinase PvdP possède un centre di-cuivre de type 3 (T3Cu) impliquant six histidines typiques des tyrosinases, trois pour chaque atome de cuivre (*Figure n°11*). Les histidines impliquées dans la liaison du cuivre sont strictement conservées chez toutes les espèces de *Pseudomonas* fluorescents^[34]. Cependant, le taux de similarité entre PvdP et d'autres tyrosinases microbiennes est relativement faible, cela a permis de proposer une hypothèse comme quoi PvdP appartiendrait à une famille de tyrosinase unique^[33-34]. Pour confirmer que PvdP est bien une tyrosinase, la protéine a été purifiée et testée contre les deux énantiomères de la tyrosine. Les résultats obtenus ont confirmés une réaction de mélanisation qui est typique des tyrosinases, les deux substrats incolores de base sont devenus bruns foncés^[34].

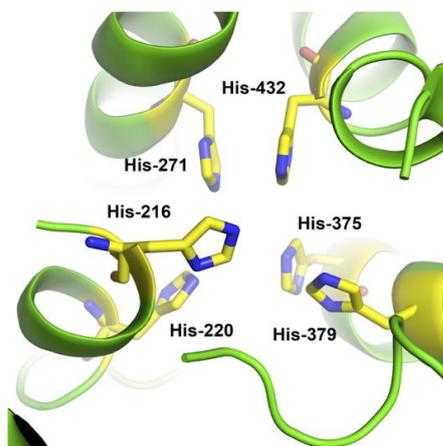


Figure n°11 - Modélisation du site actif de l'enzyme PvdP de Pseudomonas aeruginosa PAO1^[34]. Les 6 histidines représentées en jaune sont impliquées dans la liaison avec le cuivre.

La structure de PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a permis de révéler qu'il s'agit d'un homodimère, complexe protéique composé de deux sous-unités identiques. Chacune des chaînes composant l'homodimère possède un domaine tyrosinase C-terminal et un barillet β à huit brins N-terminal. De plus, PvdP possède un site de liaison approprié pour accueillir la ferribactine déacylée. Le domaine N-terminal de la tyrosinase PvdP est unique au niveau de sa structure primaire^[33].

Des mutants délétés du gène *pvdP* mis en culture dans un milieu CAA en présence d'un chélatant du fer, le éthylènediamine di(o-hydroxy)phénylacétique (EDDHA), a permis de constater que les mutants $\Delta pvdP$ ne produisent pas la pyoverdine fluorescente et se développent peu voire pas dans le milieu^[35].

En ce qui concerne la structure de PvdO, elle a été résolue par Yuan et al. (2017) et a permis de démontrer qu'elle est strictement liée à l'enzyme génératrice de formylglycine (FGE) mais ne possède pas les résidus catalytiques de FGE. De plus, des mutants avec le gène *pvdO* délété n'ont pas réussi à produire la pyoverdine fluorescente dans le milieu, suggérant que l'enzyme PvdO est impliquée dans une étape lors de la maturation du chromophore de la pyoverdine. Les mutants ont produit l'intermédiaire dihydropyoverdine. PvdO intervient donc dans l'oxydation finale de la dihydropyoverdine. Il a aussi été démontré que les mutants $\Delta pvdO$ arrivent à croître dans un milieu présentant des conditions de compétitions intenses pour le fer^[40,69].

Les enzymes PvdN et PtaA sont impliquées dans la conversion de la chaîne secondaire latérale (*Figure n°12*). L'enzyme PvdN convertit le L-Glu en succinamide qui lui-même peut subir une hydrolyse pour devenir de l'acide succinique. Tandis que l'enzyme PtaA, une transaminase périplasmique contenant un coenzyme (le phosphate de pyridoxal) convertit l'acide glutamique en α -ketoglutarate. Cette enzyme est aussi présente chez des espèces ne produisant pas de pyoverdine, indiquant qu'elle doit être impliquée dans d'autres voies de biosynthèse périplasmique. Une autre conversion existe, celle donnant la malamide et l'acide malique mais l'enzyme responsable de cette conversion reste inconnue à ce jour^[4].

La protéine PvdN modifie spécifiquement la pyoverdine sans pour autant changer la quantité de pyoverdines produites ni modifier la croissance des cellules dans des conditions limitantes en fer. Il a même été découvert que PvdN pouvait même accepté la ferribactine comme substrat, ce qui indique que le chromophore mature n'a pas réellement d'importance pour les enzymes PvdN et PtaA^[4,71]. De plus, une lysine-261 jouant un rôle de cofacteur, serait essentielle pour l'activité et la translocation dans le périplasma de PvdN^[35].

Un dernier gène a été mis en évidence, le gène *pvdM*. L'enzyme codée par ce gène aurait une similarité structurelle avec les amidohydrolase métal-dépendantes mais sa fonction reste encore inconnue dans la biosynthèse de la pyoverdine^[33].

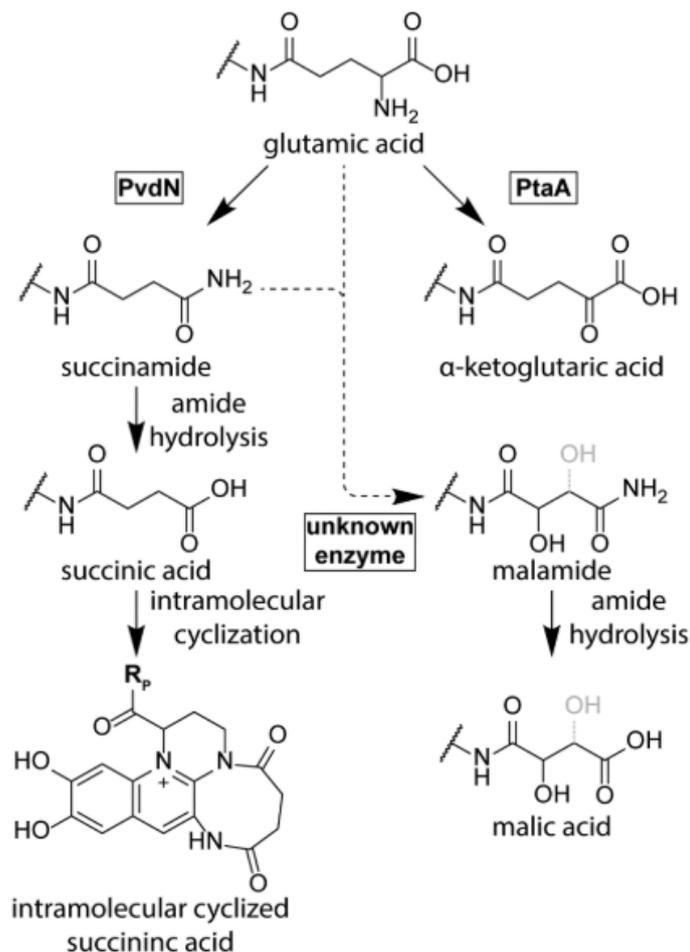


Figure n°12 - Voies métaboliques périplasmiques pour la formation de la chaîne secondaire latérale des pyoverdines. PvdN catalyse la formation du résidu succinamide à partir de l'acide glutamique tandis que PtaA catalyse la formation du résidu α -ketoglutarate. Une troisième enzyme catalyse la formation du résidu malamide à partir de l'acide glutamique ou du succinamide mais elle reste encore inconnue^[4]

2.5.4. Mécanisme d'export de la pyoverdine

Quand la pyoverdine est synthétisée, elle est excrétée dans le milieu extracellulaire par une pompe à efflux formée par les protéines PvdR-PvdT-OpmQ (*Figure n°6*)^[22]. La protéine PvdT est une protéine cytoplasmique membranaire, PvdR est un adaptateur périplasmique tandis que OpmQ est une protéine de la membrane externe composée par un tonneau β et une extension périplasmique^[8]. L'inactivation de ce groupe de gène réduit la production de pyoverdine de moitié par rapport à la souche sauvage suggérant que ce système n'est pas la seule voie d'exportation de la pyoverdine^[4,18]

Une fois dans l'environnement, le sidérophore va chélater le fer ferrique et le rendre disponible pour le micro-organisme. Pour cela, il existe des récepteurs (FpvA) se trouvant sur la membrane externe de l'organisme qui vont reconnaître spécifiquement les ferri-sidérophores^[4,70]. L'assimilation est énergisée par l'interaction entre FpvA et le complexe protéique de transduction d'énergie, TonB^[13]. FpvA peut non seulement lié la ferripyoverdine mais aussi l'apo-pyoverdine. Cette dernière n'est cependant pas importée dans la cellule.

Après l'import dans la cellule, la pyoverdine n'est pas dégradée ni modifiée ni transportée dans le cytoplasme. A la place le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} dans le périplaste, libérant la pyoverdine. Les ions ferreux sont pris en charge par le transporteur de type ABC, FpvDE. Le sidérophore, quant à lui, est soit relargué dans le milieu extérieur par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ ou alors être stocké dans un compartiment périplasmique^[4,13].

2.5.5. Régulation de la production de pyoverdine

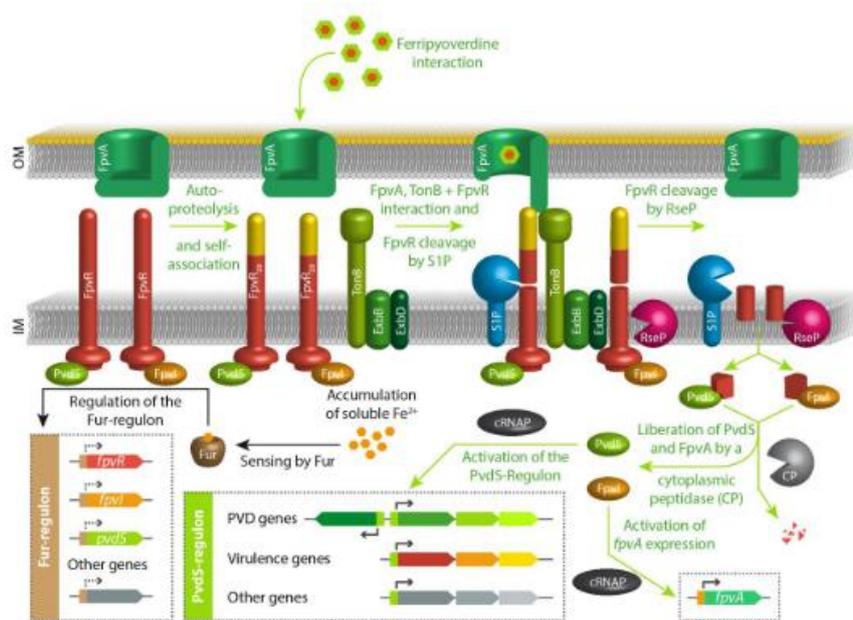


FIGURE 4: The key regulatory pathways for pyoverdine production in response to iron starvation. See text for details.

Figure n°13 - Représentation schématique des voies de régulations de la pyoverdine en réponse à un déficit en fer^[4]

Il existe plusieurs régulateurs agissant sur le métabolisme du fer (*Figure n°13*). Le facteur de transcription Fur (Ferric Uptake Regulation) est un facteur présent chez les bactéries gram-négatives capable de réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer dont *pvdS*, *fpvR* et *fpvI*, quand il y a forte concentration en ion ferreux

dans le cytoplasme^[4,13,38,71]. Lorsque Fur interagit avec le fer ferreux, le complexe va venir se lier à une séquence d'ADN particulière nommée la Fur box qui se situe dans la région promotrice de *pvdS*, *fpvI* et *fpvR* et bloque leur transcription^[20,72]. Le gène *pvdS* est un facteur sigma requis pour l'expression des gènes de la biosynthèse de la pyoverdine et les gènes relatif à la virulence de la bactérie^[4,20,29]. Le gène *fpvI* est aussi un facteur sigma requis pour l'expression des gènes codant pour les récepteurs de la pyoverdine de la membrane externe, FpvA tandis que *fpvR* est un facteur anti-sigma inactivant *pvdS* et *fpvI*^[4,20].

A contrario, si le micro-organisme est dans un milieu carencé en fer, la répression exprimée par Fur est levée et le mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine peut démarrer^[20].

3. Objectifs

Le but de ce travail de fin d'étude est d'analyser le mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1. Ce travail est scindé en plusieurs objectifs.

Le premier objectif est la réalisation d'une analyse bio-informatique du génome de la souche *Pseudomonas putida* BTP1. Cet objectif a pour but de comparer le génome de différentes souches de *Pseudomonas* produisant de la pyoverdine avec celui de BTP1 qui produit de l'isopyoverdine pour identifier le pourcentage d'identité entre les gènes impliqués dans la biosynthèse du sidérophore. Une deuxième partie concernera l'analyse de la structure primaire, secondaire et tertiaire de l'enzyme PvdP de BTP1 afin de les comparer avec les autres PvdP produites par des souches de *Pseudomonas* synthétisant la pyoverdine. Par ailleurs, une analyse *in silico* sera aussi réalisée sur les chaînes peptidiques des différentes pyoverdines et isopyoverdines produites par les souches de *Pseudomonas* afin d'identifier celles dont la structure est la plus proche de la chaîne peptidique la pyoverdine de BTP1

Le second objectif est la mise en place d'une stratégie de biologie synthétique permettant de démontrer le rôle joué par l'enzyme PvdP dans la formation de l'isopyoverdine. Cette stratégie est basée sur une délétion du gène codant pour cette protéine chez la souche *Pseudomonas putida* BTP1 et une complémentation avec le gène codant cette même protéine dans une souche qui produit une pyoverdine présentant des similarités structurales dans sa partie peptidique avec l'isopyoverdine de BTP1. Une complémentation contrôle sera réalisée avec le gène *pvdP* de BTP1. Des cinétiques de croissance microbienne et de production d'isopyoverdine/pyoverdine ainsi que des analyses par LC-QTOF-MS des surnageants de culture seront effectuées avec ces différents mutants et la souche sauvage.

4. Matériels et méthodes

4.1. Milieux de culture, solutions et gel d'agarose

4.1.1. Milieu CasaminoAcids (CAA)

Tableau n°1 - Composition milieu CAA

CasaminoAcids	10g/L
K ₂ HPO ₄	0,3g/L
MgSO ₄	0,5g/L
Agar (si milieu solide)	15g/L

4.1.2. Milieu Lysogeny Broth (LB)

Tableau n°2 - Composition milieu LB

Tryptone de caséine	10g/L
Extrait de levure	5g/L
NaCl	10g/L
Agar (si milieu solide)	15g/L

4.1.3. Milieu King B (KB)

Tableau n°3 - Composition milieu KB

Bacteriological peptone	20g/L
Glycérol	10g/L
K ₂ HPO ₄	1,5g/L
Agar (si milieu solide)	15g/L

4.1.4. Milieu Succinate

Tableau n°4 - Composition milieu succinate

K ₂ HPO ₄	6g/L
KH ₂ PO ₄	3g/L
Acide succinique	4g/L

(NH ₄) ₂ SO ₄	1g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g/L

Un volume de 3mL (pour 1 litre) de MgSO₄ sera ajouté après l'autoclavage.

Chaque milieu de culture est complété avec de l'eau distillée tandis que le pH doit être ajusté à 7.

4.1.5. Préparation de solution X-Gal et IPTG

Ces deux composés sont utilisés pour le screening des colonies bactériennes. Le X-gal est un substrat pour l'enzyme β -galactosidase. Cette enzyme hydrolyse le X-Gal pour donner du 5-bromo-4-chloro-indoxyle qui se dimérise pour former un pigment bleu. Tandis que l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) est un inducteur du gène LacZ ω .

4.1.5.1. Préparation d'une solution 20mg/ml de X-Gal :

100 mg de X-Gal sont pesés et ajoutés à 5mL de diméthylformamide (DMF). La solution est passée au vortex puis conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

4.1.5.2. Préparation d'une solution d'IPTG (100mM)

Une masse de 0.238g d'IPTG est pesée, auquel est ajouté 10 mL d'eau distillée pour dissoudre le composé. La solution est filtrée avec un filtre seringue de 0,22 μ m. La solution est stockée dans des aliquots de 1mL à -20°C.

4.1.5.3. Préparation d'une solution de MOPS (3-(n-morpholino)propanesulfonic acid) glycérol

La solution de MOPS glycérol est un tampon utilisé pour enlever les sels présent dans le culot après centrifugation. Le *Tableau n°5* recense la préparation de 250mL de MOPS glycérol (1mM).

Tableau n°5 – Composition solution MOPS

<u>Constituants</u>	<u>Volume (mL)</u>
Glycérol	37,5
MOPS	0,058
Eau	Qsp

4.1.6. Gel d'agarose 1%

Le gel d'agarose est utilisé pour réaliser une séparation des acides nucléiques par électrophorèse. Pour le confectionner, une solution de TAE doit être réalisée. Il s'agit d'un tampon de migration utilisé en électrophorèse, constitué de Tris, d'acide acétique et de EDTA. Une masse d'un gramme d'agarose est pesée et ajoutée à 100mL de TAE. L'agarose est fondu au micro-onde pendant 2 minutes tout en homogénéisant. Un volume de 5 μ L (/100mL) de MidoriGreen est ajouté. Ce composé est un colorant très sensible se fixant à

l'ADN et ARN et permettant une bonne visualisation sous lampe UV. Après migration, le gel est imagé avec le VWR GenoSmart.

4.2. Mutagénèse

4.2.1. Création du mutant BTP1 $\Delta pvdP$

La stratégie de knockout du gène *pvdP* de *Pseudomonas putida* BTP1 est résumée dans la Figure n°14.

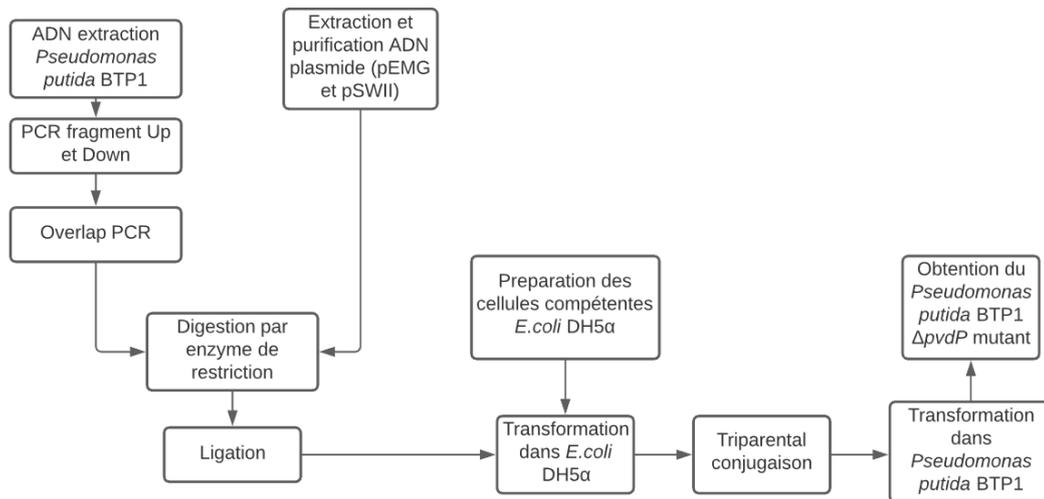


Figure n°14 – Schéma représentant le procédé d'obtention du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$.

Tableau n°6 - Souches bactériennes utilisées dans ce travail

<u>Souche</u>	<u>Génotype</u>
BTP1	<i>Pseudomonas putida</i>
KT2440	<i>Pseudomonas putida</i>
DH5α	<i>E.coli</i>
DH5α λ-pir	<i>E.coli</i>
Helper	<i>E.coli</i>

Tableau n°7 - Plasmides utilisés dans ce travail

	<u>Plasmide</u>	<u>Caractéristique</u>	<u>Utilisation</u>
Mutagenèse	pEMG	Km ^R , plasmide suicide, plasmide mobilisable, origine de réplication (R6K γ ori) provenant du plasmide R6K d' <i>E.coli</i> , LacZ α avec deux sites I-Sec1	Single crossing over dans <i>Pseudomonas putida</i> BTP1
	pSWII	Gm ^R , oriRK2, XylS, Pm \rightarrow I-Sec	Transformation dans <i>Pseudomonas putida</i> BTP1 Expression Isec1 dans <i>Pseudomonas</i>
	p497	Amp ^R , plasmide conjugative, OriT,	Conjugaison
Complémentation	pME6010	Tet ^R , p15A ori, pVS1 oriV, EforRed,	Clonage pTac+pvdP
	pOT1e+M-Cherry	Gm ^R , Tac promoter, pBBR1 oriV, mCherry	PCR fragment pTac

Tableau n°8 - Amorces utilisées dans ce travail. **Gras** = site de restriction

	<u>Amorces</u>	<u>Séquence (5' \rightarrow 3')</u>	<u>Utilisation</u>
<u>Partie Mutation – délétion gène pvdP</u>	Dwn <i>pvdP</i> F	TAGCGCACCTGGCGCTATTT	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment Down
	Dwn <i>pvdP</i> R Bam-H1	TCCGGATCC AAAACGCCGAAAAGATCCTC	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment Down • Overlap PCR
	Up <i>pvdP</i> F Bam-H1	GGAGGATCCGGACATCTGCGAGACATCG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment Up • Overlap PCR
	Up <i>pvdP</i> R	CCAGCAAATAGCGCCAGGTGCGCTACATCCACT GTACTCATGACG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment Up
	nptIIR	CGCTCAGAAGAACTCGTCAA	<ul style="list-style-type: none"> • PCR sur colonie
	nptIIF	GAGGATCGTTTCGCATGATT	<ul style="list-style-type: none"> • PCR sur colonie
	Seq <i>pvdP</i> F	GTGTGCGAAGCCATCACC	<ul style="list-style-type: none"> • Séquençage
	Seq <i>pvdP</i> R	CGTTGCCGATACCTATCTGAG	<ul style="list-style-type: none"> • Séquençage

Partie complémentation <u><i>pvdP</i> de BTP1</u>	pTac F	CTAGTGGATCCCCGGGCTG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry • Overlap PCR
	pTac 25oe pvdP R	GGATCTTTGACGTGACACTTTTCATATGTAGAAT TCTGTTCTGTGTG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry
	<i>pvdP</i> F	ATGAAAGTGTCACGTCGAAA	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment <i>pvdP</i> de BTP1
	<i>pvdP</i> R Sac 1	GAGCTCCTACAAACCGTCACGTCTCG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment <i>pvdP</i> de BTP1 • Overlap PCR
Partie complémentation <u><i>pvdP</i> de KT2440</u>	pTac F	CATATGTAGAATTCTGTTCTGTGTG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry • Overlap PCR
	pTac 25oa pvdP R	GGATCTTTGACGTGACACTTTTCATATGTAGAAT TCTGTTCTGTGTG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry
	<i>pvdP</i> KT2440 F	GGAACAGAATTCTACATATGATGACGATTTCTC GGAGAGG	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment <i>pvdP</i> de KT2440
	<i>pvdP</i> KT2440 R Sac1	GAGCTCTCACGACCGCTGCCTGACCT	<ul style="list-style-type: none"> • PCR fragment <i>pvdP</i> de KT2440 • Overlap PCR
	Seq pME6010F	AACGGGAAACGTCTTGCTCG	<ul style="list-style-type: none"> • Séquençage
	Seq pME6010R	AATCACCATGAGTGACGACT	<ul style="list-style-type: none"> • Séquençage

4.2.1.1. Extraction de l'ADN de *Pseudomonas putida* BTP1 et des plasmides

L'extraction de l'ADN de la souche est réalisée à l'aide du GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermoscientific™) pour les bactéries gram-négatives selon le protocole du fournisseur à partir de 2mL de culture overnight à 30°C (180rpm). L'ADN est conservé à -20°C.

En ce qui concerne les plasmides, ces derniers (*Tableau n°6*) sont utilisés tout au long du protocole dans le but de réaliser les recombinaisons homologues pour déléter le gène *pvdP* de

Pseudomonas putida BTP1. Le premier utilisé dans ce procédé de mutagenèse est le plasmide pEMG (3168pb) possédant une cassette de résistance à la kanamycine.

Un second plasmide, pSWII (7169pb) est utilisé pour cliver les sites I-SecI apportés par le plasmide pEMG. Il possède une cassette de résistance à la gentamycine et des origines de répllication appropriées pour au moins deux organismes (*E.coli* et *Pseudomonas*)^[32,61]. Il permet de réaliser la seconde recombinaison homologue pour réparer l'ADN, déléter le gène *pvdP* et la résistance à la kanamycine.

Une culture d'*E.coli* DH5 α - λ pir contenant pEMG en présence de kanamycine (25 μ g/mL) et une culture d'*E.coli* DH5 α pour pSWII en présence de gentamycine (25 μ g/mL) est effectuée. Le tout est incubé à 37°C (150rpm).

Pour extraire et purifier les plasmides, il faut suivre les étapes du protocole GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoscientificTM). L'ADN est élué par une solution tampon.

Le dosage de l'ADN est réalisé avec le NanoDropTM 2000/2000c Spectrophotometers (ThermofisherScientificTM).

4.2.1.2. PCR des fragments Up et Down

Une PCR est réalisée sur les régions Up et Down du gène qui va être délété. Le but de cette méthode est d'obtenir deux fragments pour la recombinaison homologue dont l'un possède 930 paires de bases (contenant le codon start) en amont du gène *pvdP* (fragment Up) et l'autre 900pb en aval du gène débutant par le codon stop de ce même gène (fragment Down) (Figure n°15). L'amorce Up *pvdP* R est créée en ajoutant 25 nucléotides pour obtenir un overlap avec le fragment Down. Les sites de restriction BAM-HI sont placés sur les amorces Up forward et Down reverse pour permettre la ligation dans le plasmide pEMG.

Le *Tableau n°9* est le mix PCR pour une réaction de 50 μ l.

Tableau n°9 - Compositions et volume (μ L) pour réaliser une PCR avec la Q5 polymérase

<u>Constituants</u>	<u>Volume a prélevé (μL)</u>
Tampon Q5 (NEB)	10
dNTPs	1
Amorce forward	2.5
Amorce reverse	2.5
Q5 polymérase (NEB)	0.5
Template ADN	2
Eau (sans nucléase)	31.5

La polymérase Q5 est une Taq high fidelity. La fidélité d'une polymérase fait référence à sa capacité à répliquer, avec précision, une matrice.

Un contrôle négatif (sans le template ADN) est également réalisé. Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur (*Tableau n°10*)

Tableau n°10 - Programme PCR utilisé pour la polymérase Q5

<u>Thermocycling conditions</u>			
<u>Étapes</u>	<u>Description</u>	<u>Température (°C)</u>	<u>Temps</u>
Dénaturation initiale		98	30 s
Cycles (25-35)	Dénaturation	98	5-10 s
	« Annealing » des amorces	62-63	10-30 s
	Liaison de la polymérase sur l'ADN	72	20-30 s (/kb)
Extension finale	Synthèse des amplicons	72	2 min

5µl de la PCR est mélangé avec 1µL de DNA Gel Loading Dye Purple (6X) (NEB) puis vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GeneRuler DNA Ladder (ThermoScientific™) et la migration s'effectue à 100V pendant 20-30 minutes.

4.2.1.3. Overlap PCR

L'overlap PCR est une technique qui permet de fusionner deux fragments obtenus, possédant chacun une région homologue (*Figure n°15*)^[82]. En général, une première réaction est d'abord réalisée sans les amorces pendant 12 cycles au thermocycleur. Cela permet à la région overlap des fragments de s'hybrider et de réaliser l'extension pour former le fragment overlap. Une seconde partie est réalisée en ajoutant les amorces externes correspondantes pendant 25 cycles pour amplifier le fragment overlap. La polymérase Q5 est utilisée tout au long de la PCR. Une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée pour confirmer l'overlap. La concentration de l'overlap est obtenue avec le NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (ThermoFisherScientific™) après purification du produit PCR (Macherey Nagel Gel Purification Kit).

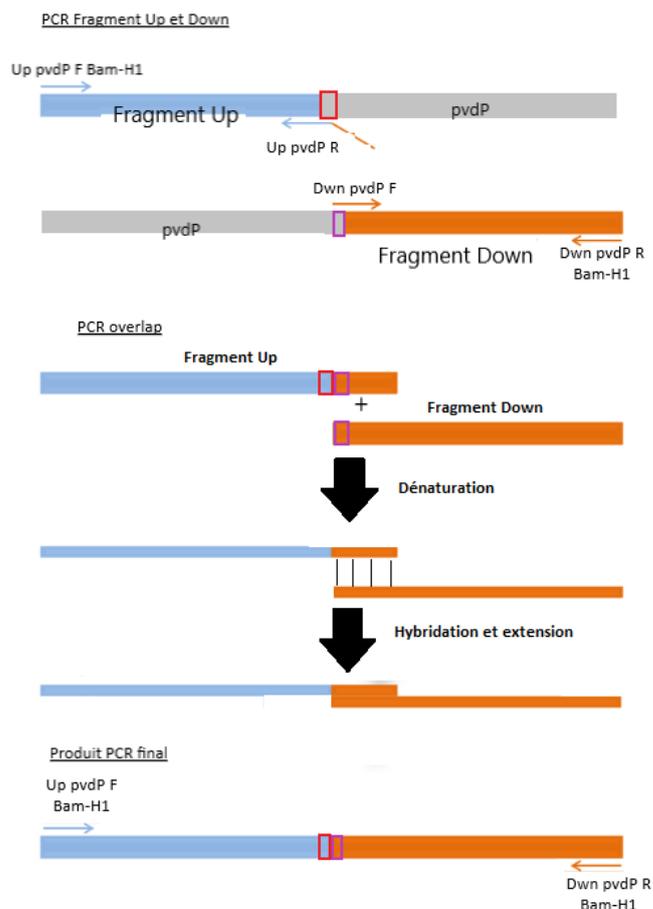


Figure n°15 – Principe de fonctionnement de la PCR overlap. Deux réactions PCR sont réalisées en amont pour amplifier le fragment Up et Down possédant une région homologe chacun grâce aux amorces utilisés. Ces régions homologues vont s'hybrider entre elles lors de la PCR overlap. Le produit final de la PCR overlap est de 1,8kb. Encadré rouge = codon start de pvdP et encadré violet = codon stop de pvdP.

4.2.1.4. Digestion par enzymes de restriction

La prochaine étape consiste à digérer le fragment overlap et le plasmide pEMG avec une enzyme de restriction: BAM-H1. Le *tableau n°11* reprend les constituants et volumes à utiliser pour cette manipulation pour un volume final de 50µl.

Tableau n°11 - Composition et volume nécessaire pour digérer l'overlap et le plasmide pEMG

Overlap		pEMG	
Tampon CutSmart ^R (10X) (NEB)	5µL	Tampon Cut-Smart (10X) (NEB)	5µL
Bam-H1 (NEB)	2µL	Bam-H1 (NEB)	2µL
ADN (au moins 500ng)	À déterminer	ADN (au moins 2000ng)	À déterminer
Eau (sans nucléase)	Qsp	Eau (sans nucléase)	Qsp

Le volume d'ADN est déterminé en prenant en compte la concentration de l'overlap et celle du plasmide (ex: $V_{\text{ADN-overlap}} * C_{\text{ADN-overlap}} = 500\text{ng}$). Le tampon CutSmart^R (NEB) est utilisé car un grand nombre d'enzymes de restriction sont 100% actives dans ce dernier. Les deux mélanges sont mis au bloc chauffant (Eppendorf ThermoMixer^R) à 37°C durant 30 minutes.

Pour le plasmide pEMG, une étape de déphosphorylation est nécessaire après digestion. La déphosphorylation est un processus empêchant le plasmide de se refermer sur lui-même. La phosphatase alcaline utilisée pour cette étape est la Quick CIP (NEB). Le plasmide est incubé 10 minutes à 37°C avant de subir un choc thermique de 2 minutes à 80°C pour inactiver la réaction.

Les produits de digestion sont purifiés grâce au kit PCR Clean Up NEB. Les extractions sur gel d'agarose (cas de l'overlap) sont réalisées selon le protocole Gel Extraction et Purification.

4.2.1.5. Ligation

La ligation va permettre de lier de manière covalente l'overlap au plasmide pEMG. Cette étape est réalisée grâce à l'enzyme T4 DNA ligase. L'ADN ligase catalyse la formation de liaison phosphodiester covalentes entre le groupement 5'-phosphate d'un segment et le groupement 3'-OH du segment précédent sur le même brin, permettant de relier les nucléotides entre eux. La formation de cette liaison nécessite un cofacteur, l'ATP qui sera hydrolysé en AMP et deux pyrophosphates.

Avant de réaliser la réaction, il faut déterminer la quantité d'insert (=overlap) et de vecteur (= plasmide) à utiliser pour la ligation. De manière générale, un ratio de 1:3 (vecteur:insert) est suffisant. L'utilisation de l'outil « ligation calculator » (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) permet de calculer la quantité nécessaire d'insert et de vecteur pour obtenir le ratio. Les composés et volumes sont recensés dans le *tableau n°12*.

Tableau n°12 - Composition et volume nécessaire pour réaliser la ligation

<u>Constituants</u>	<u>Volume (µL)</u>
Tampon T4 ADN Ligase (10X) (NEB)	2
pEMG (approx. 50ng)	À déterminer
Overlap	À déterminer
T4 ADN ligase (NEB)	1
Eau (sans nucléase)	12,5

Une incubation à température ambiante (10 minutes) est nécessaire avant passage au thermocycleur (16°C overnight). Une réaction d'inactivation sera réalisé à 65°C pendant 10 minutes.

4.2.1.6. Transformation des cellules chimio-compétente par choc thermique

La transformation bactérienne permet d'introduire de l'ADN étranger dans une bactérie pouvant alors se multiplier ou cloner l'ADN. Les cellules capables de prendre rapidement cet ADN étranger sont appelées cellules compétentes. L'une des façons de procéder est de réaliser un choc thermique en exposant les cellules à une augmentation soudaine de température pour déstabiliser la membrane de la cellule et augmenter sa perméabilité induisant la formation de pores aux travers desquelles l'ADN étranger peut entrer.

4.2.1.6.1. Préparation des cellules compétentes

La souche bactérienne la plus couramment utilisée est *E.coli* DH5 α . Une préculture est effectuée dans du milieu LB et incubée la nuit à 37°C (180rpm). Par après, 2mL de cette préculture sont ajoutés à 100mL de milieu LB pour être cultivée à 37°C (180rpm) 2-3 heures pour avoir une densité optique (DO) à 600nm entre 0,3 et 0,6. La culture est centrifugée (Sigma 2-16KL; rotor 12181) à froid (4°C) pendant 5 minutes à 6000rpm (3824g). Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du CaCl₂ 0,1M froid. Cet ajout de CaCl₂ va empêcher la liaison de l'ADN plasmidique aux lipopolysaccharides (LPS) car les ions calcium sont chargés positivement contrairement à l'ADN et aux groupes chargés dans le noyaux interne des LPS. Cela permet à l'ADN plasmidique de passer dans la cellule lorsqu'il y aura choc thermique. Après cet ajout, le volume est transféré dans des tubes Eppendorf conique (50mL) et laissé dans la glace pendant 30 minutes avant d'être de nouveau centrifugé (4°C; 10 minutes). Le culot est resuspendu dans 800 μ L de CaCl₂ 0,1M/20% glycérol froid pour garder la capacité de compétence et être conservé à -80°C.

4.2.1.6.2. Transformation des cellules compétentes

Un prélèvement de 5 μ L de la réaction de ligation est ajouté à 50 μ L de cellules compétentes et laissé au repos dans la glace pendant 30 minutes. Puis ce mélange est placé deux minutes à 37°C. Un volume de 1mL de milieu SOC est ajouté, avant d'être incubé à 37°C pendant 1 heure sous agitation. Le milieu de culture pour les boîtes de Pétri est du LB auquel a été ajouté du X-Gal (10 μ L/mL de milieu) et IPTG 100mM (10 μ L/mL de milieu) ainsi que de la kanamycine (25 μ g/mL). 100 μ L de cellules compétentes sont étalées sur ce milieu et mis à l'étuve à 37°C. Une vérification via PCR sur colonies est réalisée sur les candidats obtenus pour confirmer que le pEMG-overlap est présent.

4.2.1.7. Conjugaison

La conjugaison est la transmission d'ADN plasmidique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Pour ce travail, une conjugaison triparentale sera réalisée. Il s'agit d'une forme de conjugaison bactérienne dans laquelle un plasmide helper présent dans une souche bactérienne (*E.coli*) est transféré dans une souche donneuse possédant le plasmide avec le gène d'intérêt (*E.coli* DH5 α - λ pir-pEMG-overlap). Le plasmide helper va mobiliser le plasmide pEMG-overlap grâce à sa fonction de mobilisation et le transférer dans la souche receveuse (*Pseudomonas putida* BTP1)^[81].

Ces trois souches sont mises en culture sur milieu LB solide puis liquide à leur température respective. Les trois précultures sont lavées deux fois. Leur DO doit être aux alentours de 1. L'*E.coli* helper, *E.coli* DH5 α - λ pir-pEMG-overlap et *Pseudomonas putida* BTP1 sont mélangés ensemble, 250 μ L chacun. Des spots de 10 μ L sont placés sur milieu LB solide et mise à l'étuve 30°C pendant 5-6 heures.

Les cellules sont resuspendues dans de l'eau et 100µL est étalé sur boîte de Pétri KB + kanamycine (25µg/mL) et mises à l'étuve 30°C. Les colonies ayant réussi à croître sur le milieu sont celles ayant le plasmide pEMG-overlap grâce à leur résistance à la kanamycine.

4.2.1.8. Transformation par électroporation

Les colonies possédant le plasmide pEMG-overlap sont mises en culture dans du milieu KB. Les fioles sont incubées overnight ou quelques heures à 180rpm pour obtenir une DO_{600nm} entre 0,6-0,8.

Le contenu subit une centrifugation (Sigma 2-16KL ; rotor 12181) à froid (4°C; 4500rpm (2151g); 10 min). Le culot est lavé deux fois avec une solution de MOPS glycérol froid. Ce tampon permet d'enlever les sels présents dans le culot pouvant impacter l'électroporation. Le culot est resuspendu dans 50-100µL de MOPS glycérol froid.

Pour la prochaine étape, le plasmide pSWII, préalablement extrait et purifié, est utilisé pour effectuer la seconde recombinaison homologue permettant de déléter le gène *pvdP* de BTP1. Pour cela, 5µL de pSWII est ajouté à 50µL de colonies BTP1-pEMG-overlap (obtenues après conjugaison). L'électroporation est effectuée selon les paramètres suivants : 2,5kV; 200ohm; 25µF; 2mm (BioRad Gene Pulser XCell). Elle permet de former des pores dans la membrane des cellules compétentes pour faire entrer le plasmide. Une fois terminé, 500µL de milieu SOC (37°C) sont ajoutés. Le tout est incubé 3 heures à 35°C pour permettre à la bactérie de se régénérer, de se répliquer et d'obtenir la résistance à la gentamycine.

Par après, la culture est mise sur boîte de pétri KB + gentamycine (20µg/mL) et incubée à 30°C overnight. Les colonies seront répliquées sur milieu KB avec et sans kanamycine et sur milieu KB avec gentamycine.

4.2.2. Complémentation génétique

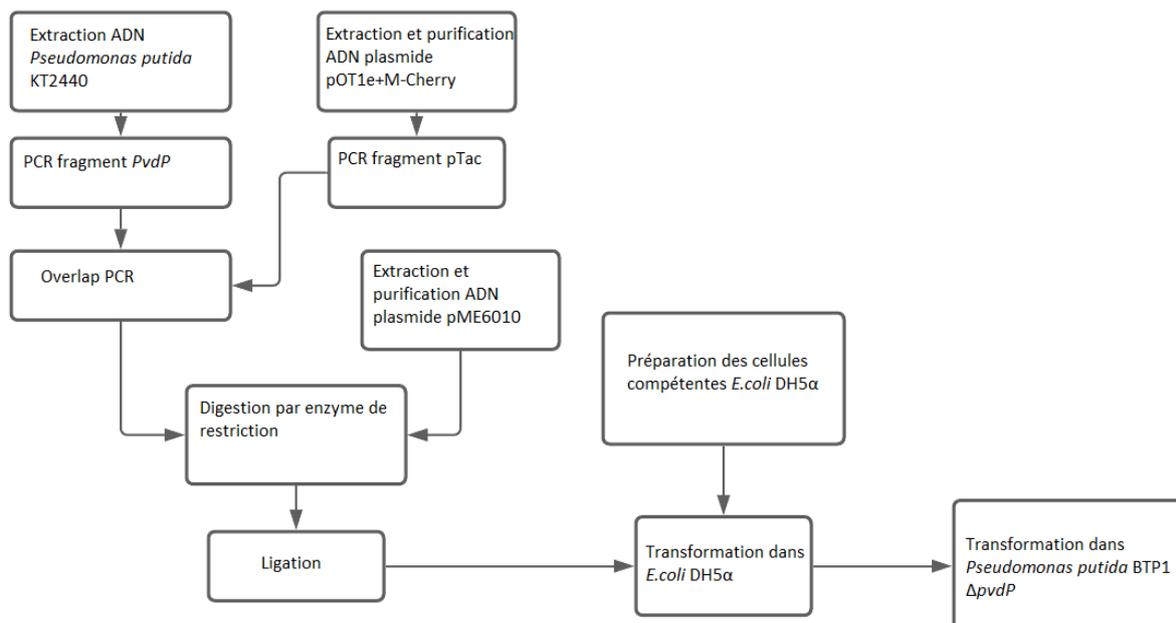


Figure n°16 - Représentation schématique de la stratégie de complémentation génétique du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$

La complémentation génétique est l'insertion d'un gène dans un organisme pour compenser le défaut provoqué par l'inactivation d'un gène de cet organisme.

La méthode (figure n°16) est quasiment identique à celle utilisé pour déléter le gène *pvdP* mais les plasmides et amorces utilisés sont différents. De plus, l'utilisation d'un promoteur fort, pTac, a été ajouté pour surexprimer le gène.

Pour effectuer la complémentation, une souche productrice de pyoverdine a été choisie sur base d'analyse bio-informatique, *Pseudomonas putida* KT2440. Le gène *pvdP* (1649pb) de cette souche ainsi que la séquence contenant le promoteur fort, pTac (147pb), provenant du plasmide pOT1e+M-Cherry (6247pb) ont été amplifié par PCR. Une overlap PCR sera réalisée entre ces deux fragments (figure n°17).

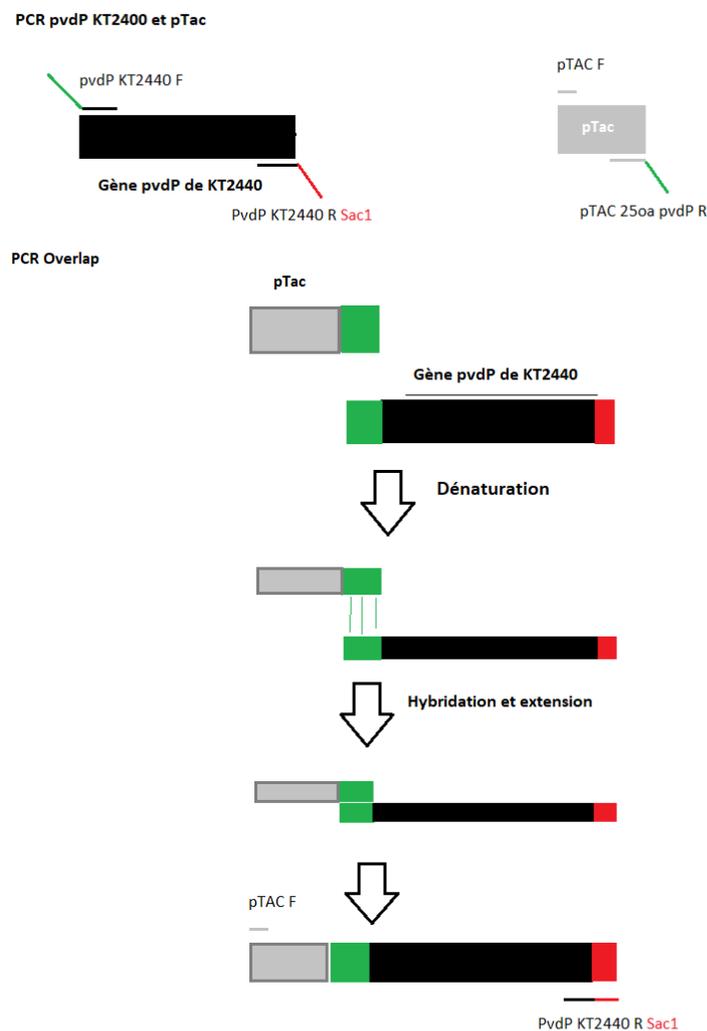


Figure n°17 – Représentation schématique de l'overlap PCR. Deux PCR sont réalisées en amont pour amplifier le gène *pvdP* de *Pseudomonas putida* KT2440 et le promoteur pTac du plasmide pOT1e+M-Cherry. Le produit overlap final est de 1776 pb. Région verte = région homologue obtenus grâce aux amorces utilisées; région rouge = site de restriction *Sac*-I

Le plasmide pME6010 a été choisi pour intégrer le fragment overlap. Ce plasmide est un plasmide de 9200pb possédant une origine de répllication pour *Pseudomonas* et une cassette de résistance à la tétracycline. Une culture d'*E.coli* DH5α en présence de tétracycline

est effectuée (37°C, 150rpm). Le plasmide est ensuite extrait (*point 4.2.1.1*). Ce dernier et l'overlap sont digérés avec les enzymes de restriction X-Ba1 et Sac-1 (NEB). Il est important d'incorporer le site de restriction Sac-1 à l'amorce nécessaire pour former l'overlap pour que l'étape de ligation puisse fonctionner (*figure n°17*). Le site de restriction de l'enzyme X-Ba1 est déjà présent sur la séquence contenant pTac. Le plasmide subit une déphosphorylation (*point 4.2.1.4*) pour éviter qu'il se referme sur lui-même.

La ligation fonctionne de la même façon que pour la méthodologie expliquée pour la création du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ (*point 4.2.1.5*)

Une première transformation est réalisée par choc thermique dans des cellules compétentes *E.coli* DH5 α pour introduire le plasmide avec le gène d'intérêt. La méthode pour réaliser la transformation est expliquée au *point 4.2.1.6*. La mise en culture sur boîte de Pétri a été réalisé sur milieu LB avec ajout de tétracycline (20 μ g/mL) pour appliquer une pression de sélection. Une vérification par PCR sur colonies est effectuée pour confirmer la présence du plasmide.

Les candidats ayant le plasmide sont mis en culture dans du milieu LB + tétracycline (20 μ g/mL) overnight. Une extraction du plasmide est ensuite réalisée via le protocole du GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoscientificTM). En parallèle, le mutant BTP1 $\Delta pvdP$ est mis en culture dans du milieu KB pour réaliser la seconde transformation.

Une seconde transformation se fait par électroporation (*Point 4.2.1.8*). Dans ce cas-ci, les cellules utilisées sont les cellules de BTP1 $\Delta pvdP$ et le plasmide utilisé est le plasmide pME6010 extrait préalablement contenant le gène d'intérêt. Après l'incubation dans le milieu SOC, un certain volume a été prélevé et étalé sur des boîtes de Pétri KB + tétracycline (50 μ g/mL).

4.2.3. Séquençage

Cette méthode est utilisée pour valider le succès des mutagenèses. Pour cela, les ADN du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ et du complément BTP1 pTac-*pvdP* KT2440 sont purifiés pour être envoyés à séquencer avec les amorces nécessaires pour réaliser le séquençage. La visualisation des résultats est effectuée avec le logiciel SnapGene.

4.2.4. Suivi de la croissance cellulaire et de la production de isopyoverdine au cours du temps

4.2.4.1. Tecan Spark^R

La cinétique de croissance microbienne (DO_{600nm}) a été effectué au TECAN dans une microplaque à 46 puits (ThermoFisherScientific-Nunclon 48 Flat Transparent) pour un volume de culture de 500 μ L/puits. Les précultures bactériennes ont été centrifugées puis lavées avec de l'eau physiologique pour éliminer toute trace d'(iso)pyoverdine et enfinensemencées dans différents milieux : CAA, CAA + EDTA et succinate. La croissance microbienne se réalise à 30°C. Le suivi de la croissance se déroule par mesure de l'absorption à 600nm toutes les 30 minutes.

4.2.4.2. Culture en fioles

Une cinétique de production d'isopyoverdine a été réalisée en fioles. Les mêmes milieux de culture ont été utilisés. Un prélèvement est effectué toute les heures pour mesurer

l'absorbance à DO_{600nm} et DO_{400nm} avec le spectrophotomètre GENESYS 10 UV/Vis (ThermoScientific™). Après mesure de la DO_{600nm}, les échantillons sont centrifugés (10 minutes) et le surnageant est récolté pour ajuster le pH à 7 avant mesure de la DO_{400nm} pour déterminer la production d'(iso)pyoverdine.

4.2.4.3. LC-Q-TOF-MS

Les analyses permettant d'identifier la présence du sidérophore est réalisée à l'aide du LC/Q-TOF MS^[63].

Le système LC/Q-TOF-MS (Agilent Technologies) utilise une colonne chromatographique C18 Acquity UPLC BEH (2.1×50mm×1.7µm; Waters). La méthode conçue pour la pyoverdine utilise le protocole d'élution suivant (*Tableau n°13*). Le solvant A est constitué d'eau tandis que le solvant B est constitué d'acétonitrile. Le volume injecté est de 10µL avec un flux de phase mobile de 0,3mL/min.

Tableau n°13 – Protocole d'élution de la méthode d'analyse du sidérophore par UPLC-Q-TOF MS

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
6	100	0
9	40	60
9,20	0	100
13	0	100
13,20	100	0

Au niveau du Q-TOF MS, l'ionisation des molécules est réalisée par électrospray (Dual AJS ESI) dans le mode d'ionisation positif. Les paramètres de voltage et température sont répertoriés dans le *tableau n°14*. La gamme de détection est de 300 à 1700m/z. L'analyse est réalisée selon la méthode Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Tableau n°14 - Paramètres Q-TOF MS

Paramètres	Valeur
Température gaz de séchage	300°C
Flux gaz de séchage	8 L/min
Pression du nébuliseur	35 psig
Température « Sheath gas »	350°C
Flux « Sheath gas »	11 L/min
Voltage du cône	1000 V

Voltage capillaire	3000 V
Voltage du fragmenteur	175 V
Voltage du « Skimmer »	65 V
Octopole RF Peak	750

5. Résultats et discussion

5.1. Partie bio-informatique

5.1.1. Comparaison du génome de la souche *Pseudomonas putida* BTP1 avec différentes souches de *Pseudomonas*

La première partie du travail de bio-informatique est de pouvoir comparer les gènes impliqués dans la formation de l'isopyoverdine dans le génome de *Pseudomonas putida* BTP1, séquencé préalablement, avec les mêmes gènes d'autres espèces et souches de *Pseudomonas* dont le génome a aussi été séquencé. Le but de cette partie est de savoir si ces gènes ayant la même fonction sont similaires ou pas.

Pour y parvenir, une base donnée reprenant différents génomes séquencés de *Pseudomonas* a été utilisée (<https://www.pseudomonas.com/>).

Le second outil utilisé pour réaliser la comparaison des génomes est le Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cet outil est capable de trouver plusieurs régions similaires localement entre plusieurs séquences d'acides aminés ou de nucléotides et ainsi réaliser un alignement au niveau de ces régions^[42]. Dans le cas de ce travail, BLASTx a été utilisé. Il permet de comparer une séquence nucléotidique traduite à une base de donnée de séquence protéique. Un alignement sera donc réalisé entre le génome séquencé de *Pseudomonas putida* BTP1 et une séquence primaire d'un gène provenant d'une autre souche de *Pseudomonas* produisant de la pyoverdine.

Pour effectuer ce travail, une liste des différents gènes ayant une fonction dans le mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine a été dressée (*Tableau n°15*)

Tableau n°15 - Liste des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'(iso)pyoverdine et leurs fonctions

Gène	Fonctions	N° article
<i>pvdL</i>	Synthétase de peptides non ribsomiques	23;1;4
<i>pvdA</i>	L-Ornithine N5-oxygénase	23;1;4
<i>pvdD</i>	Synthétase de peptides non ribsomiques	23;4
<i>pvdI</i>		23;1;4
<i>pvdJ</i>		23;1
<i>fpvA</i>	Récepteurs membranaires spécifiques aux ferri-pyoverdines	1;4
<i>pvdT</i>	Protéine cytoplasmique membranaire	1;4
<i>pvdR</i>	Adaptateur périplasmique	1;4
<i>opmQ</i>	Protéine membranaire externe	1;4
<i>pvdF</i>	Enzyme catalysant la formylation	1;4
<i>pvdH</i>	Aminotransférase permettant la conversion de L-ASA en L-Dab	1;4
<i>pvdE</i>	Transporteur ABC - passage de la ferribactine acylée dans le périplasma	1,4
<i>pvdN</i>	Convertit l'acide glutamique en succinamide	1,4
<i>pvdO</i>	Oxydo-reductase catalysant l'oxidation finale du chromophore	1;4
<i>pvdP</i>	Tyrosinase catalysant l'hydroxylation et la première oxidation dans la formation du chromophore	1,4
<i>pvdQ</i>	Acylase retirant la chaîne d'acide gras de la ferribactine	1,4
<i>mbtH</i>	Production et sécrétion de pyoverdine	4
<i>pvdG</i>	Thioestérase	4
<i>pvdM</i>	Enzyme périplasmique similaire aux amidohydrolase	4
<i>ptaA</i>	Enzyme convertissant l'acide glutamique en acide alpha ketoglutarique	4
<i>mexAB-oprM</i>	Export de la pyoverdine	4
<i>pvdS</i>	Facteur sigma requis pour l'expression des gènes de la biosynthèse de pyoverdine	4
<i>fpvI</i>	Facteur sigma requis pour l'expression des gènes codant pour les récepteurs membranaires FpvA	4
<i>fpvR</i>	Facteur anti-sigma inactivant les gènes <i>pvdS</i> et <i>fpvI</i>	4

Lors de la réalisation d'un alignement, un pourcentage d'identité est donné comme résultat. Ce pourcentage est une mesure quantitative de la similarité entre deux séquences. La E-value peut aussi donner une indication sur la qualité de l'alignement, il s'agit du nombre de résultats attendus de qualité similaire obtenu par hasard. Plus la E-value est faible plus l'alignement est significatif.

Le *tableau n°16* retrace les résultats obtenus lors de l'alignement du génome séquencé de BTP1 avec différentes séquences d'acides aminés des différents gènes impliqués dans le mécanisme de biosynthèse de la pyoverdine provenant de différentes souches de *Pseudomonas*.

Tableau n°16 - Résultats obtenus par BLAST en alignant le génome de *Pseudomonas putida* BTP1 avec une séquence primaire d'un gène impliqué dans la biosynthèse de la pyoverdine provenant d'une autre souche de *Pseudomonas*.

Gène	Localisation génomique dans <i>Pseudomonas putida</i> BTP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		<i>Pseudomonas putida</i> KT2440		<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5		<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	
		% d'identité	e-value	% d'identité	e-value	% d'identité	e-value	% d'identité	e-value
<i>pvdL</i>	5904033 - 5916986	70,49	0	93,54	0	72,53	0	71,75	0
<i>pvdA</i>	5198996 - 5200330	65,19	0	93,69	0	63,76	0	65,88	0
<i>pvdD</i>	5865517 - 5880249	46,37	0	51,64	0	44,93	0	46,81	0
<i>pvdI</i>	5865517 - 5880249	44,23	0	49,33	0	48,8	0	43,12	0
<i>pvdJ</i>	5865517 - 5880249	48,62	0	46,92	0	45,85	0	/	/
<i>fpvA</i>	5861973 - 5864396	42,28	0	42,72	0	43,23	0	38	2,00E-147
<i>pvdT</i>	5851186 - 5853156	71,23	0	70,81	0	72,21	0	72,28	0
<i>pvdR</i>	5850003 - 5851184	68,59	3,00E-141	68,14	2,00E-133	68,85	2,00E-147	69,63	2,00E-147
<i>opmQ</i>	5853153 - 5854571	59,15	2,00E-144	56,18	8,00E-122	59,64	4,00E-143	58,07	2,00E-132
<i>pvdF</i>	/	Pas de similarité significative trouvée							
<i>pvdH</i>	5888096 - 5889487	80,61	0	94,77	0	78,52	0	80,35	0
<i>pvdE</i>	5860049 - 5861698	69,95	0	75,05	0	72,53	0	71,61	0
<i>pvdN</i>	2522098 - 2523063*	23,38*	2,00E-07	Pas de similarité significative trouvée		24,55*	1,00E-06	25*	5,00E-08
<i>pvdO</i>	5857766 - 5858641	68,16	5,00E-122	64,58	4,00E-120	70,88	3,00E-135	63,64	2,00E-122
<i>pvdP</i>	5856240 - 5856430	49	1,00E-143	48,39	2,00E-145	45,65	6,00E-132	45,71	2,00E-131
<i>pvdQ</i>	4734176 - 4736485	54,94	0	91,91	0	64,41	0	62,74	0
<i>mbtH</i>	5209118 - 5209339	88,73	2,00E-40	98,63	1,00E-46	84,72	7,00E-40	87,32	3,00E-40
<i>pvdG</i>	5208402 - 5209121	46,9	8,00E-54	92,05	5,00E-136	69,57	1,00E-91	58,56	3,00E-67
<i>pvdM</i>	5856387 - 5857769	58,15	2,00E-167	59,42	8,00E-167	60,49	1,00E-168	57,74	4,00E-161
<i>pvdS</i>	5917293 - 5917823	89,93	2,00E-101	94,89	1,00E-111	86,05	3,00E-100	81,56	4,00E-98
<i>ptaA</i>	2347611 - 2348657*	29,97	9,00E-20	/		/		30,56	1,00E-27

Sur la base de ces résultats, les gènes peuvent être classés en trois grandes catégories. La première rassemble les gènes qui ont une identité supérieure à 58% pour au moins deux

des souches qui ont servi pour la comparaison. Il s'agit de gènes : *pvdL*, *pvdA*, *pvdT*, *pvdR*, *opmQ*, *pvdH*, *pvdE*, *pvdO*, *mbtH*, *pvdM*, et *pvdS*. Ces gènes codent des enzymes dont les fonctions seraient peu susceptibles d'être influencées par la structure peptidique de la pyoverdine produite. C'est le cas du gène *pvdL* qui code la synthétase qui synthétise le précurseur du chromophore commun à toutes pyoverdines ou encore les gènes qui codent les enzymes de modifications de acides aminés incorporés tels que *pvdA* ou *pvdH*.

Le deuxième groupe reprend les gènes qui ont une identité entre 38 et 49 %. Les gènes appartenant à ce groupe codent les synthétases de la partie peptidique variable des pyoverdines (*pvdI*, *pvdJ* et *pvdG*) et le gène codant le récepteur aux ferri-pyoverdines (*fpvA*) qui présente souvent une certaine spécificité pour la structure peptidique de la pyoverdine. Le gène *pvdP*, avec des pourcentages de similarité qui varient entre 45% et 49% fait également partie de ce groupe. Ce résultat suggère une différence fonctionnelle qui pourrait s'expliquer par le rôle joué par la protéine PvdP dans la synthèse de l'isopyoverdine. Cette enzyme est responsable des premières étapes de la maturation du chromophore de la pyoverdine et de sa cyclisation. Il catalyse la transformation de la ferribactine en dihydropyoverdine. A noter que le gène *pvdO* qui intervient également dans la maturation du chromophore, codant pour une enzyme catalysant l'oxydation finale de la dihydropyoverdine pour former la pyoverdine appartient au premier groupe. Cela pourrait sous-entendre qu'il serait fonctionnel sur une dihydroisopyoverdine tout comme sur une dihydroisopyoverdine.

Le troisième groupe rassemble des gènes qui ne seraient pas présent dans le génome de *Pseudomonas putida* BTP1 tel que le gène *pvdN*. Ce gène permet de convertir l'acide glutamique de la chaîne secondaire en succinamide. Ce gène est présent dans l'opéron *pvdMNO*, ils sont donc l'un à côté de l'autre. Hors en analysant le génome séquencé, le gène *pvdM* et *pvdO* sont retrouvés mais le gène sensé être *pvdN* n'apparaît pas et aucun des gènes adjacents ne possèdent la fonction de ce dernier. De plus, lors de la comparaison de la séquence de *pvdN* provenant d'une autre souche de *Pseudomonas* avec le génome de BTP1, un résultat correspond mais avec un pourcentage d'identité faible (environ 20%) et une e-value plus importante. De plus, la position du gène obtenu est fortement éloignée de celle du gène *pvdM* et *pvdO*. Un autre membre de ce groupe serait le gène *ptaA* responsable de la conversion de l'acide glutamique en acide α -ketoglutarique^[4,85]. Les résultats obtenus ont un pourcentage d'identité faible (environ 30%). De plus, comme pour *pvdN*, la position du gène obtenu est éloignée des autres gènes intervenant dans le mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine. D'après Ringel et al. (2017), le gène *ptaA* n'est pas souvent présent dans le génome de *Pseudomonas putida* et de *Pseudomonas fluorescens*^[85]. Ce gène pourrait donc ne pas être présent dans le génome de *Pseudomonas putida* BTP1. Un dernier résultat obtenu est l'absence du gène *pvdF* codant pour une enzyme permettant la formylation d'acide aminé. Cette hypothèse est confirmée par Yétérián (2010) qui stipule que ce gène serait présent en majorité dans le génome de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*^[29]. Ce sera aussi confirmé dans la seconde partie de l'analyse bio-informatique portant sur les chaînes peptides des pyoverdines car la chaîne peptidique de BTP1 ne possède aucun acide aminé ayant subi une réaction de formylation. *fluorescens*^[85]. Ce gène pourrait donc ne pas être présent dans le génome de *Pseudomonas putida* BTP1.

5.1.2. Structure de la tyrosinase PvdP de *Pseudomonas putida* BTP1

La tyrosinase PvdP est une enzyme possédant un centre di-cuivré de type 3, typique des tyrosinases, impliquant six histidines hautement conservées. La tyrosinase PvdP est unique en son genre comparée aux autres tyrosinases connues (humain, bactérie, pomme de terre, etc). Selon Nadal-Jimenez et al, la tyrosinase PvdP ferait partie d'une famille de

tyrosinase exclusive aux *Pseudomonas* fluorescentes de par un faible pourcentage d'identité avec les autres tyrosinases connues^[33,34].

La tyrosinase possède deux domaines: un domaine barillet β à l'extrémité N-terminale dont la fonction est encore inconnue et un domaine tyrosinase à l'extrémité C-terminale confèrent l'activité de l'enzyme. Ces deux sont connectés par une courte liaison. L'interface entre ces deux domaines est composée d'une séquence continue reprenant deux hélices α ainsi que d'autres résidus pour donner une structure en forme de L qui correspond au barillet β sur sa face non exposée au solvant^[33].

5.1.2.1. Structure primaire

Pour étudier la structure de la tyrosinase PvdP de BTP1, un premier travail a été réalisé sur sa structure primaire en la comparant avec celle d'autres tyrosinase PvdP. L'outil bio-informatique Clustal W a été utilisé pour réaliser des alignements multiples entre ces différentes séquences (Tableau n°17). Les deux domaines ont aussi été séparés en leur séquence primaire respective pour réaliser un alignement multiple entre domaine de différentes souches (Tableau n°18 et 19).

Tableau n°17 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issue de l'alignement multiple de différentes séquences primaires de PvdP.

	BTP1	Pf-5	PA14	PAO1	UW4	KT2440	F1	HB3267	GB-1
<i>Pseudomonas putida</i> BTP1	100	48,01	47,57	47,57	45,49	47,46	47,93	47,27	48,5
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	48,01	100	61,5	61,5	58,83	59,07	58,5	59,25	58,19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	47,57	61,5	100	100	64,25	61,6	60	61,75	62,01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	47,57	61,5	100	100	64,25	61,6	60	61,75	62,01
<i>Pseudomonas sp.</i> UW4	45,49	58,83	64,25	64,25	100	69,59	68,72	70,28	69,59
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	47,46	59,07	61,6	61,6	69,59	100	78,89	81,65	81,12
<i>Pseudomonas putida</i> F1	47,93	58,5	60	60	68,72	78,89	100	85,98	85,82
<i>Pseudomonas putida</i> HB3267	47,27	59,25	61,75	61,75	70,28	81,65	85,98	100	93,69
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	48,5	58,19	62,01	62,01	69,59	81,12	85,82	93,69	100

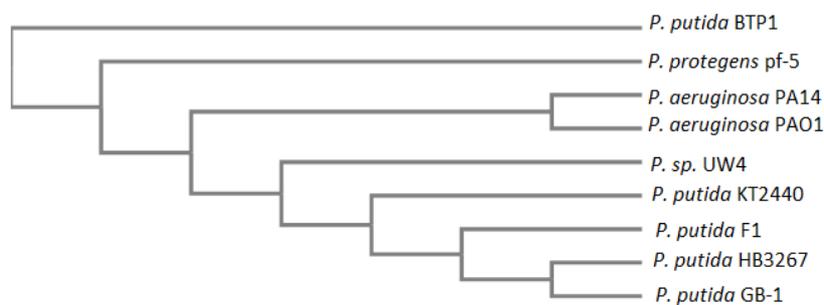


Figure n°18 - Phylogramme représentant les relations de parentés entre les différentes souches de *Pseudomonas* selon la séquence primaire de PvdP.

Tableau n°18 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issue de l'alignement multiple de séquence primaire du domaine tyrosinase à l'extrémité C-terminale de différentes PvdP.

	BTP1	Pf-5	PA14	PAO1	UW4	KT2440	F1	HB3267	GB-1
Pseudomonas putida BTP1	100	54,88	55,52	55,52	54,05	55,72	55,26	54,65	55,56
Pseudomonas protegens Pf-5	54,88	100	70,12	70,12	65,24	68,9	66,77	67,99	67,07
Pseudomonas aeruginosa PA14	55,52	70,12	100	100	70,27	69,28	66,67	67,57	68,17
Pseudomonas aeruginosa PAO1	55,52	70,12	100	100	70,27	69,28	66,67	67,57	68,17
Pseudomonas sp. UW4	54,05	65,24	70,27	70,27	100	78,61	77,78	80,48	79,88
Pseudomonas putida KT2440	55,72	68,9	69,28	69,28	78,61	100	84,64	86,75	87,35
Pseudomonas putida F1	55,26	66,77	66,67	66,67	77,78	84,64	100	87,69	88,29
Pseudomonas putida HB3267	54,65	67,99	67,57	67,57	80,48	86,75	87,69	100	95,5
Pseudomonas putida GB-1	55,56	67,07	68,17	68,17	79,88	87,35	88,29	95,5	100

Tableau n°19 - Matrice du pourcentage d'identité (%) issue de l'alignement multiple de séquence primaire du domaine barillet β à l'extrémité N-terminale de différentes PvdP.

	BTP1	Pf-5	PA14	PAO1	UW4	KT2440	F1	HB3267	GB-1
Pseudomonas putida BTP1	100	36,68	34,17	34,17	31,16	33,67	35,68	34,85	36,68
Pseudomonas protegens Pf-5	36,68	100	47,83	47,83	48,53	43,48	45,41	45,05	43,84
Pseudomonas aeruginosa PA14	34,17	47,83	100	100	54,15	49,52	49,04	51,96	51,96
Pseudomonas aeruginosa PAO1	34,17	47,83	100	100	54,15	49,52	49,04	51,96	51,96
Pseudomonas sp. UW4	31,16	48,53	54,15	54,15	100	55,12	53,66	53,2	52,71
Pseudomonas putida KT2440	33,67	43,48	49,52	49,52	55,12	100	69,71	72,91	70,94
Pseudomonas putida F1	35,68	45,41	49,04	49,04	53,66	69,71	100	82,76	81,77
Pseudomonas putida HB3267	34,85	45,05	51,96	51,96	53,2	72,91	82,76	100	90,78
Pseudomonas putida GB-1	36,68	43,84	51,96	51,96	52,71	70,94	81,77	90,78	100

Ce qu'on remarque en effectuant un alignement entre ces différentes séquences primaires de PvdP est que le domaine C-terminal de la tyrosinase PvdP de BTP1 possède beaucoup plus de similitudes (50% de pourcentage d'identité) que le domaine N-terminal (30% de pourcentage d'identité) par rapport aux autres souches.

De plus, l'outil Clustal W a aussi la particularité de créer un phylogramme, un diagramme en forme d'arbre montrant les relations de parenté entre différents organismes (Figure n°18). Sur base du dendrogramme, la séquence primaire de l'enzyme PvdP de la souche BTP1 se distingue des autres souches de *Pseudomonas*. Ce qui pourrait indiquer que la tyrosinase PvdP de BTP1 pourrait former un groupe à part entière dans la famille des tyrosinase PvdP des *Pseudomonas* fluorescents déjà considéré comme unique en son genre^[33].

5.1.2.2. Structure secondaire

La structure secondaire d'une protéine consiste à décrire le repliement local de la chaîne principale. Il existe différentes structure secondaire : les hélices α , les feuillets β ou les structure en coude. Les feuillets β peuvent être antiparallèles: deux brins différents ou éloignés l'un face à l'autre et progressent dans le sens opposé ou parallèles.

Pour déterminer la structure secondaire d'une protéine, l'outil PsiPred est utilisé pour prédire la structure. Une prédiction a été effectuée sur le domaine N-terminal et C-terminal de l'enzyme PvdP de *Pseudomonas putida* BTP1 ainsi que sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* PA14 utilisée comme référence car l'enzyme PvdP de cette souche a été cristallisée (figure n°19 et 20). Sur base des résultats, des différences ont été observées chez les deux domaines. D'abord, pour le domaine C-terminale, la référence possède un brin β et une hélice α supplémentaire comparé à la souche BTP1. Tandis que pour le domaine N-terminal, des hélices α sont présentes mais pas au même endroit.



Figure n°19 - Représentation de la prédiction de la structure secondaire du domaine C-terminal de *Pseudomonas putida* BTP1 (haut) et de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (bas)



Figure n°20 - Représentation de la prédiction de la structure secondaire du domaine N-terminal de *Pseudomonas putida* BTP1 (haut) et de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (bas)

5.1.2.3. Acides aminés importants dans la structure de la tyrosinase PvdP

L'article Poppe et al. (2018) peut aider à comprendre pourquoi l'enzyme PvdP de BTP1 est différente par rapport aux autres tyrosinases PvdP car ce dernier a réussi à cristalliser la tyrosinase PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 et obtenir sa structure tertiaire (Figure n°21). Il décrit les deux domaines de la tyrosinase en mettant en valeur quelques résidus importants. Les résidus cités dans cet article pour le domaine C-terminal sont identiques pour ceux de BTP1 mais en ce qui concerne le domaine N-terminal, des différences apparaissent (Tableau n°20). Dans la séquence primaire de PvdP de PA14, il y aurait

une His142 et un Trp128 au niveau du domaine barillet β N-terminal mais les acides aminés à ces positions chez la tyrosinase PvdP de BTP1 ne correspondent pas. Une tyrosine remplace l'histidine et une leucine est à la place du tryptophane. Le fait qu'une leucine, un acide aminé non polaire aliphatique de petite taille (2-3 carbones) remplace le tryptophane, acide aminé non polaire aromatique de grande taille, est unique et ne se retrouve que chez BTP1. Tandis que le changement de l'histidine en tyrosine se produit dans d'autres séquences primaires de PvdP.

Tableau n°20 - Acides aminés décrit dans l'article Poppe et al., 2018 ayant une importance dans la structure de la tyrosinase PvdP

	AA cité dans article (référence PA14)	Fonction	Similarité avec BTP1 ?	Remarque	
Domaine N terminal	His142	Seul AA hydrophile à l'intérieur du barillet bêta	Non	Présence d'une tyrosine à la place mais pas la seule souche à avoir cet AA à la place	
	Trp128	Bloque le passage vers l'intérieur du barillet	Non	Présence d'une leucine à la place et uniquement chez BTP1	
Domaine C-terminale	His216	Forment le site actif CuA	Oui	Arrangement typique pour les protéines de cuivre de type 3	
	His220				
	His271				
	His375				
	His379	Forment le site actif CuB	Oui		
	His432				
	Phe267/His271	/	Oui		Le domaine tyrosinase de PvdP à une haute conservation de résidu phénylalanine 4 positions en amont de la troisième histidine pour chaque site actif
	Phe428/His432	/	Oui		
	Pro426	Permettrait la formation d'une courbure de 90° après l'hélice alpha15	Oui		Se trouve à l'extrémité N-terminal de l'hélice alpha16
	Asp436	Intéraction entre les deux AA	Oui		Se trouve au milieu de l'hélice alpha16
Arg272	Oui		Se trouve au niveau de l'hélice alpha8		
Tyr531	Permet de bloquer le site actif	Oui			

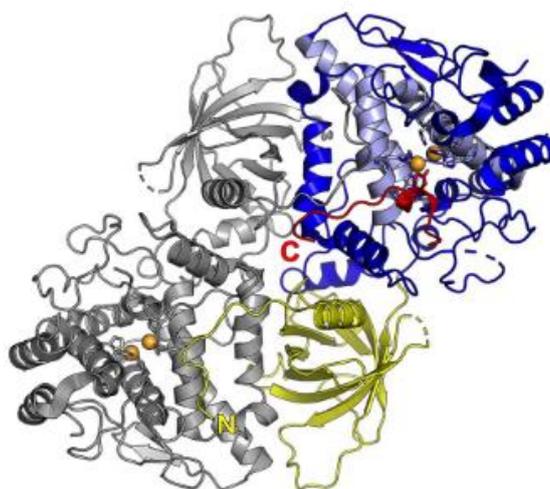


Figure n°21 – Représentation de la structure générale de la tyrosinase PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Partie jaune = domaine N-terminal. Partie bleue = domaine C-terminal

5.1.3. Analyse des chaînes peptidiques de (iso)pyoverdines produites par *Pseudomonas*

Cette seconde partie va permettre d'analyser la chaîne peptidique de la souche BTP1 et de la comparer à d'autres chaînes peptidiques de pyoverdines et isopyoverdines produites par différentes souches de *Pseudomonas*. Le but de cette analyse est de pouvoir identifier des chaînes peptidiques se rapprochant le plus de celle de BTP1. Cela aura son importance pour la seconde partie de ce travail concernant l'étude du rôle de PvdP.

L'outil bio-informatique utilisé dans cette partie est la plateforme NORINE. Cette plateforme comprend une base de données relative aux peptides non ribosomiques, elle en regroupe pas moins de 1740^[44]. Elle comprend aussi différents algorithmes permettant de calculer la similitude entre deux chaînes peptidiques. Le « Monomer composition fingerprint search (MCFP) » a été utilisé pour effectuer la comparaison. Le MCFP est représenté par un

vecteur entier dans lequel chaque élément représente la présence ou l'absence d'un monomère spécifique. Un système de recherche de similarité (TAN) est utilisé pour prédire la similarité entre deux peptides. Son coefficient varie entre 0 (peptide complètement différent) à 1 (peptide identique).

5.1.3.1. Chaîne peptidique de *Pseudomonas putida* BTP1

La chaîne peptidique de *Pseudomonas putida* BTP1 est composée de six acides aminés. Sur ces six acides aminés (Tableau n°21), cinq d'entre eux sont polaires tandis que seule l'alanine (Ala) est apolaire.

Tableau n°21 – Acides aminés composant la chaîne peptidique de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1

Position chaîne peptidique	Acide aminé	Caractéristique
1	Acide aspartique	Polaire ; ionisable ; acide
2	Alanine	Apolaire ; aliphatique ; neutre
3	Acide aspartique	Polaire ; ionisable ; acide
4	D-N5-hydroxy-N5-acétyl-Ornithine	Pas coder par le code génétique ; polaire
5	Sérine	Polaire ; neutre
6	L-N5-OH-cyclo-Ornithine	Cyclisé ; polaire

Avant de pouvoir comparer la chaîne peptidique BTP1 avec les différentes chaînes d'autres souches de *Pseudomonas*, un recensement a dû être réalisé (Tableau n°22). Une centaine de souches produisant de la pyoverdine ont été répertoriées. Les différentes chaînes peptidiques ont été comparées en utilisant la méthode MCFS cité plus haut. Les résultats obtenus permettent de faciliter le choix de la souche pour la partie complémententation.

Tableau n°22 - Comparaison de la chaîne peptidique de *Pseudomonas putida* BTP1 avec les chaînes peptidiques provenant d'autres souches produisant de l'(iso)pyoverdine en utilisant l'algorithme MCFS. **Gras** = souche produisant de l'isopyoverdine ; **surligné** = souches présentes dans la collection du MiPI ; * = pas d'information sur les épimérisations

Espèce	Souche	Chaîne peptidique (R1)	Nombre de monomère	Acide Aminé en commun	Norine MCFS
<i>Pseudomonas putida</i>	BTP1 (CFML 90-40)	Asp - Ala - Asp - (D-Ac-OH-Orn) - Ser - (OH-cOrn)	6	/	
<i>Pseudomonas putida</i>	GB1	Asp, eLys, D-OH-Asp, Ser, Ala, aThr, D-Lys, OH-cOrn	8	Asp/Ser/Ala/OH-cOrn	0,417
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PL8	D-Lys - D-AcOHOrn - Ala - Gly - DThr - Ser - cOHOrn	7	Ser/Ala/OH-cOrn/D-Ac-OH-Orn	0,4
<i>Pseudomonas sp.</i>	LBSA1*	Asp - Arg - AcOHOrn - Lys - Ser - Asp - cOHOrn	7	Asp/Ser/OH-cOrn	0,4
<i>Pseudomonas putida</i>	L1	Asp - eLys - D-OHAsp - Ser - D-aThr - Ala - Thr - D-Lys - cOHOrn	9	Asp, Ser, Ala, OH-cOrn	0,381
<i>Pseudomonas putida</i>	HB3267	Asp, Lys, D-OH-Asp, Ser, Ala, Thr, Thr, D-Thr, OH-cOrn	9	Asp/Ser/Ala/OH-cOrn	0,381
<i>Pseudomonas putida</i>	W15Oct28	Asp, Ala, D-A-OH-Orn, Thr, Gly, (Thr, Hse, D-OH-Asp, Ser, Hse, Ser)	11	Asp/Ala/D-Ac-OH-Orn	0,367
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G153*	Ser - Lys - Ala - Ser - Ser - AcOHOrn - Ser - Ser - cOHOrn	9	Ser/Ala/OH-cOrn	0,36
<i>Pseudomonas putida</i>	CFML 90-44	Asp - Lys - (D-Ac-OH-Orn) - Thr - Ser - Gly - Ser - Ser - (D-OH-cOrn)	10	Asp/D-Ac-OH-Orn/Ser	0,35
<i>Pseudomonas putida</i>	G4R	Asp - Orn - (D-OHAsp-Dab) - Gly - Ser - cOHOrn	7	Asp, Ser, OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas putida</i>	11370	Asp - eLys - DOHAsp - D-Ser - Ala - D-Ser - cOHOrn	7	Asp, Ala, OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	Asp,Orn,(D-OH-Asp, Dab), Gly,Ser,OH-cOrn	7	Asp/Ser/OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas putida</i>	BIRD-1	Asp,Orn,(D-OH-Asp, Dab), Gly,Ser,OH-cOrn	7	Asp/Ser/OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas putida</i>	S12	Asp,Orn,(D-OH-Asp, Dab), Gly,Ser,OH-cOrn	7	Asp/Ser/OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PL7	D-Ser - AcOHOrn - Ala - Gly - DThr - Ala - cOHOrn	7	Ala/OH-cOrn	0,323
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633	Asp - eLys - D-OHAsp - Ser - Thr - D-Ala - D-Glu - Ser - cOHOrn	9	Asp, Ser, OH-cOrn	0,315
<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudobactin 589A	Asp,Lys,D-OH-Asp,Ser,Thr,D-Ala,D-Glu,Ser,OH-cOrn	9	Asp/Ser/OH-cOrn	0,315
<i>Pseudomonas sp.</i>	HR6*	Asp - eLys - OHAsp - Ser - Ser - Thr - Thr - Thr - cOHOrn	9	Asp/Ser/OH-cOrn	0,315
<i>Pseudomonas putida</i>	CMFL 90-51	Asp - eLys - D-OHAsp - Ser - Gly - D-aThr - Lys - cOHOrn	8	Asp, Ser, OH-cOrn	0,295
<i>Pseudomonas putida</i>	CFBP2461	Asp - Lys - D-OHAsp - Ser - D-aThr - D-Ala - Thr - D-Lys - cOHOrn	9	Asp,Ser, OH-cOrn	0,271
<i>Pseudomonas putida</i>	WCS358	Asp, eLys, D-OH-Asp, Ser, D-aThr, D-Ala, Thr, D-Lys, OH-cOrn	9	Asp/Ser/OH-cOrn	0,271
<i>Pseudomonas putida</i>	GS43*	Lys - OHAsp - Ser - Ser - Ser - cOHOrn	6	Ser, OH-cOrn	0,266
<i>Pseudomonas sp.</i>	IB3	Ser - Ala - Thr - Lys - Orn - AcOHOrn - Thr - Thr - Ala - Ser - Thr - Ala - Ala - cOHOrn	14	Ser/Ala/OH-cOrn	0,266
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TR133	Asp-D-FoOHOrn-Lys-Thr-Ala-Ala-D-FoOHOrn-Ala	8	Asp/Ala	0,265
<i>Pseudomonas putida</i>	S16	Asp, eLys, D-OH-Asp, D-Ser, OH-cOrn	5	Asp/OH-cOrn	0,252
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl W / 2798	(Ser - Dab) - Gly - Ser - DOHAsp - DAla - Gly - Ala - Gly - cOHOrn	10	Ser/Ala/OH-cOrn	0,251
<i>Azotobacter vinelandii</i>	DJ	Asp, D-Ser, Hse, Gly, D-OH-Asp, Ser, Cit, Hse, D-Ac-OH-Orn - Hse	10	Asp/Ser/D-Ac-OH-Orn	0,251
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P19	D-Ser - DAcOHOrn - Ala - Gly - [D-Ser - Ser - DOHAsp - Thr]	8	D-Ac-OH-Orn/Ala/Ser	0,25
<i>Pseudomonas sp.</i>	G85*	Ser - Lys - OHAsp - Ser - Orn - Ser - cOHOrn	7	Ser/OH-cOrn	0,242
<i>Pseudomonas putida</i>	90-136*	Ser - Lys - Ser - Ser - Thr - Thr - AcOHOrn - Ser - Ser - cOHOrn	10	Ser, OH-cOrn	0,235
<i>Pseudomonas putida</i>	G168	Ser - Lys - Ser - Ser - Thr - Thr - AcOHOrn - Ser - Ser - cOHOrn	10	Ser/OH-cOrn	0,235
<i>Pseudomonas putida</i>	pseudobactin 36167-I	Ser,Ala,Ac-OH-Orn,Gly,Ala,OH-Asp,Ser,Thr	8	Ser/Ala	0,232
<i>Pseudomonas putida</i>	pseudobactin 36167-II	Ser,Ala,Ac-OH-Orn,Gly,Ala,OH-Asp,Ser,Thr	8	Ser/Ala	0,232
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CHAO	Asp - DFOHOOrn - Lys - [Thr - Ala - Ala - DFOHOOrn - Lys]	8	Asp/Ala	0,232
<i>Pseudomonas putida</i>	Thai*	(Ser-Dab) - Thr - Ser - AOHOrn - cOHOrn	6	Ser, OH-cOrn	0,228
<i>Pseudomonas putida</i>	LS46	Asp, D-Orn, D-Dab, Thr, Gly, Ser	6	Asp/Ser	0,228
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pseudobactin A225-I	Ser,Ala,Ac-OH-Orn,Gly,Ser,OH-Asp,Ser,Thr	8	Ser/Ala	0,223
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pseudobactin A225-II	Ser,Ala,Ac-OH-Orn,Gly,Ser,OH-Asp,Ser,Thr	8	Ser/Ala	0,223
<i>Pseudomonas putida</i>	BTP16	Asp - D-OHOrn-C4:0-OH(3) - D-Dab - Thr - Gly - Ser - Ser - OHAsp - aThr	9	Asp, Ser	0,215
<i>Pseudomonas putida</i>	B6-2	Asp, D-Orn, D-Dab, Thr, Gly, Ser, OH-Asp	7	Asp/Ser	0,208
<i>Pseudomonas sp.</i>	2908*	D-Ser - Orn - OHAsp - Ser - Ser - D-Ser - cOHOrn	7	Ser/OH-cOrn	0,208
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PfO-1*	Ala - AcOHOrn - Orn - Ser - Ser - Ser - Arg - OHAsp - Thr	9	Ala/Ser	0,206
<i>Pseudomonas putida</i>	CFML 90-33	Asp - Lys - Thr - (D-OH-Asp) - Thr - (D-aThr) - (OH-cOrn)	7	Asp/OH-cOrn	0,192
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 39167	D-Ser - D-Ac-OH-Orn - Ala - Gly - (D-Ser - Ala - OH-Asp - Thr)	8	Ala, D-Ac-OH-Orn	0,192
<i>Pseudomonas putida</i>	pseudobactin A214	D-Ser,D-Ac-OH-Orn,Ala,Gly,D-Ser,Ala,OH-Asp,Thr	8	D-Ac-OH-Orn/Ala	0,192
<i>Pseudomonas putida</i>	ND6	Asp, D-Orn, D-Dab, Gly, D-Ser, Ser, OH-Asp, Thr	8	Asp,Ser	0,192
<i>Pseudomonas protegens</i>	Pf-5	Asp - DFOHOOrn - Lys - [Thr - Ala - DAla - DFOHOOrn - Lys]	8	Asp/Ala	0,192
<i>Pseudomonas putida</i>	CS111	Ala, Lys, Thr,Ser,OH-Orn,OH-Orn	6	Ala/Ser	0,182
<i>Pseudomonas putida</i>	W619	Ser, X, OH-Asp, Gly, Thr, D-Ser, OH-cOrn	7	Ser, OH-cOrn	0,182
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17470	D-Ser, eLys, OH-His, D-aThr, Ser, OH-cOrn	6	Ser/OH-cOrn	0,182
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9AW	D-Ser - eLys - OHHis - DThr - Ser - cOHOrn	6	Ser/OH-cOrn	0,182
<i>Pseudomonas sp.</i>	UW4	D-Ser, Lys, D-OH-His, D-Thr, Ser, OH-cOrn	6	Ser/OH-cOrn	0,182
<i>Pseudomonas putida</i>	3b	Asp - (AOHOrn-Dab) - Thr - D-Ala - Thr - Thr - D-Gln - cOHOrn	9	Asp, OH-cOrn	0,178
<i>Pseudomonas putida</i>	putC	Asp - D-OHbutOHOrn - D-Dab - Thr - Gly - D-Ser - Ser - OHAsp - Thr	9	Asp, Ser	0,178
<i>Pseudomonas putida</i>	C	Asp - D-OHOrn-C4:0-OH(3) - D-Dab - Thr - Gly - D-Ser - Ser - OHAsp - Thr	9	Asp, Ser	0,178
<i>Pseudomonas putida</i>	SJTE-1	Asp, D-Orn, D-Dab, Thr, Gly, D-Ser, Ser, OH-Asp, Thr	9	Asp/Ser	0,178
<i>Pseudomonas putida</i>	F1	Asp, D-Orn, D-Dab, Thr, Gly, D-Ser, Ser, OH-Asp, Thr	9	Asp/Ser	0,178
<i>Pseudomonas sp.</i>	G76*	Ser - Ser - FoOHOrn - Ser - Ser - [Lys - Ser - FoOHOrn]	8	Ser	0,175
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27-853 ou T II	Dser - DFOHOOrn - Orn - Gly - D-aThr - Ser - cOHOrn	7	Ser, OH-cOrn	0,167
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	G173	Dser - Ala - AcOHOrn - (Orn - Dasp - AcOHOrn - Ser)	7	Ala/Ser	0,167
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gwose /Pfl 1.2	Ser - Thr - D-Ser - Orn - OHAsp - (Gln-Dab) - Ser - DThr - cOHOrn	10	Ser/OH-cOrn	0,166
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GM/ PflII	DAla - DLys - Gly - Gly - DOHAsp - DGln - D-Ser - Ala - DAla - DAla - Ala - cOHOrn	12	Ala/OH-cOrn	0,146
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1547	D-Ser - Lys - DAla - AcOHOrn - Thr - DAla - Gly - DGln - DAla - Ser - Ser - cOHOrn	12	Ser/OH-cOrn	0,146
<i>Pseudomonas putida</i>	BIP7	D-ser - ser - FoOHOrn - ser - ser - lys - FoOHOrn - lys - ser	9	Ser	0,143
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	95-275	D-Ser - Ser - FoOHOrn - Ser - Ser - [Lys - FoOHOrn - Lys - Ser]	9	Ser/	0,143
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2392	D-Lys-D-AcOHOrn-Gly-D-aThr-Thr-Gln-Gly-D-Ser-cOHOrn	9	D-Ac-OH-Orn/OH-cOrn	0,143
<i>Pseudomonas putida</i>	TRO1	Asp, D-Orn, D-Dab, Thr, Gly	5	Asp	0,134
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50106*	Ser - Lys - Gly - FoOHOrn - Ser - Ser - Gly - [Orn - FoOHOrn - Ser]	10	Ser	0,133
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl 1.3	DAla - DLys - Gly - Gly - OHAsp - (DGln-Dab) - Gly - Ser - cOHOrn	10	Ser/OH-cOrn	0,133
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl 17400	DAla - DLys - Gly - Gly - OHAsp - (DGln-Dab) - Thr - Ala - cOHOrn	10	Ser/Ala/OH-cOrn	0,133
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2192	D-Ser,Lys,Ser,D-Ser,Thr,D-Ser,Ac-OH-Orn,Thr,D-Ser,OH-cOrn	10	Ser/OH-cOrn	0,133
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	51W	DAla - DLys - Gly - Gly - DOHAsp - DGln - D-Ser - Ala - Gly - DThr - cOHOrn	11	Ala/OH-cOrn	0,125
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pseudobactin A	Lys,D-OH-Asp,Ala,D-aThr,Ala,D-OH-cOrn	6	Ala	0,122
<i>Pseudomonas sp.</i>	B10	eLys - DOHAsp - Ala - DThr - Ala - DcOHOrn	6	Ala	0,122
<i>Pseudomonas syringae</i>	19310	Lys,D-OH-Asp,Thr,Thr,Ser,D-OH-Asp,Ser	7	Ser	0,112
<i>Pseudomonas sp.</i>	96-312	D-Ser - Ser - FoOHOrn - [Lys - FoOHOrn - Lys - Ser]	7	Ser	0,112
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	I - III	Asn - DFOHOOrn - Orn - Gly - DaThr - Ser - cOHOrn	7	Ser, OH-cOrn	0,104
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl "ng"	Asn - DFOHOOrn - Lys - [Thr - Ala - Ala - DFOHOOrn - Lys]	8	Ala	0,104
<i>Pseudomonas sp.</i>	96-318	D-Ser - Orn - FoOHOrn - D-Ser - Ser - [Lys - FoOHOrn - Ser]	8	Ser	0,104
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl 18.1	D-Ser - Lys - Gly - FoOHOrn - Ser - D-Ser - Gly - [Lys - DFOHOOrn - Ser]	11	Ser	0,091
<i>Pseudomonas sp.</i>	GM78	D-Ala, Lys, Thr, D-Ser, X, OH-cOrn	6	OH-cOrn	0,091
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl 12	D-Ser - Lys - Gly - FoOHOrn - D-Ser - Ser - Gly - [Lys - DFOHOOrn - Glu - Ser]	11	Ser	0,085
<i>Azomonas macrocytogeneses</i>		Hse,D-Hse,Dab,D-Ac-OH-Orn,D-Ser,Ac-OH-Orn	7	D-Ac-OH-Orn	0,083
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ps4a / SB83	DAla - Lys - Thr - D-Ser - AcOHOrn - cOHOrn	6	OH-cOrn	0,083
<i>Pseudomonas syringae</i>	4a	D-Ala,Lys,Thr,D-Ser,Ac-OH-Orn,OH-cOrn	6	OH-cOrn	0,083
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pfl 13525	Dser - Lys - Gly - FoOHOrn - (Lys - DFOHOOrn - Ser)	7	Ser	0,077
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A506	D-Ser - Lys - Gly - FoOHOrn - [Lys - FoOHOrn - Ser]	7	Ser	0,077
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WCS374	Ser,Lys,Gly,Fo-OH-Orn,(Lys,Fo-OH-Orn,Ser)	7	Ser	0,077
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BTP2	D-Ser - Val - OHAsp - Gly - Thr - D-Ser - cOHOrn	7	OH-cOrn	0,077
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBW25	D-Ser-Lys-Gly-FOHOOrn-(Lys-Ser-D-FoOHOrn)	7	Ser	0,077
<i>Pseudomonas sp.</i>	D47	D-Ser - Orn - FoOHOrn - [Lys - DFOHOOrn - Glu - Ser]	7	Ser	0,077
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A6	DLys - DAcOHOrn - Gly - DThr - Thr - Gln - Gly - D-Ser - DcOHOrn	9	D-Ac-OH-Orn	0,067
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pau	D-Ser,D-Ac-OH-Orn,Gly,D-aThr,Thr,Gln,Gly,D-Ser,D-OH-cOrn	9	D-Ac-OH-Orn	0,067
<i>Pseudomonas putida</i>	G172*	Ala - Lys - Dab - OHAsp - (Thr - Gly - OHAsp - Gly - Thr - Thr)	10	Ala	0,059
<i>Pseudomonas putida</i>	CSV86	D-Ser, Gln, Dab, D-Asp, Thr, Gly, D-Ser, D-Thr, Thr, Gly	10	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC15692 (PAO1)	Dser - Arg - Dser - FoOHOrn - (Lys - FoOHOrn - Thr - Thr)	8	aucun	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pa6	(Dser - Dab) - FoOHOrn - Gln - DGln - DFOHOOrn - Gly	7	aucun	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R'	(Dser - Dab) - FoOHOrn - D-Gln - FoOHOrn - Gly	6	aucun	/

5.2. Partie mutagénèse

5.2.1. Délétion du gène *pvdP* de la souche *Pseudomonas putida* BTP1

Suite aux résultats présentés dans la partie bio-informatique permettant de comparer les gènes de différentes souches entre eux, il a pu être démontré que le gène *pvdP* de BTP1 est différent du gène *pvdP* des autres souches de *Pseudomonas*.

L'objectif est donc de déléter le gène *pvdP* de la souche BTP1 par une méthode « Two-plasmid scarless deletion system »^[84]. Pour ce faire, une construction d'un vecteur plasmidique suicide (pEMG) chez *Pseudomonas* est nécessaire, possédant une cassette d'environ 1800 paires de bases présentant la mutation. Un fragment de cette cassette possède une parfaite homologie avec un fragment du génome de BTP1 ce qui va permettre d'effectuer un simple crossing over conduisant à l'intégration du plasmide pEMG dans le génome de BTP1. Ce qui inclut l'intégration de la résistance à la kanamycine ainsi que les différents sites de restriction I-Sec-1 utile pour la suite de la construction.

La dernière étape sera réalisée avec un second plasmide (pSWII), plasmide possédant une origine de réplication dans *Pseudomonas*. Ce plasmide contrôle l'expression de l'enzyme de restriction I-Sec-1. Cette enzyme va couper au niveau des sites de restrictions présent sur le plasmide pEMG. Une fois l'ADN clivé en I-Sec-1, ce qui se trouve entre les deux sites de restriction est éliminé, l'ADN chromosomique va devoir se réparer, pour que la cellule soit viable, par crossing over donnant deux résultats soit un retour à l'état sauvage soit la formation d'un mutant sans le gène *pvdP*.

5.2.1.1. Construction du plasmide pEMG-overlap

Après extraction de l'ADN génomique de *Pseudomonas putida* BTP1, les séquences nucléiques de 900 paires de bases entourant le gène *pvdP* ont été amplifiées en utilisant l'enzyme Q5 ainsi que les amorces : Up *pvdP* F Bam-H1/Up *pvdP* R et Dwn *pvdP* F/Dwn *pvdP* R Bam-H1 pour la région en amont et en aval respectivement. Les deux amplicons sont ensuite purifiés et fusionnés par PCR overlap grâce aux 25 nucléotides homologues au fragment Down placé sur l'amorce Up *pvdP* R (Figure n°22). Le plasmide pEMG ainsi que l'overlap sont digérés avec l'enzyme de restriction BAM-H1 puis lié avec l'ADN ligase T4. Le produit de ligation est ensuite introduit par transformation dans les cellules compétentes *E.coli* DH5a. Les transformants ayant poussés sur milieu LB + Km25 ont été criblés et validés par PCR sur colonies permettant de confirmer la présence du plasmide dans les cellules compétentes.

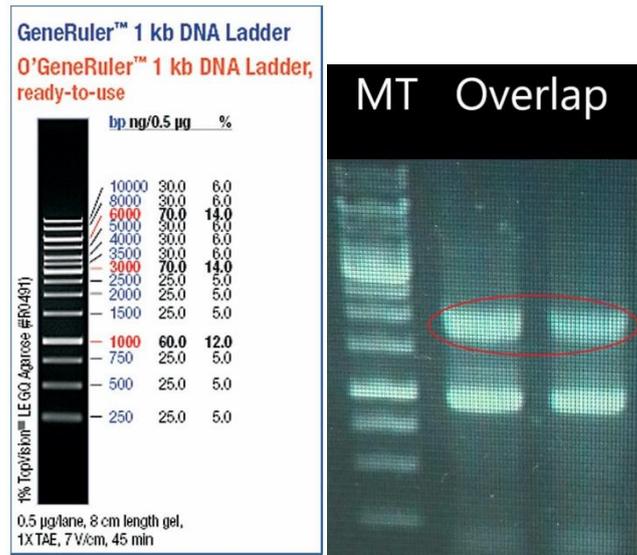


Figure n°22 – Migration sur gel d'agarose 1% des amplification par PCR overlap de la cassette de substitution avec ajout des amorces après 15 cycles ; L'encadré rouge correspond à l'amplicon overlap ayant une taille de 1,8kb. Les amorces utilisées sont: Up pvdP F Bam-H1/Dwn pvdP R Bam-H1. MT = marqueur de taille

Une conjugaison bactérienne est ensuite effectuée pour amener le plasmide contenant l'overlap dans le génome de la souche BTP1. Une PCR sur colonies a été effectuée pour vérifier la présence du gène de résistance à la kanamycine du plasmide dans le génome de la souche BTP1 (Figure n°23)



Figure n°23 – Migration sur gel d'agarose 1% des amplifications par PCR sur colonies de la cassette de résistance à la kanamycine. Les amplicons ont une taille de 800 paires de base. Les amorces utilisées sont : nptIIF/nptIIR. Les chiffres 1 à 6 correspondent aux colonies obtenues après conjugaison. MT = marqueur de taille.

5.2.1.2. Transformation dans *Pseudomonas putida* BTP1

Pour former le mutant *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP, il faut introduire un second plasmide, le plasmide pSWII, dans les clones BTP1 possédant l'ADN génomique du plasmide pEMG avec l'overlap. Le plasmide pSWII va contrôler l'expression d'enzymes de restriction pour couper l'ADN à l'endroit convenu. Cette transformation est réalisée par électroporation.

Les transformants présents sur le milieu KB + gentamycine sont sélectionnés sur base de plusieurs analyses. D'abord, l'une des premières est certainement la plus intuitive est la non-présence de fluorescence. Le gène *pvdP* est, en effet responsable des premières étapes de la maturation du chromophore de la pyoverdine, permettant l'apparition de la fluorescence. Donc si, le gène *pvdP* n'est plus présent, la fluorescence ne doit plus apparaître (Figure n°25) Mais cette confirmation n'est pas suffisante. Une autre manière de confirmer la délétion du gène *pvdP* est de réaliser une PCR sur colonies en amplifiant une séquence comprenant le gène *pvdP* (Figure n°24). Néanmoins, la validation du résultat la plus juste et fiable est de réaliser un séquençage. Ce dernier a permis de confirmer la non-présence du gène *pvdP* et l'absence d'erreur de séquence induite lors de la recombinaison par le fragment Up et Down dans l'ADN génomique des transformants.

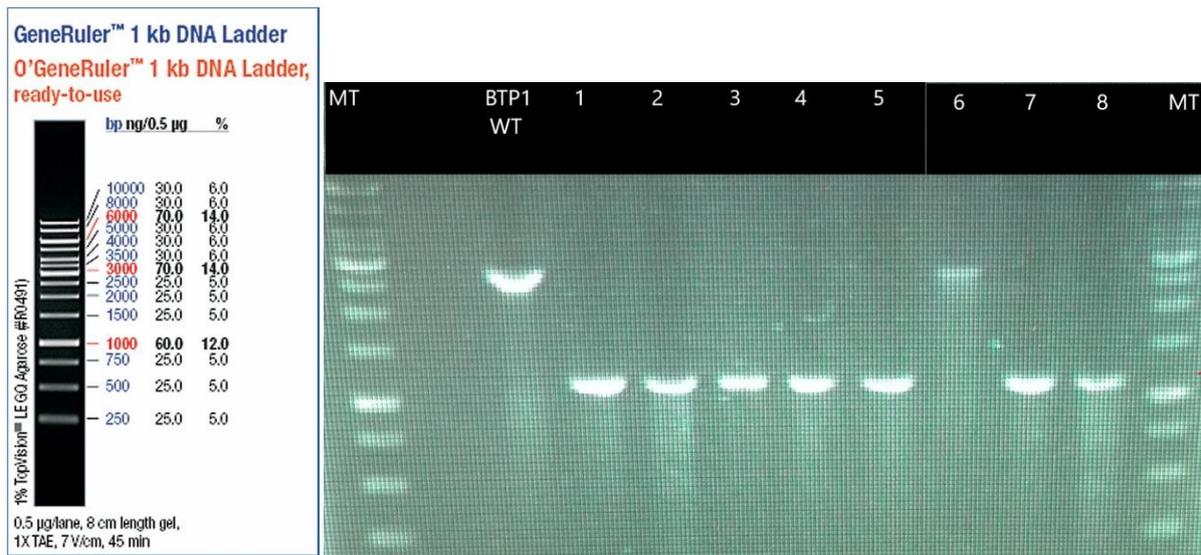


Figure n°24 – Migration sur gel d'agarose 1% des amplifications par PCR sur colonies pour confirmer la délétion du gène *pvdP*. Les chiffres 1 à 8 correspondent aux transformants obtenus après électroporation. Les amplicons ont une taille d'approximativement 1,1kb excepté pour le transformant 6 et la souche sauvage de *Pseudomonas putida* BTP1 qui ont une taille d'environ 2,6-2,7kb. La différence de taille entre les transformants (excepté le 6) et la souche sauvage est dû à la perte du gène *pvdP* qui fait 1,5-1,6kb. Les amorces utilisées sont : Seq *pvdP* F et Dwn *pvdP* R Bam-HI. MT = marqueur de taille.



Figure n°25 – Image obtenue sous lumière UV de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (gauche) et *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (droite)

5.2.2. Complémentation du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ avec le gène *pvdP* de *Pseudomonas putida* KT2440

5.2.2.1. Choix de la souche pour réaliser la complémentation

Sur la base des résultats obtenus avec l'outil NORINE (Tableau n°22) ainsi que la disponibilité des souches au sein du laboratoire du TERRA, La souche KT2440 a été choisie.

5.2.2.2. Construction du plasmide pME6010 – overlap

L'utilisation d'un promoteur fort, pTac, est utilisé pour surexprimer le gène *pvdP* et sa production de la tyrosinase PvdP. Ce promoteur a été amplifié à partir du plasmide pOT1e-M-cherry par l'enzyme Q5 avec les amorces : pTac F/pTac 25oe pvdP R.

Une première complémentation a d'abord été réalisée en réinsérant le gène *pvdP* de la souche BTP1 pour vérifier la méthodologie utilisée. Le gène *pvdP* de BTP1 a été amplifié avec les amorces : *pvdP* F/*pvdP* R Sac 1 avant d'être fusionné par overlap PCR avec la séquence du promoteur fort. En ce qui concerne le gène *pvdP* de la souche KT2440, les amorces: *pvdP* KT2440 F/*pvdP* KT2440 R Sac1 ont été utilisées pour l'amplifier. En réalisant un overlap, il a été possible de former une cassette de substitution former du promoteur fort, pTac, et du gène *pvdP* de KT2440 (Figure n°26).

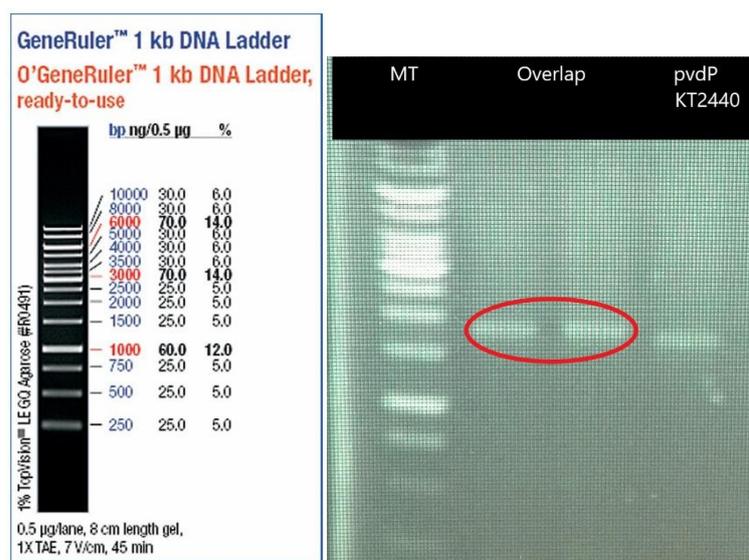


Figure n°26 – Migration sur gel d'agarose 1% de l'amplification par PCR de l'overlap (encadré rouge) avec ajout des amorces après 15 cycles et du gène *pvdP* de KT2440. Les amplicons ont une taille de 1,8kb et 1,6 kb respectivement. Les amorces utilisées sont : pTac F/*pvdP* KT2440 R Sac1 pour l'overlap et *pvdP* KT2440 F/*pvdP* KT2440 R Sac1 pour le gène *pvdP* de KT2440. MT = marqueur de taille.

Le plasmide réplcatif pME6010 est utilisé pour la complémentation. Le plasmide ainsi que l'overlap sont digérés en utilisant les enzyme X-Ba1 et Sac-1 puis lié avec l'ADN ligase T4. Le produit de ligation est ensuite introduit dans les cellules compétentes *E.coli* DH5α par transformation. Les transformants obtenus sur milieu LB avec Tet (50µg/mL) ont été vérifiés par PCR sur colonie (Figure n°27). Trois transformants sur les cinq possèdent le gène *pvdP* de KT2440.



Figure n°27 – Migration sur gel d'agarose 1 % de l'amplification par PCR sur colonie du gène *pvdP* de KT2440. Les chiffres 1 à 5 correspondent aux transformants obtenus après transformation dans *E.coli* DH5 α . Les amplicons ont une taille de 1,6 kb. Les amorces utilisées sont : *pvdP* KT2440 F/ *pvdP* KT2440 R SacI. Le contrôle négatif est le plasmide *pME6010* sans l'overlap. MT= marqueur de taille

La prochaine étape est de réaliser une transformation par électroporation dans le mutant *Pseudomonas putida* BTP1 Δ *pvdP* pour apporter le gène *pvdP* de KT2440 afin d'obtenir de nouveau le sidérophore qui serait de la pyoverdine et non pas de l'isopyoverdine selon l'hypothèse de départ. Pour affirmer que la méthodologie de complémentation ait fonctionné, plusieurs méthodes ont été réalisées. Le plus simple est une méthode visuelle permettant de voir si la fluorescence est réapparue en mettant les boîtes de Pétri contenant les colonies sous lumière UV (Figure n°28). Tandis que le séquençage a permis de valider la présence du promoteur pTac et du gène *pvdP* de KT2440.

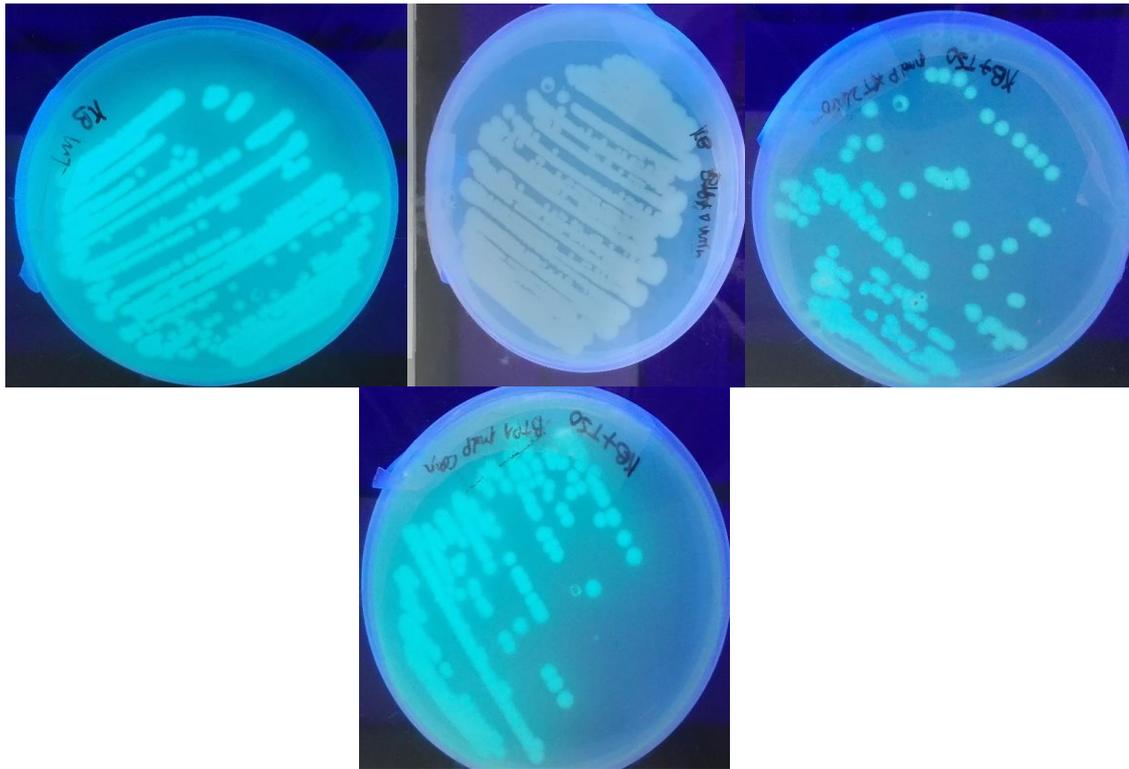


Figure n°28 – Image obtenue sous lumière UV de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (haut à gauche), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (haut à droite), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (haut au milieu) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (bas au milieu)

5.3. Cinétique de croissance et de production de pyoverdine/isopyoverdine et spectre d'absorbance

Une cinétique de croissance microbienne sur 24 heures a été réalisée avec la souche *Pseudomonas putida* BTP1 sauvage, le mutant BTP1 $\Delta pvdP$ et les mutants complémentés du gène *pvdP* de BTP1 et de KT2440. Ces colonies ont été mises en culture dans différents milieux pour étudier la croissance des bactéries. Les milieux de cultures utilisés sont CAA et CAA avec ajout de EDTA, un chélateur fort. Des expériences similaires ont été réalisées sur milieu succinate. Les résultats sont repris en annexe.

Par la même occasion une cinétique de production d'(iso)pyoverdine a été effectuée en fiole par la mesure de la densité optique à 400nm (après centrifugation et ajustement à pH7 du surnageant) caractéristique pour la mesure de la production d'(iso)pyoverdine.

5.3.1. Cinétique de croissance microbienne de BTP1 et des mutants dans différents milieux

5.3.1.1. Milieu CAA

5.3.1.1.1. Croissance microbienne

Les courbes de croissance sur milieu CAA sont présentées dans la *Figure n°29*. La souche sauvage ainsi que les mutants complémentés présentent une courbe de croissance similaire même si la croissance de ces derniers démarre plus lentement. Le ralentissement de la croissance est plus marqué pour le mutant BTP1 $\Delta pvdP$.

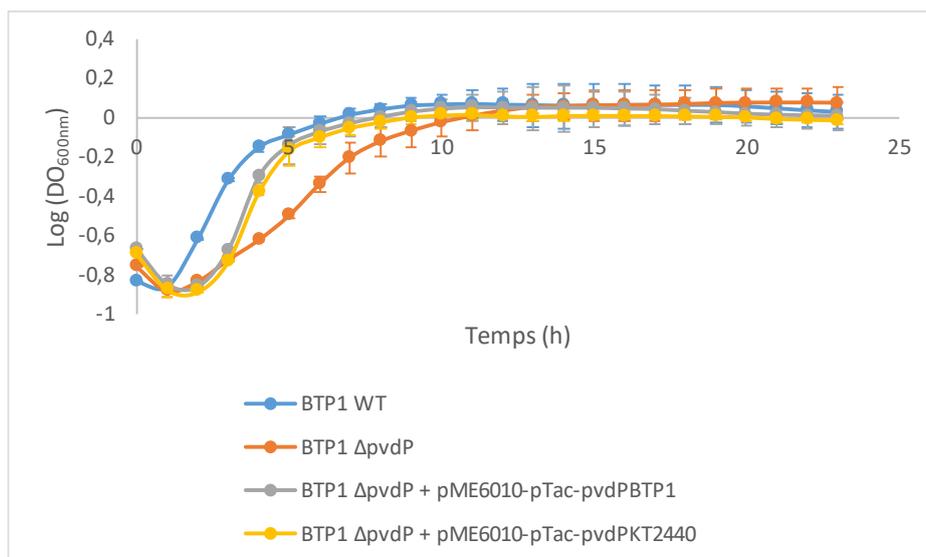


Figure n°29 – Courbes de croissance microbienne (DO_{600nm}) sur milieu CAA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

5.3.1.1.2. Croissance de production de (iso)pyoverdine

La courbe de croissance de production de (iso)pyoverdine au cours du temps (Figure n°30) montre que le surnageant du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ absorbe très peu à une longueur d'onde de 400nm au cours du temps. Les trois autres souches possèdent effectivement une augmentation vis-à-vis de la DO_{400nm} au cours du temps mais ces dernières sont différentes l'une de l'autre. La souche sauvage a une valeur de DO_{400nm} après 24 heures plus importante que le mutant complétement avec le gène *pvdP* de BTP1. Cela peut-être dû à l'utilisation du promoteur, pTac, qui contrairement à ce qui est attendu ne permettrait pas la production l'enzyme PvdP en quantité équivalentes ou supérieures au promoteur natif. Au niveau du mutant complétement avec le gène *pvdP* de la souche KT2440, la DO_{400nm} est assez basse (0,6) comparée à la souche sauvage mais plus élevé que le mutant dépourvu du gène *pvdP*. Cette observation peut-être due au fait que la tyrosinase produite n'arrive pas à reconnaître aisément, au niveau de son site actif, la ferribactine produite par BTP1.

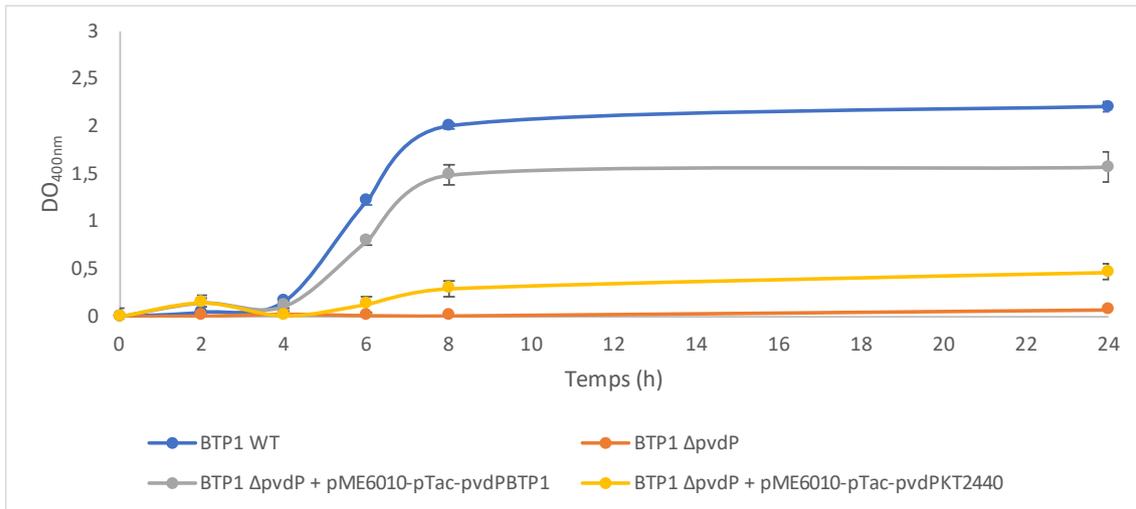


Figure n°30 - Courbes de production d'(iso)pyoverdine en fiole sur milieu CAA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP + pME6010-pTac-pvdPKT2440 (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP + pME6010-pTac-pvdPBTP1 (gris)

5.3.1.1.3. Résultat LC-QTOF-MS

Lors de la phase de cinétique, certains échantillons ont été prélevés après 24 heures de culture pour passage au LC-QTOF-MS afin de déterminer la présence de (iso)pyoverdine et de ferribactine (Figure n°31). L'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1 possède une masse moléculaire de 1076 Da tandis que la ferribactine possède une masse moléculaire de 1064 Da.

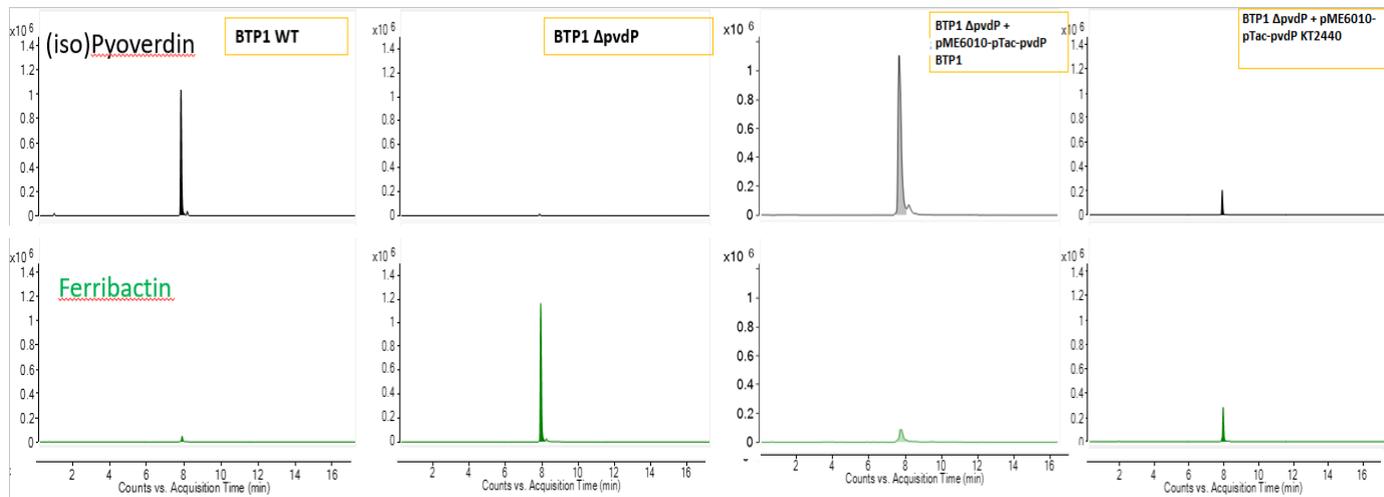


Figure n°31 – Résultats du LC-Q-TOF-MS vis-à-vis du sidérophore et de la ferribactine obtenu après culture de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage, de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP, de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP + pME6010-pTac-pvdPKT2440 et de *Pseudomonas putida* BTP1 Δ pvdP + pME6010-pTac-pvdPBTP1 sur milieu CAA durant 24 heures

Les résultats du Q-TOF-MS confirment ceux obtenus lors des cinétiques. Le mutant Δ pvdP ne produit que de la ferribactine même si il y a une très légère présence d'un pic de pyoverdine. Le mutant complémenté du *pvdP* de KT2440 produit plus de ferribactine que de pyoverdine ce qui pourrait confirmer l'hypothèse formulée précédemment.

5.3.1.2. Milieu CAA + EDTA

5.3.1.2.1. Croissance microbienne

Une façon de démontrer que le mutant BTP1 $\Delta pvdP$ ne produit pas d'isopyoverdine est d'ajouter dans le milieu de culture un chélatant fort du Fer. Le choix de ce chélatant est l'EDTA. Les courbes de croissance obtenues (Figure n°32) permettent de confirmer que le mutant $\Delta pvdP$ n'arrive pas à croître dans un milieu en présence d'EDTA tandis que ce facteur n'a pas d'impact aussi significatif sur les trois autres souches. Les (iso)pyoverdines, en général, coordonnent une chélation du fer impliquant six atomes d'oxygène dont deux provenant du noyau de la dihydroxyquinoléine et quatre autres provenant des acides aminés particuliers de la chaîne peptidiques (les ornithines). Ce système étroitement coordonné empêche la pénétration de l'eau ou d'autres matériaux pouvant perturber la liaison. Hors dans la ferribactine, il manque les deux oxygènes du noyau dihydroxyquinoléine, cela rend le complexe Fe^{3+} -ferribactine beaucoup moins stable et pourrait donc être moins compétitif^[73]. Cela confirme les observations fait par Ringel et al. (2016) sur un mutant $\Delta pvdP$ mis en culture sur milieu CAA avec de l'EDDHA comme chélateur fort, montrant une quasi non croissance du mutant^[35].

Une autre observation pour le milieu CAA + EDTA est que la présence du composé chélatant a un impact sur la démarrage et la cinétique de croissance. Que ce soit pour la souche sauvage que pour les mutants complémentés, il n'y a pas de croissance cellulaire pendant les cinq premières heures de culture contrairement au milieu CAA sans chélatant où la croissance démarre après trois heures de cultures. De plus, la plateau est atteint beaucoup plus tard (13 heures de culture) avec une densité optique plus basse. Cela permet d'affirmer que l'EDTA a joué son rôle de compétiteur pour le fer.

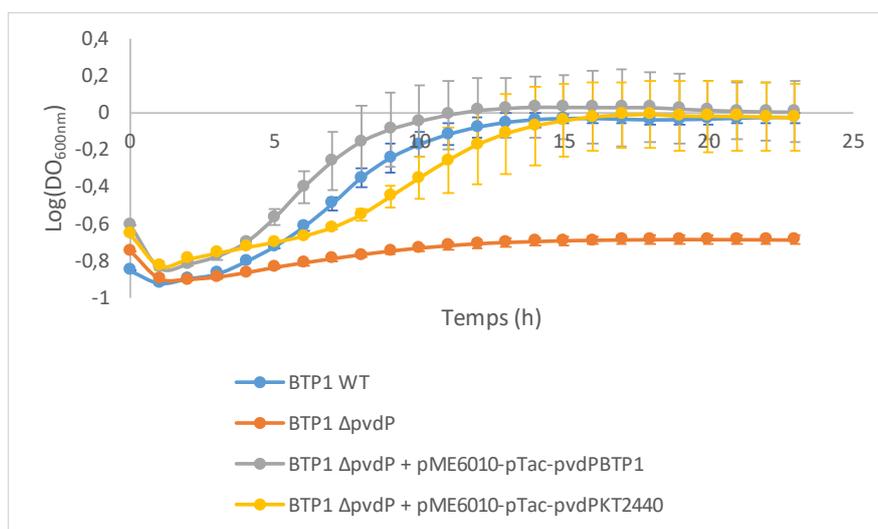


Figure n°32 – Courbes de croissance microbienne (DO_{600nm}) sur milieu CAA + EDTA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

5.3.1.2.2. Production d'(iso)pyoverdine

La courbe de production de (iso)pyoverdine (Figure n°33) démontre les mêmes conclusions que pour le milieu CAA sauf que les valeurs de DO_{400nm} sont plus faibles en comparaison. De plus, il n'y a aucune évolution de la densité optique vis-à-vis du mutant sans le gène *pvdP*.

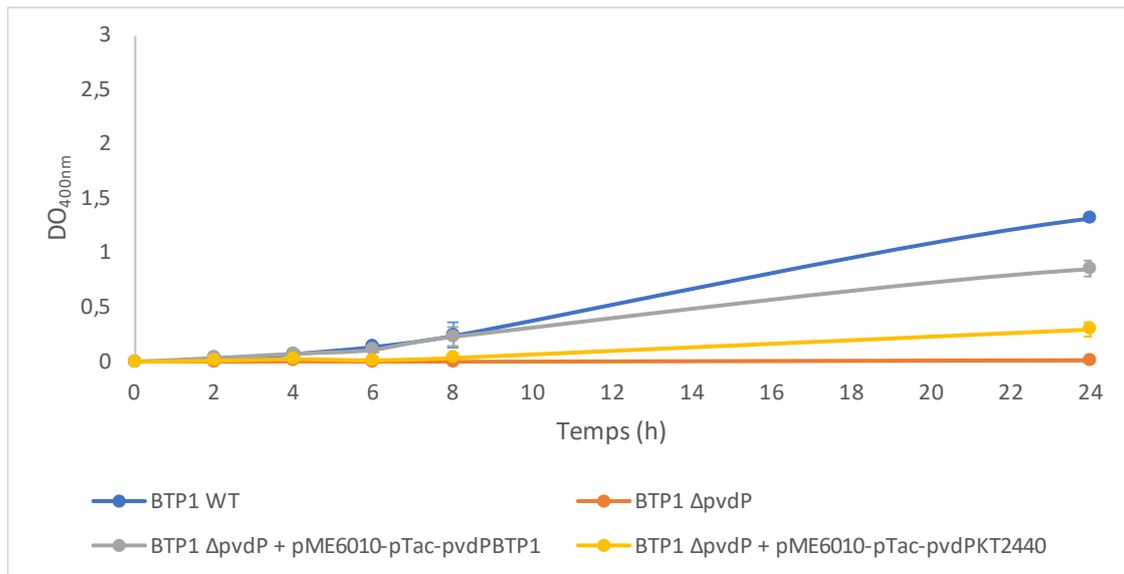


Figure n°33 - Courbes de production d'(iso)pyoverdine en fiole sur milieu CAA + EDTA au cours du temps de *Pseudomonas putida* BTP1 souche sauvage (bleu), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange), de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{KT2440} (jaune) et de *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ + pME6010-pTac-pvdP_{BTP1} (gris)

5.3.2. Spectre d'absorption

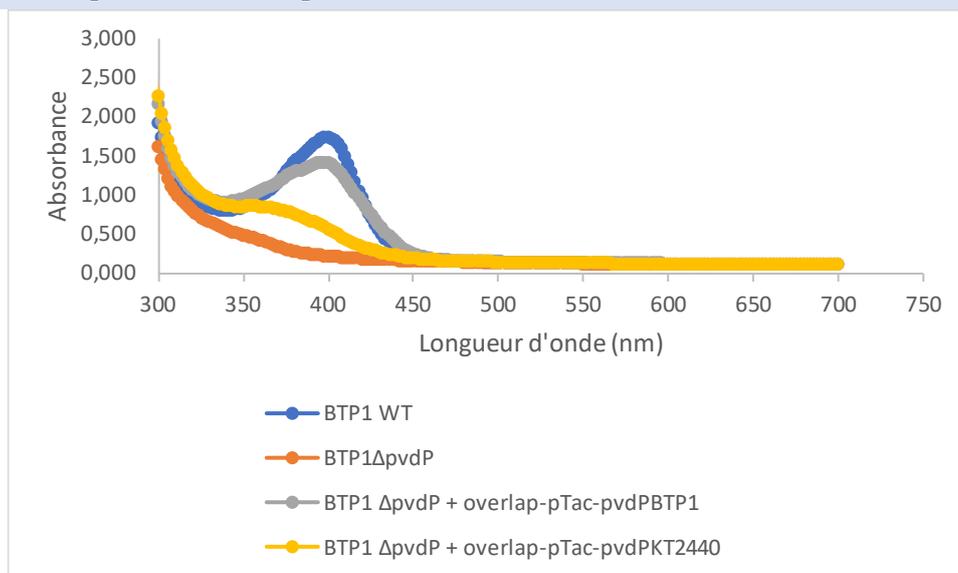


Figure n°34 – Spectre d'absorption (300nm à 700nm) du surnageant de culture sur milieu CAA (24 heures), de la souche *Pseudomonas putida* BTP1 (Bleu), du mutant *Pseudomonas putida* BTP1 $\Delta pvdP$ (orange) et des deux mutants complémentés (gris et jaune), obtenu après centrifugation et ajustement à pH7.

La Figure n°34 permet de constater un maximum d'absorbance différent pour la pyoverdine produite par le mutant complémenté avec le gène *pvdP* de KT2440 comparé à la souche sauvage et au mutant complémenté avec le gène *pvdP* de BTP1. Il serait aux alentours de 380nm ce qui pourrait impacter les résultats obtenus lors de la cinétique de production d'(iso)pyoverdine.

6. Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail de fin d'étude est d'analyser le mode de biosynthèse de l'isopyoverdine produite par *Pseudomonas putida* BTP1. Sur base des résultats obtenus en bio-informatique ainsi que sur les différentes découvertes réalisées au fil des ans sur les pyoverdines, une hypothèse initiale a pu être établie. Celle-ci propose qu'une enzyme, PvdP, impliquée dans le processus de formation du sidérophore serait responsable de la liaison de la chaîne peptidique sur le carbone C3 du chromophore au lieu du carbone C1. Pour vérifier cette hypothèse, il a d'abord fallu créer un mutant délété du gène codant pour l'enzyme en question puis le compléter en insérant le gène *pvdP* provenant d'une autre souche de *Pseudomonas* productrice de pyoverdine, *Pseudomonas putida* KT2440 dans notre cas. Le but de réaliser ce mutant complété est de pouvoir vérifier qu'il produit de la pyoverdine au lieu de l'isopyoverdine.

Suite aux différentes analyses effectuées avec des outils bio-informatiques, plusieurs informations ont pu être mises en évidence. Tout d'abord, sur base des résultats obtenus par Blastx en alignant le génome complet de *Pseudomonas putida* BTP1, préalablement séquencé, et les séquences primaires des gènes impliqués dans le mode de biosynthèse de la pyoverdine de différentes souche de *Pseudomonas*, il a été montré que le gène *pvdP* de BTP1 possède un pourcentage d'identité assez faible (<50%). De plus les résultats ont permis de démontrer pourquoi l'isopyoverdine de *Pseudomonas putida* BTP1 possède que l'acide glutamique comme chaîne secondaire du fait de l'absence des gènes intervenant de la modification de cette chaîne dans le génome de la souche.

Un alignement multiple a été effectué avec l'outil Clustal W sur la séquence primaire de l'enzyme PvdP de BTP1 et d'autres souches de *Pseudomonas* produisant de la pyoverdine. Des matrices de pourcentage d'identité ont pu être créées suite à ces alignements montrant des différences au niveau du domaine N-terminal, contrairement au domaine C-terminal. La matrice pour le domaine N-terminal montre un pourcentage d'identité avoisinant les 30% pour le PvdP de BTP1 par rapport aux autres souches tandis que celui pour le domaine tyrosinase C-terminal avoisine les 55%. De plus, en se basant sur l'article scientifique Poppe et al. (2018) qui a réussi à cristalliser et étudier l'enzyme PvdP de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, la présence ou la modification d'acides aminés potentiellement importants pour la structure et l'activité de cette enzyme ont pu être mis en évidence^[33]. Les acides aminés cités au niveau du domaine C-terminal sont identiques à ceux de BTP1 tandis ceux du domaine N-terminal sont différents. La différence la plus importante est la présence d'un tryptophane (acide aminé aromatique) en position 128 pour toutes les séquences alignées excepté BTP1 qui possède une leucine (acide aminé aliphatique à courte chaîne). La suite logique des analyses bio-informatiques serait de réaliser une prédiction de la structure tertiaire de l'enzyme PvdP de BTP1 avec le serveur Robetta sur base de la séquence primaire. De plus, la cristallisation de l'enzyme en elle-même pourrait permettre de comprendre comment cette dernière est structurée et déterminé les différences entre cette tyrosinase et les autres PvdP produites.

Pour étudier l'influence de l'enzyme PvdP de la souche BTP1 sur le fait de produire de l'isopyoverdine, une stratégie de biologie synthétique a été réalisée pour déléter le gène codant l'enzyme et le compléter avec un gène *pvdP* d'une souche productrice de pyoverdine. La délétion du gène va impliquer une perte de fluorescence du sidérophore car la tyrosinase PvdP joue un rôle, en partenariat avec l'enzyme PvdO, dans la maturation du chromophore responsable de la fluorescence^[34]. La souche KT2440 a été choisie sur base de sa chaîne peptidique qui se rapprochait le plus de celle de BTP1, parmi les souches présentes au laboratoire. Le gène *pvdP*, à nouveau présent, permet de faire réapparaître la fluorescence.

L'ajout d'un promoteur fort, pTac, a été utilisé pour surexprimer la tyrosinase PvdP néanmoins son impact reste inconnu. De plus, une comparaison avec le promoteur natif de BTP1 serait une piste de recherche intéressante.

Une cinétique de croissance microbienne effectuée sur la souche sauvage et sur les mutants sur milieu CAA, avec ou sans EDTA, a permis de confirmer certains points. Lorsqu'il y a présence d'un chélateur fort dans le milieu, les sidérophores produits sont en compétition avec ce dernier pour chélater le fer. Cela se remarque par un démarrage de croissance pour le milieu CAA + EDTA plus lent que lorsque le chélateur n'est pas ajouté. De plus, le mutant $\Delta pvdP$ n'arrive pas à croître dans le milieu avec EDTA car ce dernier ne possède pas la dernière fonction catéchol apportée par le chromophore mature et donc il ne peut être compétitif. Une autre observation basée sur la cinétique de production d'isopyoverdine est que le mutant complétement avec le gène *pvdP* de la souche KT2440 possède une DO_{400nm} plus faible que celle de la souche sauvage dans les deux milieux, cela pourrait être expliqué du fait que le site actif de la tyrosinase PvdP de KT2440 ne reconnaît pas facilement la ferribactine de BTP1 dû à une chaîne peptidique différente ou que le maximum d'absorbance du sidérophore produit s'effectue à une longueur d'onde différente.

Une autre perspective de recherche viserait à étudier un autre milieu: le milieu succinate, plus pauvre que le milieu CAA. Sur base de certains résultats obtenus avec ce milieu, la souche *Pseudomonas putida* BTP1 produit une isopyoverdine dont la chaîne secondaire latérale est différente, l'acide glutamique a été acétylé. De plus, en passant le surnageant d'une culture du mutant BTP1 $\Delta pvdP$ sur milieu succinate au LC-QTOF-MS, un pic d'isopyoverdine non négligeable a été observé. Ce pic pourrait être dû à la présence d'une autre voie métabolique de production d'isopyoverdine mais dont la production serait minime comparée à la voie principale.

En conclusion, l'analyse du mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine de *Pseudomonas putida* BTP1 a permis de mettre en évidence plusieurs observations dont la possible importance de la tyrosinase PvdP dans la formation de cette molécule. Néanmoins, par un manque de temps, l'étape cruciale pour affirmer l'hypothèse initialement suggérée n'a pu être réalisée. Il s'agit de purifier le sidérophore produit par le mutant complétement du gène *pvdP* de KT2440 et d'analyser un échantillon par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette étape est importante car c'est le seul moyen pour vérifier si le sidérophore produit est de la pyoverdine ou de l'isopyoverdine^[80]. En fonction du résultat obtenu, une conclusion définitive aurait pu être établie sur l'influence de l'enzyme PvdP dans le mécanisme de biosynthèse de l'isopyoverdine de *Pseudomonas putida* BTP1.

7. Références

- (1) Cezard, C.; Farvacques, N.; Sonnet, P. Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Curr. Med. Chem.* **2014**, 22 (2), 165–186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>.
- (2) Palleroni, N. J. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; Wiley: Hoboken, New Jersey; **2015**. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>.
- (3) Jacques, P.; Ongena, M.; Gwose, I.; Seinsche, D.; Schröder, H.; Delfosse, P.; Thonart, P.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. Structure and Characterization of Isopyoverdin from *Pseudomonas Putida* BTP1 and Its Relation to the Biogenetic Pathway Leading to Pyoverdins. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **1995**, 50 (9–10), 622–629. <https://doi.org/10.1515/znc-1995-9-1005>.
- (4) Ringel, M. T.; Brüser, T. The Biosynthesis of Pyoverdines. *Microb. Cell* **2018**, 5 (10), 424–437. <https://doi.org/10.15698/mic2018.10.649>.
- (5) Jacques, P.; Delfosse, P.; Ongena, M.; Lepoivre, P.; Cornélis, P.; Koedam, N.; Neirinckx, L.; Philippe, T. Les Mécanismes Biochimiques Développés par les “*Pseudomonas*” Fluorescents dans la Lutte Biologique contre les Maladies des Plantes Transmises Par Le Sol. *Cah. Agric.* **1993**, 2 (5), 301–307.
- (6) Wisplinghoff, H. *Pseudomonas* Spp., *Acinetobacter* Spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli, In *Infectious Diseases*. Fourth Edi.; Elsevier Ltd, **2017**, 1579-1599. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00181-7>.
- (7) Li, X. Z.; Ma, D.; Livermore, D. M.; Nikaido, H. Role of Efflux Pump(s) in Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Active Efflux as a Contributing Factor to β -Lactam Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (8), 1742–1752. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.8.1742>.
- (8) Trapet, P. Incidence Physiologique et Etude du Mode d'action de la Pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* chez *Arabidopsis thaliana* : Liens avec l'homéostasie du Fer, la Croissance et les Défenses, Thèse de doctorat en biochimie et biologie moléculaire, Université de Bourgogne, **2016**.
- (9) Minandri, F.; Imperi, F.; Frangipani, E.; Bonchi, C.; Visaggio, D.; Facchini, M.; Pasquali, P.; Bragonzi, A.; Visca, P. Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. *Infect. Immun.* **2016**, 84 (8), 2324–2335. <https://doi.org/10.1128/IAI.00098-16>.
- (10) Oglesby, A. G.; Farrow, J. M.; Lee, J. H.; Tomaras, A. P.; Greenberg, E. P.; Pesci, E. C.; Vasil, M. L. The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology: A Regulatory Link between Iron and Quorum Sensing. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (23), 15558–15567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707840200>.
- (11) Zughaiar, S. M.; Cornelis, P. *The Role of Iron in Bacterial Pathogenesis*. *Frontiers Media: Lausanne*, **2018** <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-662-8>.

- (12) Vaulont, S.; Schalk, I. Rôles Des Sidérophores Bactériens et de Mammifères dans les Interactions Hôtes-Pathogènes. *Medecine/Sciences* **2015**, *31* (8–9), 756–763. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153108014>.
- (13) Aznar, A. Etude Du Rôle Des Sidérophores Microbiens dans la Modulation des Défenses de la Plante *Arabidopsis thaliana*, Thèse de doctorat en biologie végétale, Paris, Université Paris Sud, **2014**.
- (14) Sultana, R.; Siddiqui, B. S.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H.; Meyer, J. M. An Isopyoverdin from *Pseudomonas putida* CFML 90-33. *Tetrahedron* **2001**, *57* (6), 1019–1023. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)01079-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)01079-6).
- (15) Fuchs, R.; Schafer, M.; Geoffroy, V.; Meyer, J.-M. Siderotyping A Powerful Tool for the Characterization of Pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, *1* (1), 31–57. <https://doi.org/10.2174/1568026013395542>.
- (16) Peek, M. E.; Bhatnagar, A.; McCarty, N. A.; Zughair, S. M. Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/843509>.
- (17) Kang, D.; Kirienko, D. R.; Webster, P.; Fisher, A. L.; Kirienko, N. V. Pyoverdine, a Siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, Translocates into *C. Elegans*, Removes Iron, and Activates a Distinct Host Response. *Virulence* **2018**, *9* (1), 804–817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1449508>.
- (18) Ravel, J.; Cornelis, P. Genomics of Pyoverdine-Mediated Iron Uptake in *Pseudomonas*. *Trends Microbiol.* **2003**, *11* (5), 192–195. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00100-8).
- (19) Lamont, I. L.; Martin, L. W. Identification and Characterization of Novel Pyoverdine Synthesis Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2003**, *149* (4), 833–842. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26085-0>.
- (20) Moon, C. D.; Zhang, X. X.; Matthijs, S.; Schäfer, M.; Budzikiewicz, H.; Rainey, P. B. Genomic, Genetic and Structural Analysis of Pyoverdine-Mediated Iron Acquisition in the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-7>.
- (21) Bodilis, J.; Ghysels, B.; Osayande, J.; Matthijs, S.; Pirnay, J. P.; Denayer, S.; De Vos, D.; Cornelis, P. Distribution and Evolution of Ferripyoverdine Receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11* (8), 2123–2135. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01932.x>.
- (22) Schalk, I. J.; Guillon, L. Pyoverdine Biosynthesis and Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Metal Homeostasis. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (6), 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>.
- (23) Mossialos, D.; Ochsner, U.; Baysse, C.; Chablain, P.; Pirnay, J. P.; Koedam, N.; Budzikiewicz, H.; Fernández, D. U.; Schäfer, M.; Ravel, J.; Cornelis, P. Identification

- of New, Conserved, Non-Ribosomal Peptide Synthetases from Fluorescent *Pseudomonas* Involved in the Biosynthesis of the Siderophore Pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45* (6), 1673–1685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03120.x>.
- (24) Vanvlassenbroeck, A. Etude Expérimentale et *in Silico* du Potentiel de Synthèse NRPS chez les *Pseudomonas* Fluorescents. Thèse de doctorat en Sciences et Technologies, Université de Lille, **2012**.
- (25) Ye, L.; Ballet, S.; Hildebrand, F.; Laus, G.; Guillemyn, K.; Raes, J.; Matthijs, S.; Martins, J.; Cornelis, P. A Combinatorial Approach to the Structure Elucidation of a Pyoverdine Siderophore Produced by a *Pseudomonas putida* Isolate and the Use of Pyoverdine as a Taxonomic Marker for Typing *P. Putida* Subspecies. *BioMetals* **2013**, *26* (4), 561–575. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9653-z>.
- (26) Yeterian, E.; Martin, L. W.; Guillon, L.; Journet, L.; Lamont, I. L.; Schalk, I. J. Synthesis of the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves a Periplasmic Maturation. *Amino Acids* **2010**, *38* (5), 1447–1459. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0358-0>.
- (27) Choi, K. R.; Cho, J. S.; Cho, I. J.; Park, D.; Lee, S. Y. Markerless Gene Knockout and Integration to Express Heterologous Biosynthetic Gene Clusters in *Pseudomonas putida*. *Metab. Eng.* **2018**, *47* (May), 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.003>.
- (28) Huang, W.; Wilks, A. A Rapid Seamless Method for Gene Knockout in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **2017**, *17* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1112-5>.
- (29) Yétérian, E. Bases Moléculaires de la Maturation et de la Sécrétion de la Pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*, Thèse de doctorat en Biologie, Université de Strasbourg, **2010**.
- (30) Sawitzke, J. A.; Thomason, L. C.; Bubunencko, M.; Li, X.; Court, D. L. Court Lab Protocol: Recombineering : Using Drug Cassettes to Knock out Genes in Vivo. **2011**.
- (31) Ongena, M.; Jacques, P.; Delfosse, P.; Thonart, P. Unusual Traits of the Pyoverdine-Mediated Iron Acquisition System in *Pseudomonas putida* Strain BTP1. *BioMetals* **2002**, *15*, 1–13.
- (32) Martínez-García, E.; de Lorenzo, V. Engineering Multiple Genomic Deletions in Gram-Negative Bacteria: Analysis of the Multi-Resistant Antibiotic Profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (10), 2702–2716. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>.
- (33) Poppe, J.; Reichelt, J.; Blankenfeldt, W. *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Maturation Enzyme PvdP Has a Noncanonical Domain Architecture and Affords Insight into a New Subclass of Tyrosinases. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (38), 14926–14936. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002560>.

- (34) Nadal-Jimenez, P.; Koch, G.; Reis, C. R.; Muntendam, R.; Raj, H.; Margot Jeronimus-Stratingh, C.; Cool, R. H.; Quax, W. J. PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2014**, *196* (14), 2681–2690. <https://doi.org/10.1128/JB.01376-13>.
- (35) Ringel, M. T.; Dräger, G.; Brüser, T. PvdN Enzyme Catalyzes a Periplasmic Pyoverdine. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (46), 23929–23938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755611>.
- (36) Ochsner, U. A.; Wilderman, P. J.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L. GeneChip® Expression Analysis of the Iron Starvation Response in *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of Novel Pyoverdine Biosynthesis Genes. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 1277–1287.
- (37) Visca, Paolo; Ciervo, Alessandra; Orsi, N. Cloning and Nucleotide Sequence of the PvdA Gene Encoding the Pyoverdin Biosynthetic Enzyme L-Ornithine N5-Oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (4), 1128–1140.
- (38) McMorran, B. J.; Kumara, H. M. C. S.; Sullivan, K.; Lamont, I. L. Involvement of a Transformylase Enzyme in Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2001**, *147*, 1517–1524.
- (39) Jimenez, P. N.; Koch, G.; Papaioannou, E.; Wahjudi, M.; Krzeslak, J.; Coenye, T.; Cool, R. H.; Quax, W. J. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence under Iron-Limiting Conditions. *Microbiology* **2010**, *156*, 49–59. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030973-0>.
- (40) Ringel, M. T.; Dräger, G.; Brüser, T. PvdO Is Required for the Oxidation of Dihydropyoverdine as Last Step of Fluorophore Formation in *Pseudomonas fluorescens* *. *Enzymology* **2017**, *293* (7), 2330–2341. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000121>.
- (41) Owen, J. G.; Ackerley, D. F. Characterization of Pyoverdine and Achromobactin in *Pseudomonas syringae* Pv . Phaseolicola 1448a. *BMC Genomics* **2011**, *11*.
- (42) Bayat, A. Clinical Review Science, Medicine, and the Future Bioinformatics. *Br. Med. J.* **2002**, *324*, 1018–1022.
- (43) Meyer, J. M.; Gruffaz, C.; Raharinosy, V.; Bezverbnaya, I.; Schäfer, M.; Budzikiewicz, H. Siderotyping of Fluorescent *Pseudomonas*: Molecular Mass Determination by Mass Spectrometry as a Powerful Pyoverdine Siderotyping Method. *BioMetals* **2008**, *21* (3), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9115-6>.
- (44) Flissi, A.; Ricart, E.; Campart, C.; Chevalier, M.; Dufresne, Y.; Michalik, J.; Jacques, P.; Flahaut, C.; Lisacek, F.; Leclère, V.; Pupin, M. Norine: Update of the Nonribosomal Peptide Resource. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (D1), D465–D469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1000>.
- (45) Winsor, G. L.; Griffiths, E. J.; Lo, R.; Dhillon, B. K.; Shay, J. A.; Brinkman, F. S. L. Enhanced Annotations and Features for Comparing Thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1),

- D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>.
- (46) Kuzminov, A. Homologous Recombination — Experimental Systems , Analysis , and Significance. *EcoSal Plus* **2011**, *4* (2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.7.2.6>.
- (47) Stary, A. La Recombinaison Illégitime dans les Cellules de Mammifère. *Médecine/sciences* **1994**, *10*, 986–994.
- (48) Grindley, N. D. F.; Whiteson, K. L.; Rice, P. A. Mechanisms of Site-Specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 567–605. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908>.
- (49) Lipmann, F.; Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Roskoski, R. Polypeptide Synthesis on Protein Templates: The Enzymatic Synthesis of Gramicidin S and Tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1971**, *35*. <https://doi.org/10.1002/9780470122808>.
- (50) Kasai, S.; Konno, S.; Ishikawa, F.; Kakeya, H. Functional Profiling of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases by Competitive Activity-Based Protein Profiling. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (87), 15764–15767. <https://doi.org/10.1039/c5cc04953a>.
- (51) Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The Specificity-Conferring Code of Adenylation Domains in Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, *6* (8), 493–505. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80082-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80082-9).
- (52) Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem* **2002**, *3* (6), 490–504. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020603\)3:6<490::AID-CBIC490>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020603)3:6<490::AID-CBIC490>3.0.CO;2-N).
- (53) Miethke, M.; Marahiel, M. A.; Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71* (3), 413–451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.
- (54) Holm, K.; Edberg, F.; Kalinowski, B. E.; Holmstro, S. J. M.; Fuel, S. N.; Co, W. M. Mobilization of Metals from Uranium Mine Waste : The Role of Pyoverdines Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Geobiology* **2010**, *8*, 278–292. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00241.x>.
- (55) Matthijs, S.; Tehrani, K. A.; Laus, G.; Jackson, R. W.; Cooper, R. M.; Cornelis, P. Thioquinolobactin , a *Pseudomonas* Siderophore with Antifungal and Anti- Pythium Activity. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9* (2), 425–434. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x>.
- (56) Anthoni, U.; Christophersen, C.; Halfdan Nielsen, P.; Lone, G.; Petersen, B. O. Pseudomonine , an Isoxazolidone with Siderophoric Activity from *Pseudomonas fluorescens* AH2 Isolated from Lake Victorian Nile Perch. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (11), 1786–1789.

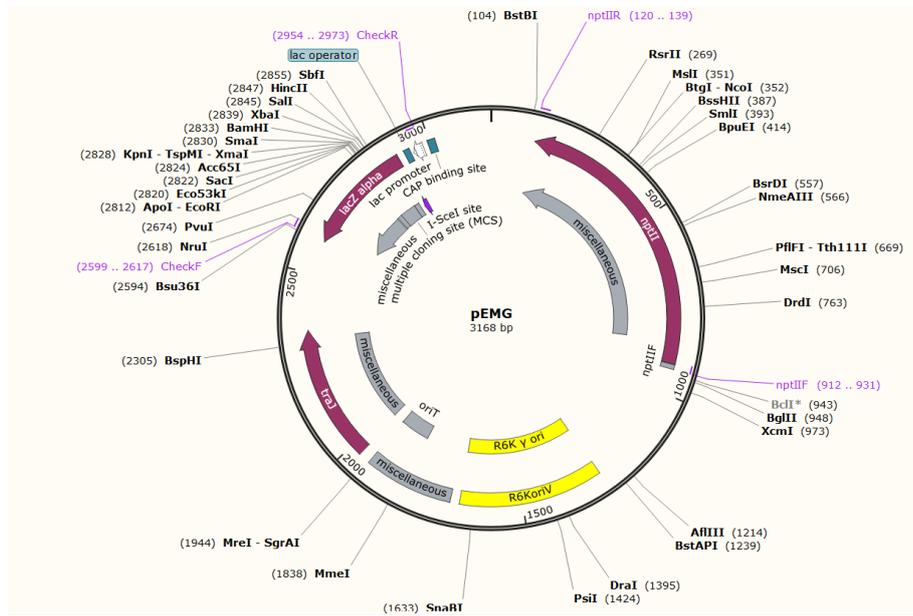
- (57) Beare, P. A.; For, R. J.; Martin, L. W.; Lamont, I. L. Siderophore-Mediated Cell Signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Divergent Pathways Regulate Virulence Factor Production and Siderophore Receptor Synthesis. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47* (1), 195–207. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03288.x>.
- (58) Hmelo, L. R.; Borlee, B. R.; Almblad, H.; Love, M. E.; Randall, T. E.; Tseng, B. S.; Lin, C.; Irie, Y.; Storek, K. M.; Yang, J. J.; Siehnel, R. J.; Howell, P. L.; Singh, P. K.; Tolker-Nielsen, T.; Parsek, M. R.; Schweizer, H. P.; Harrison, J. J. Precision-Engineering the *Pseudomonas aeruginosa* Genome with Two-Step Allelic Exchange. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (11), 1820–1841. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.115>.
- (59) Vacheron, J.; Péchy-Tarr, M.; Brochet, S.; Heiman, C. M.; Stojiljkovic, M.; Maurhofer, M.; Keel, C. T6SS Contributes to Gut Microbiome Invasion and Killing of an Herbivorous Pest Insect by Plant-Beneficial *Pseudomonas protegens*. *ISME J.* **2019**, *13* (5), 1318–1329. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0353-8>.
- (60) Sneed, J. L.; Loeb, L. A. Genetic Complementation Protocols. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *230*, 3–10. <https://doi.org/10.1385/1-59259-396-8:3>.
- (61) Seth-Smith, H. M. B.; Harris, S. R.; Persson, K.; Marsh, P.; Barron, A.; Bignell, A.; Bjartling, C.; Clark, L.; Cutcliffe, L. T.; Lambden, P. R.; Lennard, N.; Lockey, S. J.; Quail, M. A.; Salim, O.; Skilton, R. J.; Wang, Y.; Holland, M. J.; Parkhill, J.; Thomson, N. R.; Clarke, I. N. Co-Evolution of Genomes and Plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the Emergence in Sweden of a New Variant Strain. *BMC Genomics* **2009**, *10* (June). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-239>.
- (62) Niessen, W. M. .; Falcks, D. Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial. *Anal. Biomol. Interact. by Mass Spectrom.* **2013**, 1–54.
- (63) Allen, D.; McWhinney, B. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *Clin. Biochem. Rev.* **2019**, *40* (3), 135–146. <https://doi.org/10.33176/aacb-19-00023>.
- (64) Zhang, N.; Shao, L.; Jiang, Y.; Gu, Y.; Li, Q.; Liu, J.; Jiang, W.; Yang, S. I-SceI-Mediated Scarless Gene Modification via Allelic Exchange in *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *108*, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.004>.
- (65) Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B. K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Microbial Siderophores and Their Potential Applications: A Review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.
- (66) Guerinot, M. L.; Yi Ying. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol.* **1994**, *104* (3), 815–820. <https://doi.org/10.1104/pp.104.3.815>.
- (67) Biessy, A.; Novinscak, A.; Blom, J.; Léger, G.; Thomashow, L. S.; Cazorla, F. M.; Josic, D.; Fillion, M. Diversity of Phytobeneficial Traits Revealed by Whole-Genome Analysis of Worldwide-Isolated Phenazine-Producing *Pseudomonas* Spp. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21* (1), 437–455. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14476>.
- (68) Robin, A.; Vansuyt, G.; Hinsinger, P.; Meyer, J. M.; Briat, J. F.; Lemanceau, P. Iron

- Dynamics in the Rhizosphere. Consequences for Plant Health and Nutrition. *Adv. Agron.* **2008**, 99 (08), 183–225. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00404-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00404-5).
- (69) Yuan, Z.; Gao, F.; Bai, G.; Xia, H.; Gu, L.; Xu, S. Crystal Structure of PvdO from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, 484 (1), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.181>.
- (70) Shen, J.; Meldrum, A.; Poole, K. FpvA Receptor Involvement in Pyoverdine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2002**, 184 (12), 3268–3275. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3268-3275.2002>.
- (71) Budzikiewicz, H.; Schäfer, M.; Fernández, D. U.; Matthijs, S.; Cornelis, P. Characterization of the Chromophores of Pyoverdins and Related Siderophores by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *BioMetals* **2007**, 20 (2), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9021-3>.
- (72) Ochsner, U. A.; Vasil, M. L. Gene Repression by the Ferric Uptake Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: Cycle Selection of Iron-Regulated Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93 (9), 4409–4414. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4409>.
- (73) Taraz, K.; Seipold, L.; Amann, C.; Budzikiewicz, H. The Complex Structure of Ferri-Ferribactins. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2000**, 55 (9–10), 836–839. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-9-1027>.
- (74) Raines, D.J.; Sanderson, T.J.; Wilde, E.J.; Duhme-Klair, A.-K. Siderophores. In *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier Reference Collection, **2015**; 275–295 <https://doi.org/10.1201/9781315153353-18>.
- (75) Ge, L.; Seah, S. Y. K. Heterologous Expression, Purification, and Characterization of an L-Ornithine N5-Hydroxylase Involved in Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2006**, 188 (20), 7205–7210. <https://doi.org/10.1128/JB.00949-06>.
- (76) Vandenende, C. S.; Vlasschaert, M.; Seah, S. Y. K. Functional Characterization of an Aminotransferase Required for Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **2004**, 186 (17), 5596–5602. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5596-5602.2004>.
- (77) Mendonca, C. M.; Yoshitake, S.; Wei, H.; Werner, A.; Sasnow, S. S.; Thannhauser, T. W.; Aristilde, L. Hierarchical Routing in Carbon Metabolism Favors Iron-Scavenging Strategy in Iron-Deficient Soil *Pseudomonas* Species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, 117 (51), 32358–32369. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016380117>.
- (78) Mathieu, S. Ingénierie de la Voie de Biosynthèse d'un Sidérophore chez *Pseudomonas*. Thèse de Master en Microbiologie, Université de Lorraine, **2019**.
- (79) Carquet, M. Approches Combinatoires pour la Reconstruction d'une Voie de Biosynthèse chez la Levure : Variation des Niveaux d'expression et Analyse Fonctionnelle d'une Etape Clé de la Voie. Thèse de Doctorat en Ingénierie Microbienne et Enzymatique, Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse,

2015.

- (80) Michalke, R.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. Azoverdin - an Isopyoverdin. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **1996**, *51* (11–12), 772–780. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1202>.
- (81) Martínez-García, E.; Benedetti, I.; Hueso, A.; de Lorenzo, V. Mining Environmental Plasmids for Synthetic Biology Parts and Devices. *Plasmids Biol. Impact Biotechnol. Discov.* **2015**, 633–649. <https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch32>.
- (82) Heckman, K. L.; Pease, L. R. Gene Splicing and Mutagenesis by PCR-Driven Overlap Extension. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (4), 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>.
- (83) Ongena, M.; Giger, A.; Jacques, P.; Dommes, J.; Thonart, P. Study of Bacterial Determinants Involved in the Induction of Systemic Resistance in Bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108* (3), 187–196. <https://doi.org/10.1023/A:1015141503755>.
- (84) Chen, Z.; Ling, W.; Shang, G. Recombineering and I-SceI-Mediated *Pseudomonas putida* KT2440 Scarless Gene Deletion. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363* (21), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw231>.
- (85) Ringel, M. T.; Dräger, G.; Brüser, T. The Periplasmic Transaminase PtaA of *Pseudomonas fluorescens* Converts the Glutamic Acid Residue at the Pyoverdine Fluorophore to -Ketoglutaric Acid. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (45), 18660–18671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812545>.

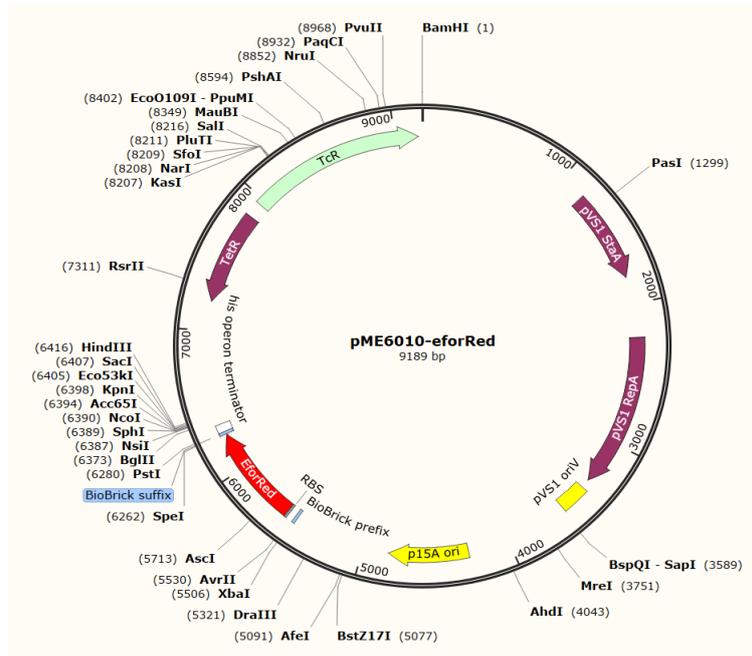
Annexe 1 - Schéma du plasmide pEMG



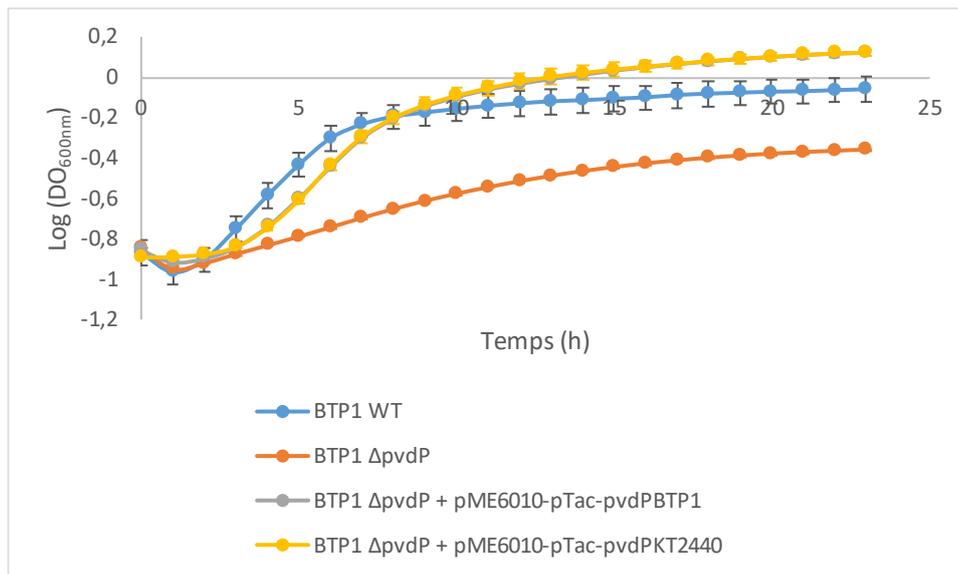
Annexe 2 – Schéma du plasmide pSWII^[32]



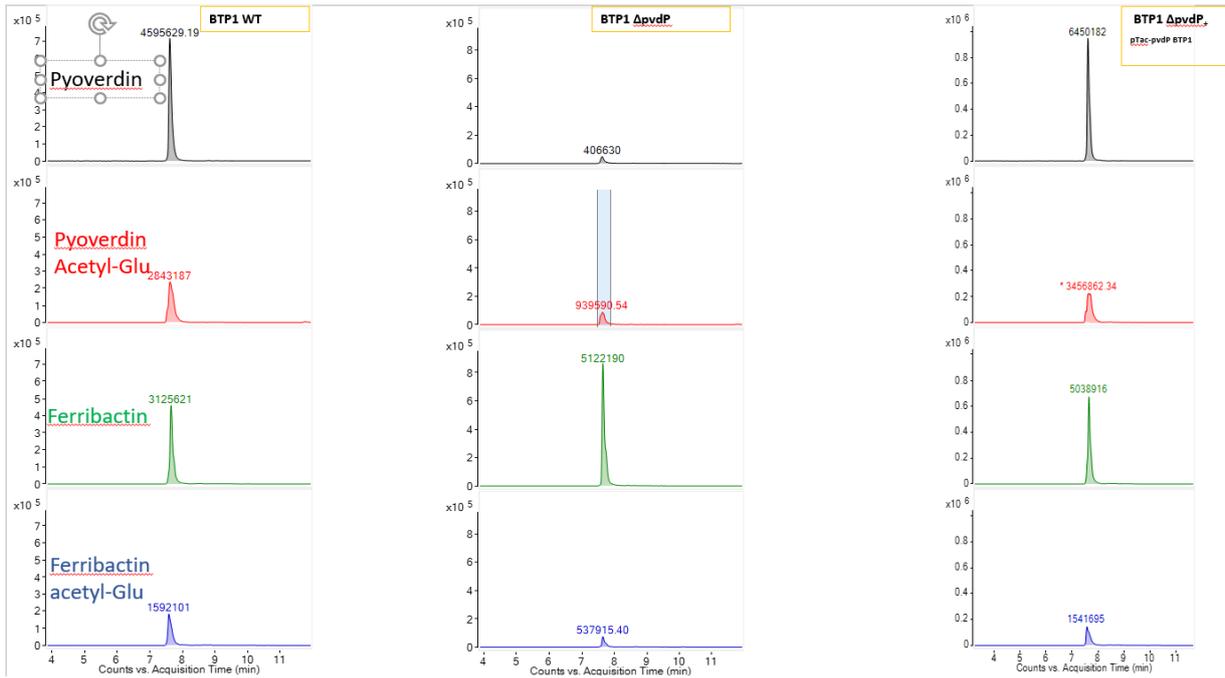
Annexe 3 – Schéma du plasmide pME6010



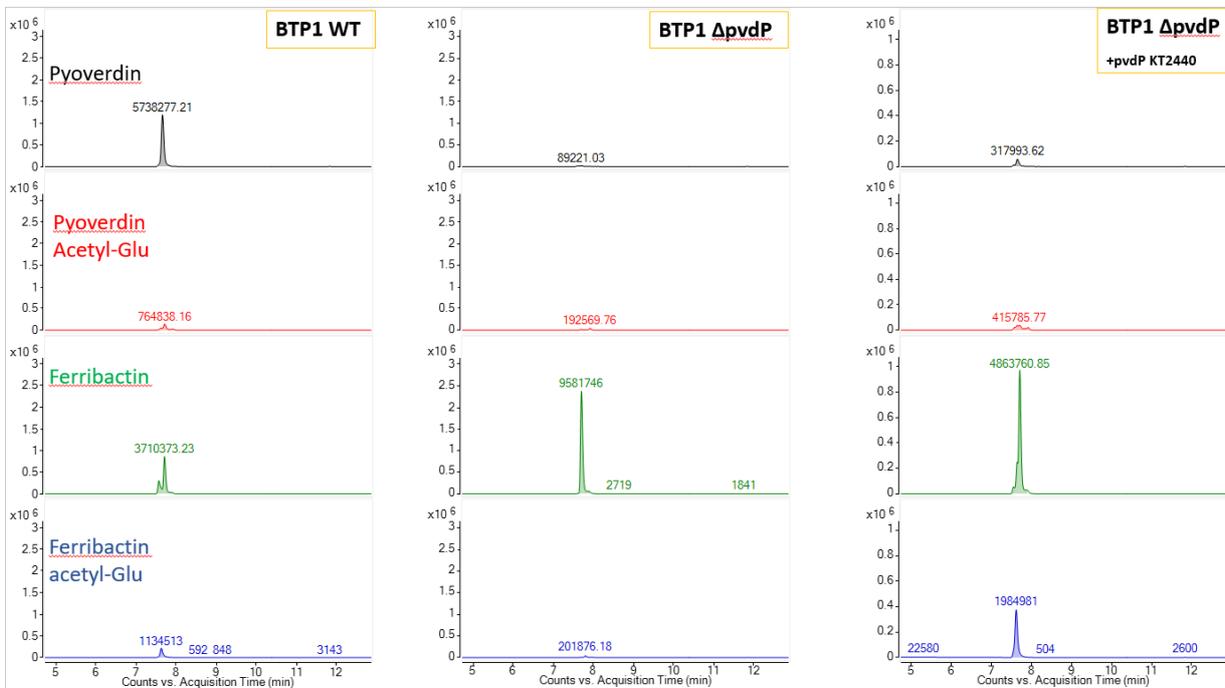
Annexe 4 – Cinétique de croissance microbienne de la souche sauvage et des différents mutants sur milieu succinate



Annexe 5 – Passage au LC-Q-TOF-MS d'échantillons obtenus après 10 heures de culture en milieu succinate



Annexe 6 – Passage au LC-Q-TOF-MS d'échantillons obtenus après 24 heures de culture en milieu succinate



Annexe 7 – Données brutes de la cinétique de croissance microbienne en milieu CAA de la souche sauvage et des différents mutants.

Time [h]	BTP1 WT				BTP1 ΔpvdP				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{BTP1}				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{K7240}							
	A1	B1	C1	Moyenne	Ecart Type	A2	B2	C2	Moyenne	Ecart Type	A3	B3	C3	moyenne	Ecart Type	A4	B4	C4	Moyenne	Ecart Type
0	0,1476	0,1389	0,1448	0,1476	0,0044	0,1439	0,1834	0,1972	0,1748	0,0277	0,1651	0,2336	0,243	0,214	0,0425	0,164	0,2227	0,2218	0,2028	0,0336
1	0,1394	0,1422	0,1384	0,1394	0,0020	0,132	0,1314	0,1313	0,1316	0,0004	0,1433	0,1423	0,1411	0,142	0,0011	0,135	0,1408	0,1255	0,1338	0,0077
2	0,244	0,247	0,2303	0,2440	0,0089	0,1525	0,1441	0,1469	0,1478	0,0043	0,1415	0,141	0,1331	0,139	0,0047	0,1327	0,1347	0,125	0,1308	0,0051
3	0,4851	0,5159	0,476	0,4851	0,0209	0,1971	0,1806	0,193	0,1902	0,0086	0,2389	0,211	0,188	0,213	0,0255	0,1876	0,1974	0,176	0,1870	0,0107
4	0,7111	0,7492	0,6811	0,7111	0,0341	0,2552	0,2203	0,2446	0,2400	0,0179	0,5888	0,512	0,401	0,501	0,0944	0,4483	0,4748	0,3339	0,4190	0,0749
5	0,8246	0,8776	0,8127	0,8246	0,0346	0,3475	0,2778	0,3334	0,3196	0,0369	0,7879	0,7158	0,6724	0,725	0,0583	0,6781	0,7319	0,6347	0,6816	0,0487
6	0,9353	0,9847	0,9249	0,9353	0,0319	0,4927	0,3714	0,5174	0,4605	0,0781	0,9197	0,8246	0,7993	0,848	0,0635	0,7869	0,8391	0,7707	0,7989	0,0357
7	1,0383	1,0702	1,0104	1,0383	0,0299	0,6751	0,5395	0,6728	0,6291	0,0776	0,9945	0,9197	0,8976	0,937	0,0508	0,8858	0,931	0,858	0,8916	0,0368
8	1,1076	1,1576	1,0822	1,1076	0,0384	0,8035	0,6686	0,8051	0,7591	0,0784	1,063	0,9888	0,975	1,009	0,0473	0,9489	0,9881	0,9248	0,9539	0,0319
9	1,1578	1,2338	1,1335	1,1578	0,0523	0,8948	0,7808	0,8979	0,8578	0,0667	1,131	1,0451	1,036	1,071	0,0524	1,014	1,0353	0,9771	1,0088	0,0294
10	1,1742	1,289	1,1605	1,1742	0,0706	0,9872	0,8659	0,9888	0,9473	0,0705	1,1847	1,0878	1,0558	1,109	0,0671	1,0392	1,0538	1,0062	1,0331	0,0244
11	1,1806	1,3222	1,1689	1,1806	0,0853	1,0575	0,9484	1,0563	1,0207	0,0626	1,2245	1,0881	1,0743	1,129	0,0830	1,0467	1,0572	1,0204	1,0414	0,0190
12	1,1722	1,3543	1,1561	1,1722	0,1101	1,1239	1,0091	1,1176	1,0835	0,0645	1,2509	1,066	1,0577	1,125	0,1092	1,0354	1,0367	1,0011	1,0244	0,0202
13	1,1663	1,3525	1,1459	1,1663	0,1138	1,1711	1,0529	1,169	1,1310	0,0676	1,2603	1,0592	1,0497	1,123	0,1189	1,0261	1,0332	0,9915	1,0169	0,0223
14	1,1586	1,3413	1,1417	1,1586	0,1107	1,179	1,0598	1,1961	1,1450	0,0743	1,2303	1,072	1,0665	1,123	0,0930	1,0297	1,0464	1,0065	1,0275	0,0200
15	1,1589	1,3304	1,1443	1,1589	0,1035	1,1849	1,0656	1,2139	1,1548	0,0786	1,2231	1,0708	1,0739	1,123	0,0870	1,0293	1,0491	1,0116	1,0300	0,0188
16	1,168	1,3334	1,1504	1,1680	0,1010	1,1914	1,0658	1,2164	1,1579	0,0807	1,1964	1,0686	1,0745	1,113	0,0721	1,0271	1,049	1,0107	1,0289	0,0192
17	1,1688	1,3315	1,1538	1,1688	0,0986	1,1947	1,0739	1,2182	1,1623	0,0774	1,1801	1,0636	1,0722	1,105	0,0649	1,0246	1,0474	1,0103	1,0274	0,0187
18	1,1677	1,3179	1,1517	1,1677	0,0917	1,2034	1,0854	1,2271	1,1720	0,0759	1,1529	1,0551	1,0469	1,108	0,0590	1,0205	1,0411	1,0073	1,0230	0,0170
19	1,1676	1,2896	1,1362	1,1676	0,0810	1,2149	1,1018	1,2377	1,1848	0,0728	1,135	1,0419	1,0277	1,068	0,0583	1,016	1,0345	1,002	1,0175	0,0163
20	1,1484	1,2704	1,1149	1,1484	0,0818	1,225	1,106	1,2439	1,1916	0,0748	1,1221	1,0113	1,0107	1,048	0,0641	1,0113	1,0253	0,9948	1,0105	0,0153
21	1,1225	1,2485	1,0904	1,1225	0,0836	1,2277	1,1042	1,2467	1,1929	0,0774	1,1134	0,9973	0,9971	1,036	0,0671	1,0003	1,0045	0,9736	0,9928	0,0168
22	1,0969	1,2273	1,0662	1,0969	0,0855	1,2307	1,0998	1,2477	1,1927	0,0809	1,1074	0,9894	0,9875	1,028	0,0687	0,994	0,9936	0,9652	0,9843	0,0165
23	1,0757	1,2087	1,0454	1,0757	0,0869	1,2331	1,093	1,2431	1,1897	0,0839	1,1045	0,9843	0,9812	1,023	0,0703	0,9868	0,9834	0,9564	0,9755	0,0167

Annexe 8 – Données brutes de la cinétique de croissance microbienne en milieu CAA+EDTA de la souche sauvage et des différents mutants.

Time [h]	BTP1 WT				BTP1 ΔpvdP				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{BTP1}				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{K7240}							
	D1	E1	F1	Moyenne	Ecart Type	D2	E2	F2	Moyenne	Ecart Type	D3	E3	F3	Moyenne	Ecart Type	D4	E4	F4	Moyenne	Ecart Type
0	0,1454	0,1275	0,1509	0,1413	0,0122	0,1981	0,1836	0,1591	0,1803	0,0197	0,2917	0,2322	0,2264	0,2501	0,0361	0,2521	0,2137	0,1998	0,2219	0,0271
1	0,1272	0,1101	0,126	0,1211	0,0095	0,1312	0,1206	0,13	0,1273	0,0058	0,1395	0,1417	0,1589	0,1467	0,0106	0,1464	0,1515	0,1515	0,1498	0,0029
2	0,1294	0,1232	0,1311	0,1279	0,0042	0,1261	0,1264	0,1256	0,1260	0,0004	0,1375	0,1513	0,1723	0,1537	0,0175	0,1593	0,1647	0,164	0,1627	0,0029
3	0,1406	0,125	0,1414	0,1357	0,0092	0,1305	0,1248	0,1331	0,1295	0,0042	0,148	0,1647	0,195	0,1692	0,0238	0,1709	0,1764	0,1779	0,1751	0,0037
4	0,1666	0,1412	0,1668	0,1582	0,0147	0,1387	0,1275	0,1442	0,1368	0,0085	0,1656	0,1892	0,2488	0,2012	0,0429	0,1831	0,1886	0,1927	0,1881	0,0048
5	0,2042	0,1652	0,2033	0,1909	0,0223	0,1485	0,1343	0,1556	0,1461	0,0108	0,2041	0,2429	0,374	0,2737	0,0890	0,1939	0,1998	0,2088	0,2008	0,0075
6	0,2651	0,2018	0,2619	0,2429	0,0357	0,1582	0,1399	0,1663	0,1548	0,0135	0,2738	0,3452	0,5766	0,3985	0,1583	0,2058	0,212	0,2335	0,2171	0,0145
7	0,3668	0,2629	0,3437	0,3245	0,0546	0,1677	0,1462	0,1756	0,1632	0,0152	0,387	0,5055	0,7605	0,5510	0,1909	0,221	0,2281	0,2758	0,2416	0,0298
8	0,4978	0,3617	0,4849	0,4481	0,0751	0,1772	0,1524	0,1851	0,1716	0,0171	0,5414	0,6439	0,9289	0,7047	0,2008	0,2455	0,2538	0,3513	0,2835	0,0588
9	0,6094	0,4941	0,6125	0,5720	0,0675	0,1862	0,1585	0,1938	0,1795	0,0186	0,6675	0,7597	1,0322	0,8198	0,1896	0,2827	0,293	0,4879	0,3545	0,1156
10	0,7093	0,6078	0,7105	0,6759	0,0590	0,1935	0,1641	0,2012	0,1863	0,0196	0,7566	0,8499	1,1131	0,9065	0,1849	0,3396	0,3513	0,6481	0,4463	0,1748
11	0,7946	0,705	0,7969	0,7655	0,0524	0,1995	0,1689	0,2074	0,1919	0,0203	0,8371	0,9299	1,1721	0,9797	0,1730	0,4281	0,4425	0,8002	0,5569	0,2108
12	0,8722	0,7759	0,8624	0,8368	0,0530	0,2048	0,173	0,2127	0,1968	0,0210	0,9033	0,9891	1,2132	1,0352	0,1600	0,5409	0,5575	0,9243	0,6742	0,2167
13	0,9079	0,8418	0,9155	0,8884	0,0405	0,2079	0,1759	0,2165	0,2001	0,0214	0,9286	1,0191	1,2475	1,0651	0,1643	0,6488	0,6543	1,023	0,7754	0,2145
14	0,9362	0,8923	0,9314	0,9200	0,0241	0,2102	0,1779	0,2188	0,2023	0,0216	0,933	1,0361	1,2748	1,0813	0,1753	0,7436	0,7363	1,0821	0,8540	0,1976
15	0,9492	0,9046	0,9466	0,9335	0,0250	0,2124	0,1802	0,221	0,2045	0,0215	0,923	1,0156	1,3003	1,0796	0,1966	0,8059	0,8031	1,1237	0,9109	0,1843
16	0,9487	0,908	0,9459	0,9342	0,0227	0,213	0,181	0,2226	0,2055	0,0218	0,9167	1,0064	1,313	1,0787	0,2078	0,8524	0,8568	1,1562	0,9551	0,1741
17	0,9388	0,9005	0,9394	0,9262	0,0223	0,2139	0,182	0,2239	0,2066	0,0219	0,9257	1,0169	1,2862	1,0763	0,1874	0,8704	0,8807	1,1836	0,9782	0,1779
18	0,9329	0,8904	0,9338	0,9190	0,0248	0,214	0,1824	0,2249	0,2071	0,0221	0,9273	1,0148	1,2871	1,0764	0,1876	0,8717	0,8803	1,2044	0,9855	0,1879
19	0,938	0,8917	0,9345	0,9214	0,0258	0,2139	0,1831	0,2255	0,2075	0,0219	0,9272	1,0092	1,2356	1,0573	0,1597	0,8525	0,8624	1,1899	0,9683	0,1920
20	0,9437	0,8992	0,9409	0,9279	0,0249	0,2136	0,183	0,226	0,2075	0,0221	0,9239	0,9838	1,2153	1,0410	0,1539	0,8525	0,8599	1,182	0,9648	0,1881
21	0,9546	0,9076	0,9508	0,9377	0,0261	0,2126	0,1828	0,2262	0,2072	0,0222	0,9057	0,9704	1,2096	1,0286	0,1601	0,8506	0,8582	1,1738	0,9609	0,1844
22	0,9638	0,916	0,9599	0,9466	0,0265	0,2121	0,1823	0,2263	0,2069	0,0225	0,8917	0,9629	1,2084	1,0210	0,1662	0,8479	0,8559	1,1628	0,9555	0,1795
23	0,9489	0,9232	0,9681	0,9467	0,0225	0,211	0,1818	0,226	0,2063	0,0225	0,8829	0,9605	1,2098	1,0177	0,1708	0,8435	0,8513	1,1424	0,9457	0,1704

Annexe 9 – Données brutes de la cinétique de production d'isopyoverdine en milieu CAA+EDTA de la souche sauvage et des différents mutants.

Temps (h)	BTP1				BTP1 ΔpvdP			
	DO600		Ecart Type		DO400		Ecart Type	
0	0,04	0,042	0,045	0,0025	0,007	0,003	0	0,0035
2	0,059	0,058	0,063	0,0026	0,013	0,007	0,009	0,0031
4	0,117	0,14	0,119	0,0127	0,055	0,089	0,067	0,0172
6	0,195	0,243	0,238					

Temps (h)	BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{BTP1}				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{KT2440}			
	DO400 correction Abs T50 méthode2			Ecart Type	DO400 correction Abs T50 méthode 2			Ecart Type
0	0	0	0	0,0000	0	0	0	0,0000
2	0,057	0,009	0,04	0,0243	0,019	0,002	0,009	0,0085
4	0,098	0,052	0,073	0,0230	0,025	0,014	0,035	0,0105
6	0,14	0,08	0,111	0,0300	0,04	0,001	0	0,0228
8	0,317	0,148	0,23	0,0845	0,03	0,027	0,049	0,0119
24	0,786	0,856	0,924	0,0690	0,301	0,234	0,355	0,0606
32	0,51	0,85	0,798	0,1831	0,41	0,359	0,47	0,0556
48	0,831	1,051	0,968	0,1111	0,455	0,579	0,666	0,1060

Annexe 10 – Données brutes de la cinétique de la production d'isopyoverdine en milieu CAA de la souche sauvage et des différents mutants.

Temps (h)	BTP1 WT				BTP1 ΔpvdP				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{BTP1}				BTP1 ΔpvdP + pME6010-pTac-pvdP _{KT2440}			
	DO400			Ecart Type	DO400			Ecart Type	DO 400 correction Abs T50 méthode2		Ecart Type	DO 400 correction Abs T50 méthode2		Ecart Type		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,046	0,041	0,045	0,00264575	0,011	0,004	0,004	0,00404145	0,199	0,126	0,109	0,04781562	0,11	0,156	0,171	0,03178574
4	0,151	0,142	0,193	0,02722132	0,024	0,027	0,03	0,003	0,171	0,082	0,077	0,05288667	0	0,03	0	0,01732051
6	1,244	1,172	1,229	0,03798684	0,012	0,01	0,014	0,002	0,818	0,745	0,83	0,04600362	0,1	0,17	0,123	0,03567913
8	1,998	1,981	2,033	0,02651415	0,012	0,003	0,01	0,00472582	1,525	1,581	1,367	0,11097748	0,315	0,323	0,249	0,04061199
24	2,265	2,196	2,161	0,05291818	0,073	0,073	0,073	0	1,515	1,754	1,458	0,15704882	0,485	0,544	0,371	0,08794506
32	2,326	2,198	2,158	0,08775724	0,116	0,104	0,095	0,01053565	1,672	1,74	1,657	0,04423046	0,583	0,584	0,335	0,14347241
48	2,523	2,401	2,437	0,06268439	0,161	0,184	0,163	0,01274101	1,812	2,036	1,863	0,1174067	0,603	0,725	0,491	0,11703561

Annexe 11 – Résultat brut issu de l'alignement multiple (Clustal W) de séquence primaires du domaine N-terminale de tyrosinase PvdP provenant de plusieurs Pseudomonas.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

BTP1	MKVSRRKILAGLVAAGVALPAA---YYAQQEW-----RAQEAE LSSDEPAVPVNDLPNA	52
Pf-5	MRF SRRGFLTGLAVTGAAIPVA---YYTQKELLRQDVRRKEEQEITPGEAKLEVALDPGV	57
PA14	MTV SRRGFMAGLALTGAAALPV--AYYTHRHLT-----REEEPQTPDEASDLAATDGI	52
PA01	MTV SRRGFMAGLALTGAAALPV--AYYTHRHLT-----REEEPQTPDEASDLAATDGI	52
UW4	MTISRRWFLAGLALTGAAVPAV---YYGHRELT-----KDPDAITPDEASFDVADVAGQ	51
BIRD-1	MTISRRGFIAGVALAGVTVPGA---LYVQRQLT-----REEFPETPGEAVVELADTATQ	51
KT2440	MTISRRGFIAGVALAGVTVPGA---LYVQRQLT-----REEFPETPGEAVVELADTATQ	51
S12	MTISRRGFIAGVALAGVTVPGA---LYVQRQLT-----REEFPETPGEAVVELADTATQ	51
F1	MTISRRGFI AVALTGVA VPGA---LYMQRQRD-----AEFAETPGEAVVELADTRLQ	51
HB3267	MTISRRGFIAGVALTGVVVP GALGALYVQRQRA-----AEFPETPGEAVVELADTRLQ	54
GB-1	MTISRRGFIAGVALTGVVVP GALGALYVQRQRE-----EAEFPETPGEAVVELADTPLQ	55
	* .*** : : : . : * * : : . : . * . : . :	
BTP1	LLGERLVGIWDWRLVGDHRLAE LA-GPQQLLLDVGGGARAVRGYLG TAPY---GDQGL	107
Pf-5	RLADHLRGIWDIEFLDAN-GPQSLPRKGC ELLLDAGPTGRGLRGLLGRAQSLRGDGPVEF	116
PA14	RLGDRLRGLWDLRLVGGDAELPGLPREGLQLVLDVAPKGRGLIGYLDTPERLLAAEPPRF	112
PA01	RLGDRLRGLWDLRLVGGDAELPGLPREGLQLVLDVAPKGRGLIGYLDTPERLLAAEPPRF	112
UW4	RLADALRGVWQIRFEGRDAGLEGLPLEGLEVFLDIAHKGRGVVGLD TAERLRSTE EPRY	111
BIRD-1	QLGDTLRGIWRWSFKGAQASLPGLQGETLELFIDVAQKGRSIRGYLDTAERLRSSGEPRY	111
KT2440	QLGDTLRGIWRWSFKGAQAGLPGLQGETLELFIDVAQKGRSIRGYLDTAERLRSGAEPRY	111
S12	QLGDTLRGIWRWSFKGAQAGLPGLQGETLELFIDVAQKGRSIRGYLDTAERLRSSGEPRY	111
F1	QLGDTLRGIWRWTAHGKDAQLLGLPDGELELFIDVASNGRGLRGYLDTAERLRSEQEPRY	111
HB3267	QLGDTLRGIWRWTL LGKDAGLDGLPTSELELFIDVATSGRALRGYLDTPERLRGQDEPRY	114
GB-1	QLGDSL RGIWRWTLQKDGAGLDGLPAGELELFIDVAASGRALRGYLDTPERLRGAE EPRY	115
	* . : * * * * . . * : : : * . . * . : * * .	
BTP1	QVYGPLAADRLPNVRLKMIAGS---GEAYDCDAVLDEIWDGWSQGGGSATLSGQVRLAG	163
Pf-5	MVQGD LASVDAARLRWRLFAGGRIAGAPSYECQVVLDEVWASWGNA-GSGT LSGSLQSLQ	175
PA14	RVLGDL LGASSASIRWRLVDQASGSVAPTHDCSAVFDEVWADYANA-GDGT LSGRIQRLE	171
PA01	RVLGDL LGASSASIRWRLVDQASGSVAPTHDCSAVFDEVWADYANA-GDGT LSGRIQRLE	171
UW4	RVLGDL SGANPKQLGWRL LGAS--GCCDYEFEMTLDEVWAGFGNA-GSGSLSGRVLDLK	167
BIRD-1	RVLGDL PADKPGRLRWRLFDSADGGMPRYECHLVLDEVWGVFGNA-GPATLNGSILDLE	170
KT2440	RVLGDL PADKPGRLRWRLFDSADGGMPRYECHLVLDEVWGVFGNA-GPATLNGSILDLE	170
S12	RVLGDL PADKPGRLRWRLFDSADGGMPRYECHLVLDEVWGVFGNA-GPATLNGSILDLE	170
F1	RVMGDL LTKPGMLRWRLFSTEPGAGQARYECHVVLDEVWGAYGNA-GPATLNGRISALD	170
HB3267	RVIGDL LADKPGTLRWRLFSA-----QARYECHIVLDEVWGRFGNA-GPATLNGRIARLD	168
GB-1	RVVGD L LADKPGTLRWRLFST-----QAHYECDIVLDEVWGRFGNA-GPATLHGRIARMD	169
	* * * : : . : : . : : * * . : . : * * * :	
BTP1	TQAGHSGAMAGFVAVRRPFVLARERLPFVAALHEDLIS	201
Pf-5	ASPLAPVSAARFVARKRVFPAARDQSGLSPALLAWLVS	213
PA14	RSPLSPNEDFRFVAVKRHFPLAHERIVLNEKLLGWLVS	209
PA01	RSPLSPNEDFRFVAVKRHFPLAHERIVLNEKLLGWLVS	209
UW4	RPLMLTAQDHRFIAVKQVFPEARERTGLNPALLAWLVS	205
BIRD-1	RPLAMPEQDNRFLAHKQTFPEARERTALSPAMIDWLIA	208
KT2440	RPLAMPEQDNRFLAHKQTFPEARERTALSPAMIDWLIA	208
S12	RPLAMPEQDNRFLAHKQTFPEARERTALSPAMIDWLIA	208
F1	RALSPLVDNGLFALKRPFPEARERTPLSPQLLAWLIS	208
HB3267	RALTLPVEDNQFLALKRTFPEARERTPLNPQLLAWLTT	206
GB-1	RALTLPVEDNHFLALKRTFPEARERTPLNPQLLAWLIA	207
	* : * : : * * : : : : : * :	

Annexe 12 – Résultat brut issu de l'alignement multiple (Clustal W) de séquences primaires du domaine C-terminale de tyrosinase PvdP provenant de plusieurs *Pseudomonas*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

BTP1	PQRRYYHQLWHASDRDRWHRIDESRRQMVRLGWQVGLGKERNARGHDRHRNRSGEDFLF	60
Pf-5	PQHRLFHQLWHASDRDRWHTLPKDKRNSLRGLGWQPGPVKHERDARGRRKHRNASGIDFLF	60
PA14	PQHRLFHQLWHASRDKWHLSEKQRNALRGVGVQPGPLDRERDARGPRKDRNASGIDFFF	60
PA01	PQHRLFHQLWHASRDKWHLSEKQRNALRGVGVQPGPLDRERDARGPRKDRNASGIDFFF	60
UW4	PEHRLFHQLWHASRDKWHLKLDKDRNALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
KT2440	PEHRLFHQLWHASRDKWHLKLDKDRNALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
BIRD-1	PEHRLFHQLWHASRDKWHLKLDKDRNALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
S12	PEHRLFHQLWHASRDKWHLKLDKDRNALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
F1	PEHRLFHQLWHASRDKWHLKLEEDKQSALRGLGWQPGPRQGERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
HB3267	PEHRLFHQLWHSSRDKWHLKDKKQALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFLF	60
GB-1	PEHRLFHQLWHSSRDKWHLKDKSKQALRGLGWQPGPRDRERDARGRHKDRNRSGEDFFF	60
	.: :****:*:* : :.: :*:* ** :*:* ** :.* ** ** :	
BTP1	MHRHMLHGVREVQ-DLRSWTSLPAARPSIGQGTQAFDYLDNRDGYVPPNWAAGDDAF	119
Pf-5	MHRHMLHARSLLQPDLSVWQQLPQPCARLEQDRQAFIRYYENHDGCVPPAWVADDEEF	120
PA14	MHRHMLHTARSMQ-DLPSWERLPRPVVPLEYDRPGFIRYFDNPDGFSVPPAWVADDEEY	119
PA01	MHRHMLHTARSMQ-DLPSWERLPRPVVPLEYDRPGFIRYFDNPDGFSVPPAWVADDEEY	119
UW4	MHRHMLGTARSMQ-DLPSWKHFPLQPPELARDRSGFARYFDNHGDNALPPTWLAEDDDEY	119
KT2440	MHRHMLGAARAIQ-DLPSWPRFPLQPPELERDRLGFARYFDNHGDNALPPTWLAEDDDEY	119
BIRD-1	MHRHMLGAARAIQ-DLPSWPRFPLQPPELERDRLGFARYFDNHGDNALPPTWLAEDDDEY	119
S12	MHRHMLGAARAIQ-DLPSWPRFPLQPPELERDRLGFARYFDNHGDNALPPTWLAEDDDEY	119
F1	MHRHMLGSARALQ-ELPSWTRFPLQPPELERDRIGFARYFDNHGDNALPPTWLAHDDQEY	119
HB3267	MHRHMLGRARALQ-DLPSWTRFPLQPPELERDRAGFARYFDNHGDNALPPTWLASGDAEY	119
GB-1	MHRHMLGSARALQ-DLPSWSRFPLQPPELERDRAGFARYFDNHGDNALPPTWLASGDEEY	119
	***** .* :* :* ** :* : . . * * :* ** :* ** ** :* * .*	
BTP1	SQWLYYVKSQGLHANFQLEWAQLHDPQYLSLCLGELGSRIELGVHDWLMHRWASLGRD	179
Pf-5	TQWLHGLKSDAAFYGNFQVWESQYQDPEYLSRLTLGQFGSEVELGLHDWLMHRWADVARD	180
PA14	SEWLHGLKSAEAYHANFLVNESQYQDPAYLAKLTLGQFGSELELGMHDWLMHRWASVTRD	179
PA01	SEWLHGLKSAEAYHANFLVNESQYQDPAYLAKLTLGQFGSELELGMHDWLMHRWASVTRD	179
UW4	SQWVSDIKTGETYHSNFQVWESRYRDPYLSRLTLGQFGSEVELGLHDWLMHRWASVPRD	179
KT2440	TQWVRDIKSAETFHGNFVWESRYSDPQYLSRLTLGQFGSELELGLHDWLMHRWASVPRD	179
BIRD-1	TQWVRDIKSAETFHGNFVWESRYSDPQYLSRLTLGQFGSELELGLHDWLMHRWASVPRD	179
S12	TQWVRDIKSAETFHGNFVWESRYSDPQYLSRLTLGQFGSELELGLHDWLMHRWASVPRD	179
F1	TQWVRDIKSPDTFHGNFQVWESRYSDPEYLSKLTGQFGSELELGLHDWLMHRWAAVPRD	179
HB3267	TQWVRDIKTPDTFHGNFQVWESRYTDPYLSRLTLGQFGSEVELGLHDWLMHRWASVPRD	179
GB-1	TQWVRDIKTPDTFHGNFQVWESRYTDPYLSRLTLGQFGSEVELGLHDWLMHRWASVPRD	179
	::* :* :.* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* **	
BTP1	PNSDLMPYGRNRYDFSERWFAENDFLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRINDWYLAHQQ	239
Pf-5	PSNGMPVMEARLSSDFAGRWYQPNDFLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRIDDWYRAHER	240
PA14	PSNGAPVMTDRFPADFAPRWFRPNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRIEDWYRAHER	239
PA01	PSNGAPVMTDRFPADFAPRWFRPNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRIEDWYRAHER	239
UW4	PSNGQPVFPADPADFARWFAAENDFLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRLEDWYRAHER	239
KT2440	PSNGMPVMARTPDDFAARWYGAQNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRVEDWYRAHER	239
BIRD-1	PSNGMPVMARTPDDFAARWYGAQNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRVEDWYRAHER	239
S12	PSNGMPVMARTPDDFAARWYGAQNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRVEDWYRAHER	239
F1	PSNGMPVPAARTPDDFAERWFAEQNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRVDDWYRAHER	239
HB3267	PSNGMPVPTARTPDDFAERWFAEQNDLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRIEDWYRAHER	239
GB-1	PSNGMPVPTARTPDDFAERWFTADNDFLGDPFSSHVNPVFWFHWGIDDRIEDWYRAHER	239
	*... * : * ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* **	
BTP1	AHPGEVKLRMIDGVPWFAPGRWVVAEPWLGPTRDGCGAWLGNNGGGTKLDIETMKLAL	299
Pf-5	YHPGEVLRREVNGVPWFAPGRWVEIDDPWLGAETHGCGPLGNAPGEMLEMDQEVMLKAL	300
PA14	FHPGEVQRREVEGIQWFAPGRWVEVGDWLPATHGCGLSDVQASSNSVELDVEETMKLAL	299
PA01	FHPGEVQRREVEGIQWFAPGRWVEVGDWLPATHGCGLSDVQASSNSVELDVEETMKLAL	299
UW4	FHPGQVSRQLQVNGVPWFAPGRWVEIDDPWLGPTVTHGCSSTPGLQAGKSVEMDPETMKLAL	299
KT2440	FHPGAVVRQEVNGVPWFAPGRWVEVADPWLPDTHGCSNVAGLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
BIRD-1	FHPGAVTRLEVNGVPWFAPGRWVEVADPWLPDTHGCSNVPLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
S12	FHPGAVTRLEVNGVPWFAPGRWVEVADPWLPDTHGCSNVPLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
F1	VHPGEIRRLQVNGVPWFAPGRWVAVADPWLPDTHGCSVTPGLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
HB3267	LHPGEVRRLEVNGVPWFAPGRWVEVADPWLPDTHGCSVTPGLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
GB-1	LHPGEVRRLEVNGVPWFAPGRWVEVADPWLPDTHGCSVTPGLRPGRSVEMDPETMKLAL	299
	** * : :* :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* **	
BTP1	QAIFTPPE-EDADRLAERVQRPWYARHLAPGRRDGL	335
Pf-5	RIALSRLD-EVDPDLKRAPRRPWAQHLKL-----	329
PA14	RIIFSEE-DQLSGWLKRAPRRPWAARNLKLARDQLRR	335
PA01	RIIFSEE-DQLSGWLKRAPRRPWAARNLKLARDQLRR	335
UW4	RITFGEDEKLLKDLFRKVPQRPWYARNLKAKQSQA--	334
KT2440	RLIYSDE-ERFDGLVGKVPRRPWAARNLKVQRQSR--	332
BIRD-1	RLIYSDE-ERFDGLVGKVPRRPWAARNLKVQRQSR--	332
S12	RLIYSDE-ERFDGLVGKVPRRPWAARNLKVQRQSR--	332
F1	RIIYGNE-DLFARLQRPVQRPWYARNLKVVRPSG--	333
HB3267	RIIYSDD-DLCLKLRPKVPQRPWYARNLKVQRQSR--	333
GB-1	RIIYSDE-DLFDKLRPKVPQRPWYARNLKVAKRSG--	333
	: : . :* :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* ** :* **	