



**HAL**  
open science

## Contrôle de l'homéostasie de fer au cours du cycle infectieux d'*Erwinia chrysanthemi* 3937

Aida Boughammoura

► **To cite this version:**

Aida Boughammoura. Contrôle de l'homéostasie de fer au cours du cycle infectieux d'*Erwinia chrysanthemi* 3937. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00679480

**HAL Id: tel-00679480**

**<https://theses.hal.science/tel-00679480>**

Submitted on 15 Mar 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE PARIS-SUD  
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

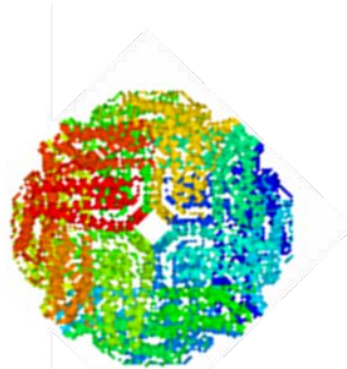
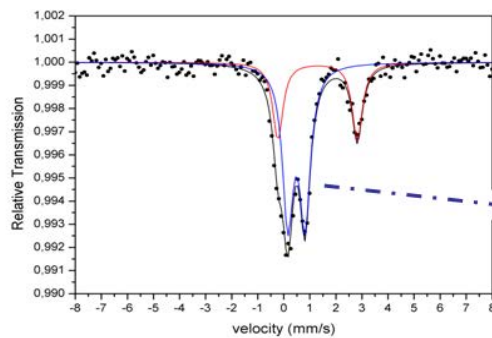
**THESE**  
présentée  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES**  
**DE L'UNIVERSITE PARIS 11, ORSAY**  
**Discipline : Biologie**

par

**Aïda Boughammoura**

**Contrôle de l'homéostasie du fer au cours du cycle  
infectieux d'*Erwinia chrysanthemi* 3937**

**Directeur de thèse : Dominique Expert**



**JURY**

**Suzanne Sommer  
Francis Biville  
William Nasser  
Jean-Marie Meyer  
Thierry Franza**

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Co-directeur de thèse

# Remerciements

C'est en écrivant ces quelques lignes que je réalise avec un pincement au cœur que mon travail arrive à son terme. Il a été réalisé au laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes, UMR 217 INRA, INAPG, UPMC. J'adresse mes chaleureux remerciements à Dominique Expert, Directeur de Recherche au CNRS et directrice de l'unité, non seulement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, mais aussi pour sa contribution active au projet et aux discussions. Je n'oublie évidemment pas Thierry Franza, Chargé de Recherches à l'INRA, qui m'a encadré. Je tiens d'ailleurs à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir confié ce sujet. Sa constante disponibilité et la pertinence de ses conseils ont contribué pour une part importante à l'accomplissement de cette thèse, mais aussi son humour inégalable.

J'adresse ma profonde gratitude au Professeur Berthold Matzanke (Medical University, Lübeck) et à son équipe pour notre fructueuse collaboration concernant l'analyse de la distribution intracellulaire en fer par spectrométrie Mössbauer dans les mutants de ferritines d'*Erwinia chrysanthemi* 3937 dans le cadre d'un projet de recherche européen PROCOPE. Je tiens à remercier Berthold Matzanke pour nos conversations fort intéressantes et ses conseils avisés. Je remercie également Sylvie Reverchon (Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, Lyon) pour son intérêt pour ce travail et les souches bactériennes données. Un grand merci aux membres de mon comité de thèse, Suzanne Sommer (IGM, Université Paris 11), Emmanuel Lessuisse (IJM, UMR 7592, Université Paris 7), Pierre Cornelis (Pseudomonas Research Dept. of Molecular and Cellular Interactions, VIB, Bruxelles) et Jean-Marie Meyer (Laboratoire de Microbiologie et de génétique, Université Louis Pasteur, Strasbourg).

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe du laboratoire où l'ambiance a été fort chaleureuse et propice au travail. Ces années de thèse ont été éclairées grâce à vous tous. Je pense bien évidemment à Alia Dellagi, Martine Rigaud, Camille Roux, Frédérique Van Gijsegem, Marie-Anne Barny, Mathilde Fagard, Marie-Christine Soulié, Caroline Kunz, Régine Vedel, Pierrette Malfatti, Jacques Pédron, Yvan Krepel, Elisabeth Simon-Côte, Claude Perino, Oriane Patrit, Danielle Reis, Claire Neema, Lucia Pincemail et France-Lise Eugène. Je n'oublierai pas les discussions animées où nous refaisons le monde à table avec Stéphane Gaubert, Jérôme Franchel, Tristan Boureau, Diego Second, Alexandre Degrave, Lize Frezal, Benoît Aluni et Roberto Garcia dont les blagues subtiles me manqueront à coup sûr. Une pensée à Igor Pucheu qui nous a malheureusement quitté. Je remercie les membres du bureau des doctorants de l'école doctorale Sciences du Végétal pour tout le travail réalisé ensemble dans la bonne humeur. Je remercie messieurs Francis Biville (Unité des Membranes bactériennes URA 2172, Institut Pasteur, Paris) et William Nasser (Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240, Lyon) pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que l'ensemble des membres de mon jury.

Enfin je remercie toute ma famille, ma mère, mon père et mes frères et sœurs (Zouhour, Inès, Karim et Walid) pour leur présence à mes côtés et leurs encouragements tout au long de mes études particulièrement longues. Je témoigne toute mon estime à ma mère particulièrement courageuse même durant les moments difficiles. Je réserve une mention particulière à tous mes amis : Rozetta, James, Sandrine, Laurent, les Valérie, Nathalie, Hajer, Abdoulaï, Djamel, Nadia, Nicolas, Rim.... Je pense à ma famille de l'autre côté des rives de la mer Méditerranée. J'espère n'avoir oublié personne. Je veux également rendre hommage à mon parrain Ramdan qui est brutalement parti au cours de l'année 2006. Sur ces quelques mots, je vous souhaite une bonne lecture de mon manuscrit de thèse.

# Table des Matières

Liste des figures et tableaux	9
Abréviations	18

## Introduction bibliographique

22

<b>Chapitre I</b>	<i>Erwinia chrysanthemi</i> et les déterminants de la virulence	<b>23</b>
-------------------	---	-----------

I- <i>Erwinia chrysanthemi</i>	24
--------------------------------	----

II- Les déterminants du pouvoir pathogène d' <i>Erwinia chrysanthemi</i> .	26
--	----

A. Enzymes dégradatives.	26
--------------------------	----

1. Les pectinases	26
-------------------	----

2. Les cellulases	29
-------------------	----

3. Les protéases	30
------------------	----

B. Système de sécrétion de type III et harpine	30
--	----

C. Composants de la surface bactérienne	31
---	----

D. Assimilation du fer	31
------------------------	----

1. La chrysobactine	33
---------------------	----

a. Structure	33
--------------	----

b. Biosynthèse et transport	35
-----------------------------	----

2. L'achromobactine	37
---------------------	----

a. Structure	37
--------------	----

b. Biosynthèse et transport	38
-----------------------------	----

3. Régulation	39
---------------	----

E. Facteurs de résistance au stress oxydant	39
---	----

1. Dommages causés par le stress oxydant	39
--	----

2. Défenses contre le stress oxydant	40
--------------------------------------	----

a. La méthionine sulfoxide réductase	40
--------------------------------------	----

b. Les superoxyde dismutases (SOD)	40
------------------------------------	----

c. Flavohémoglobine	42
---------------------	----

d. Indigoidine	42
----------------	----

	e. Les catalases et peroxydases	43
	f. Machinerie SUF	45
<b>Chapitre II</b>	<b>Homéostasie du fer</b>	<b>47</b>
I-	Le paradoxe du fer.	48
II-	Coordination entre les systèmes de transport, de consommation/distribution et de stockage du fer	48
	A. Transport du fer	50
	1. Import	50
	a. Transport du fer à haute affinité dépendant des sidérophores	50
	b. Transport de fer ferreux	52
	c. Transport d'hème	56
	d. Mécanisme TonB-dépendant	56
	e. Régulation des systèmes de transport du fer	57
	- Régulation globale par Fur	57
	- Régulation spécifique	60
	2. Export	62
	B. Consommation/distribution de fer	64
	C. Stockage du fer	67
III-	Effecteurs du contrôle de l'homéostasie du fer	69
	A. Contrôle de l'homéostasie du fer en réponse à disponibilité en fer par Fur	69
	1. Protéine Fur	69
	2. Régulation du gène <i>fur</i>	69
	3. Régulon de la protéine Fur	70
	a. Régulation négative par Fur	70
	b. Régulation positive par Fur	72
	- Découverte et cibles du petit ARN RyhB	72
	- Mécanisme d'action de RyhB	73
	- Autres ARNs de régulation	74
	- Régulation positive directe par Fur	74
	B. Contrôle de l'homéostasie du fer en coordination avec la réponse au stress oxydant	75
	1. PerR	75
	2. OxyR et SoxRS	77
	C. Contrôle de l'homéostasie du fer en fonction de la phase de croissance par $\sigma^S$	80

<b>Chapitre III</b>	<b>Les ferritines, protéines de stockage du fer</b>	<b>83</b>
I-	La structure des différentes ferritines	85
	A. Ferritine et bactérioferritine	85
	B. Protéine Dps	90
II-	Biochimie des ferritines	93
III-	Fonction des ferritines	96
	A. Ferritine Ftn	96
	B. Bactérioferritine Bfr	98
	C. Protéines Dps	99
IV-	Régulation des ferritines	102

## Matériel et Méthodes

		<b>107</b>
I-	Techniques de microbiologie	109
	A. Souches et milieux	109
	B. Préparation des bactéries compétentes	109
	1. Préparation des bactéries compétentes d' <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	109
	2. Préparation des bactéries compétentes d' <i>Erwinia chrysanthemi</i>	111
	C. Transformation bactérienne	111
	1. Transformation des bactéries d' <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	111
	2. Transformation des bactéries compétentes d' <i>Erwinia chrysanthemi</i>	111
	D. Transduction bactérienne	112
	E. Dénombrement bactérien	112
	F. Caractérisation physiologique des souches	113
	1. Sensibilité au stress oxydant	113

2. Sensibilité à la carence en fer	113
3. Complémentation nutritionnelle	114
4. Test du pouvoir pathogène	114
II- Techniques de biologie moléculaire	116
A. Plasmides	116
1. Plasmide pGEM <sup>®</sup> -T Easy	116
2. Plasmide pBluescript-SK <sup>+</sup>	118
3. Plasmides pHP45ΩSpec <sup>R</sup> et pHP45ΩKm <sup>R</sup>	118
4. Plasmide pUIDKI	118
5. Plasmide pUC18K	118
B. PCR	120
C. Purification de fragments d'ADN amplifiés par PCR	120
D. Ligature d'un fragment d'ADN dans un vecteur	121
E. Extraction d'acides nucléiques	121
1. Extraction de l'ADN plasmidique	121
2. Extraction de l'ADN chromosomique	122
3. Extraction des ARN totaux	123
F. Extension d'amorce	123
G. Electrophorèse en gel d'agarose	124
1. Electrophorèse d'ADN	124
2. Electrophorèse d'ARN	124
3. Dosage de l'ADN et ARN	125
H. Transfert de Northern et hybridation	126
1. Transfert à proprement dit	126
2. Préparation d'une sonde radioactive	126
3. Hybridation et révélation	127
4. Déshybridation et réhybridation de membranes	127
G. Construction des différents mutants	128

1. Constructions plasmidiques pBC- <i>ftnA</i> $\Omega$ , pBC- <i>bfr</i> $\Omega$ et pBC- <i>dps1</i> $\Omega$	128
2. Construction plasmidique pBC- <i>bfd</i> :: <i>aphA3</i>	128
3. Construction plasmidique pBC- <i>ΔryhB</i> $\Omega$ <i>spec</i> <sup>R</sup>	129
4. Construction des fusions transcriptionnelles <i>ftnA</i> :: <i>uidA</i> et <i>bfr</i> :: <i>uidA</i>	129
5. Construction des mutants	131
III- Techniques de chimie et biochimie	130
A. Dosage de l'activité $\beta$ -glucuronidase et $\beta$ -galactosidase	130
B. Dosage colorimétrique de la production de sidérophores	132
1. Essai CAS en milieu liquide	132
2. Test de Arnow	133
C. Spectrométrie Mössbauer	134
D. Analyse du contenu intracellulaire en fer par ICP-AES	134
E. Marquage au fer Fe <sup>59</sup> des protéines	135
1. Préparation des extraits protéiques	136
2. Electrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes	136
G. Dosage de l'activité totale pectate lyase	136

<b>Résultats</b>
------------------

	<b>139</b>
Chapitre I    Inventaire des ferritines d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937	<b>140</b>
<hr/>	
I- La ferritine FtnA	<b>143</b>
II- La bactérioferritine Bfr	<b>145</b>
III- Les protéines Dps	<b>152</b>
A. Protéine Dps1	<b>152</b>
B. Protéine Dps2	<b>156</b>
Chapitre II    La ferritine FtnA d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937	<b>159</b>
<hr/>	
I- Construction d'un mutant <i>ftnA</i> $\Omega$	<b>161</b>
II- Vérification de l'absence de ferritine FtnA dans le mutant <i>ftnA</i> $\Omega$	<b>161</b>



III- Propriétés de croissance du mutant <i>ftnA</i> Δ	163
IV- Sensibilité au stress oxydant du mutant <i>ftnA</i> Δ	168
V- Contenu en fer du mutant <i>ftnA</i> Δ	170
VI- Effet sur les systèmes de transport du fer	175
VII- Régulation de l'expression du gène <i>ftnA</i>	179
VIII- Pouvoir pathogène du mutant <i>ftnA</i> Δ	192

---

Chapitre III La bactéroferritine Bfr d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937	193
---	-----

---

I- Construction des mutants <i>bfr</i> Δ, <i>ftnA</i> Δ <i>bfr</i> Δ et <i>bfd</i> :: <i>ahpA3</i>	194
II- Propriétés de croissance des mutants <i>bfr</i> Δ, <i>ftnA</i> Δ <i>bfr</i> Δ et <i>bfd</i> :: <i>ahpA3</i>	196
III- Sensibilité au stress oxydant des mutants <i>bfr</i> Δ, <i>ftnA</i> Δ <i>bfr</i> Δ et <i>bfd</i> :: <i>ahpA3</i>	202
IV- Contenu en fer du mutant <i>bfr</i> Δ	204
V- Effet sur les systèmes de transport du fer	207
VI- Régulation de l'expression du gène <i>bfr</i>	210
VII- Pouvoir pathogène des mutants <i>bfr</i> Δ et <i>ftnA</i> Δ <i>bfr</i> Δ	220

---

Chapitre IV La protéine Dps1 d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937	221
---	-----

---

I- Construction d'un mutant <i>dps1</i> Δ	223
II- Vérification de l'absence de la protéine Dps1 dans le mutant <i>dps1</i> Δ	223
III- Propriétés de croissance du mutant <i>dps1</i> Δ	225
IV- Sensibilité au stress oxydant du mutant <i>dps1</i> Δ	228
V- Régulation de l'expression du gène <i>dps1</i>	232

<b>Discussion et perspectives</b>
-----------------------------------

	236
I- Ferritines : acteurs du stockage intracellulaire du fer chez <i>E. chrysanthemi</i> 3937	237
II- Ferritines : protection contre la toxicité du fer et de l'oxygène ?	241
III- Ferritines et leur contribution au pouvoir pathogène d' <i>E. chrysanthemi</i> 3937	246
IV- Régulation différentielle de l'expression des ferritines chez <i>E. chrysanthemi</i> 3937	249
V- Autres acteurs du métabolisme du fer : ferredoxine Bfd, machinerie Suf, ...	253

Bibliographie

257

Annexes

280

# Listes des figures et tableaux présents dans ce travail

---

## ❖ Introduction bibliographique

- Figure 1 :** Schéma des différents déterminants du pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* 3937 présentés dans l'introduction. **25**
- Figure 2 :** Dégradation de la pectine chez *E. chrysanthemi* 3937. **27**
- Figure 3 :** Structure des deux sidérophores chrysobactine et achromobactine d'*E. chrysanthemi* 3937. **32**
- Figure 4 :** Organisation génétique des gènes de biosynthèse (*cbs* et *acs*) et de transport (*fct*, *cbu*, *acr*, *cbr*) de la chrysobactine [A] et de l'achromobactine [B] chez *E. chrysanthemi* 3937. **34**
- Figure 5 :** Systèmes de transport des sidérophores, chrysobactine et achromobactine chez *E. chrysanthemi* 3937. **36**
- Figure 6 :** Voie de biosynthèse de l'indigoïdine chez *E. chrysanthemi* 3937. **41**
- Figure 7 :** Modèle d'action de la machinerie Suf impliquée dans la réparation des centres [Fe-S] des métalloprotéines chez *E. coli* en conditions de stress oxydant ou de carence en fer. **44**
- Figure 8 :** [A] Schéma représentant les différents systèmes de transport du fer et d'hème chez les bactéries Gram<sup>-</sup>. [B] Structure cristallographique du récepteur FepA d'*E. coli* (Buchanan et al., 1999). [C] Mécanisme de transport TonB-dépendant (Peacock et al., 2006). **49**
- Figure 9 :** Organisation génétique de l'opéron *feoABC* impliqué dans le transport de fer ferreux chez *E. coli* K-12. **51**
- Figure 10 :** Système de transport du fer ferreux Feo chez *E. coli* K-12. **54**
- Figure 11 :** Alignement des séquences des protéines FeoB de *E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et *E. coli* K12 (Ec). **53**
- Figure 12 :** Schéma représentant le système de transport de l'hème dépendant des hémophores chez *S. marcescens*. **55**
- Figure 13 :** Différents modèles d'interaction de la protéine Fur sur la séquence consensus définie pour la boîte Fur chez *E. coli*. **58**
- Figure 14 :** Schéma représentant le système de transport du citrate ferrique et son mécanisme de régulation chez *E. coli* (Braun et al., 2006). **59**
- Figure 15 :** Organisation génétique du cluster *has* de *S. marcescens*. **61**
- Figure 16 :** Alignement des séquences des protéines FieF d'*E. chrysanthemi* (Ech) et *E. coli* (Ec). **61**
- Figure 17 :** Structure des principaux centres [Fe-S]. **63**

<b>Figure 18</b> : Composants de la machinerie Isc impliquée dans la biogenèse des centres [Fe-S] chez <i>E. coli</i> .	<b>63</b>
<b>Figure 19</b> : Modèle d'action de la machinerie Isc impliquée dans la biosynthèse des centres [Fe-S] des métalloprotéines chez <i>E. coli</i> (Barras et al., 2005).	<b>65</b>
<b>Figure 20</b> : Structures de la bactérioferritine Bfr et de la protéine Dps d' <i>E. coli</i> (Andrews et al., 2003).	<b>67</b>
<b>Figure 21</b> : Organisation génétique de l'opéron <i>fldA-fur</i> chez <i>E. coli</i> .	<b>68</b>
<b>Figure 22</b> : Structure du petit ARN non-codant RyhB d' <i>E. coli</i> (Massé et Gottesman, 2002).	<b>71</b>
<b>Figure 23</b> : Schéma récapitulant les mécanismes régulant le facteur $\sigma^S$ .	<b>79</b>
<b>Figure 24</b> : Schéma récapitulant le mécanisme moléculaire de la protéolyse de $\sigma^S$ chez <i>E. coli</i>	<b>81</b>
<b>Figure 25</b> : Structure de la ferritine d' <i>E. coli</i> (Chasteesn et al., 1999) [A] et de la bactérioferritine de <i>D. desulfuricans</i> (Carrondo et al., 2003) [B].	<b>84</b>
<b>Figure 26</b> : Structure d'un fagot de 4 hélices $\alpha$ correspondant à une sous-unité de ferritine.	<b>85</b>
<b>Figure 27</b> : Centre ferroxidase de la ferritine [A] et de la bactérioferritine [B] d' <i>E. coli</i> .	<b>86</b>
<b>Figure 28</b> : Modèle représentant les pores d'ordre 3 et d'ordre 4 de la ferritine.	<b>86</b>
<b>Figure 29</b> : [A] Structure de l'hème de type Fe-protoporphyrine IX de la bactérioferritine d' <i>E. coli</i> . [B] Structure des deux sous unités de la bactérioferritine d' <i>E. coli</i> avec un centre ferroxidase binucléaire par sous unité et un hème localisé entre les deux sous unités.	<b>88</b>
<b>Figure 30</b> : [A] Structure d'une sous unité de la protéine Dps de <i>L. innocua</i> [B] Résidus impliqués dans la fixation du fer au niveau du centre ferroxidase [C] Structure d'un dimère de deux sous unités de la protéine Dps de <i>L. innocua</i> avec à leur interface le centre ferroxidase binucléaire.	<b>91</b>
<b>Figure 31</b> : Modèle présentant la formation des cristaux de ferrihydrite à l'intérieur de la ferritine.	<b>94</b>
<b>Tableau 1</b> : Fonction et régulation de différentes protéines Dps.	<b>104</b>
<b>Figure 32</b> : Couplage du contrôle du stockage du fer et du stress oxydant chez <i>E. coli</i> .	<b>106</b>

## ❖ Matériel et Méthodes

<b>Tableau 2</b> : Liste des souches bactériennes, des mutants et phage utilisés au cours de ce travail.	<b>108</b>
<b>Tableau 3</b> : Composition des différents milieux utilisés dans ce travail.	<b>110</b>
<b>Figure 33</b> : Carte génétique des plasmides pGEM <sup>®</sup> -T Easy (Promega) [A] et pBC-SK <sup>+</sup> (Stratagene) [B] utilisés dans ce travail.	<b>115</b>
<b>Tableau 4</b> : Liste des plasmides utilisés au cours de ce travail.	<b>116</b>

**Figure 34** : Carte de restriction des plasmides pHP45  $\Omega$  Spec<sup>R</sup> et pHP45  $\Omega$  Km<sup>R</sup> (Fellay et al., 1987). **117**

**Figure 35** : Carte de restriction de la cassette *uidA* provenant du plasmide pUIDKI (Amp<sup>R</sup>) (Bardonnet et Blanco, 1992). **117**

**Figure 36** : Carte de la cassette *aphA3* conférant la résistance à la kanamycine et permettant la construction de mutations non polaires présent sur le plasmide pUC18K (Ménard et al., 1993). **117**

**Tableau 5** : Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées au cours de ce travail. **119**

**Tableau 6** : Liste des constructions plasmidiques réalisées au cours de ce travail. **129**

## ❖ Résultats

### ✓ *Chapitre I*

**Figure 37** : Représentation schématique de l'environnement du gène *ftnA* codant la ferritine de type eucaryote d'*E. chrysanthemi* 3937. **143**

**Figure 38** : Séquences nucléique et protéique de la ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937. **142**

**Figure 39** : Alignement des séquences des ferritines Ftn d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). **144**

**Figure 40** : Représentation schématique de l'environnement du gène *bfr* codant la bactéroferritine d'*E. chrysanthemi* 3937. **144**

**Figure 41** : Séquences nucléique et protéique de la bactéroferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937. **146**

**Figure 42** : Alignement des séquences de bactéroferritine d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO 92 (Yp). **148**

**Figure 43** : Alignement des séquences de la ferritine FtnA et la bactéroferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech). **148**

**Figure 44** : Alignement des séquences de Bfd d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). **150**

**Figure 45** : Représentation schématique de l'environnement du gène *dps1* d'*E. chrysanthemi* 3937. **152**

**Figure 46** : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937. **151**

**Figure 47** : Alignement des séquences de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et des protéines Dps d'*E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). **153**

**Figure 48** : Représentation schématique de l'environnement du gène *dps2* d'*E. chrysanthemi* 3937. **156**

**Figure 49** : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937. **155**

**Figure 50** : Alignement des séquences des protéines Dps1 et Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937. **157**

**Figure 51** : Alignement des séquences de la protéine Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et des protéines Dps putatives de *V. cholerae* N16961 (Vc), *V. vulnificus* CMCP6 (Vv), *P. gingivalis* ATCC32277 (Pg), *B. fragilis* YCH46 (Bf) et *P. syringae* DC3000 (Ps). **157**

## ✓ Chapitre II

**Figure 52** : Contenu en protéines à fer de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* et des mutants *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ . **160**

**Figure 53** : Propriétés de croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30  $\mu$ M) [B], EDDHA (100  $\mu$ M) [C] et dipyridyl (200  $\mu$ M) [D]. **162**

**Figure 54** : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  en milieu L (hachuré), en présence de fer (noir), 2,2'-dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **165**

**Figure 55** : Propriétés de croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30  $\mu$ M) [B], 2,2'-dipyridyl (100  $\mu$ M) [C] et EDDHA (37  $\mu$ M) [D]. **164**

**Figure 56** : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  en milieu Tris (noir), en présence de fer (hachuré), dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **166**

**Figure 57** : Sensibilité à la streptonigrine (1,5  $\mu$ g/mL) [A], au paraquat (6  $\mu$ M) [B] et au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) [C] du mutant *ftnA* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **167**

**Figure 58** : Sensibilité à la spermine NONOate (70  $\mu$ M) du mutant *ftnA* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **169**

**Figure 59** : Influence de l'expression de la ferritine FtnA sur la sensibilité du mutant *sufC* à la streptonigrine. **170**

**Figure 60** : Contenu en fer total du mutant *ftnA* $\Omega$  (hachuré) en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir). **172**

**Figure 61** : Spectres Mössbauer de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 [A] et du mutant *ftnA* $\Omega$  [B]. **171**

**Figure 62** : Distribution du fer intracellulaire dans le mutant *ftnA* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **173**

**Figure 63** : Influence de la mutation *ftnA* sur l'expression de la fusion *acsA* ::*lacZ* au cours de la croissance bactérienne. **174**

**Figure 64** : Influence de la mutation *ftnA* sur l'expression de la fusion *fct* ::*lacZ* au cours de la croissance bactérienne. **176**

- Figure 65 :** Production d'achromobactine par la souche référence d'*E. chrysanthemi* 3937 *fct* (noir) et le mutant *fct ftnAΩ* (blanc) cultivés en milieu Tris. **177**
- Figure 66 :** Production de chrysobactine par la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir) et le mutant *ftnAΩ* (blanc) cultivés en milieu Tris. **178**
- Figure 67 :** Test de complémentation nutritionnelle avec les souches *acs37 fct* (référence) et *acs37 fct ftnAΩ*. **179**
- Figure 68 :** Expression de la fusion *ftnA::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu Tris. **180**
- Figure 69 :** Expression de la fusion *ftnA::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. **181**
- Figure 70 :** Expression de la fusion *ftnA::uidA* dans le mutant *fur* d'*E. chrysanthemi* 3937 au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris et milieu L. **182**
- Figure 71 :** Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. **183**
- Figure 72 :** Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. **185**
- Figure 73 :** Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *furΩ*. **184**
- Figure 74 :** Représentation schématique de l'environnement du gène *ryhB* d'*E. chrysanthemi* 3937. **187**
- Figure 75 :** Alignement des séquences du gène *ryhB* d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et *E. coli* K12 (Ec). **186**
- Figure 76 :** Structure secondaire de RyhB d'*E. chrysanthemi* 3937 obtenue avec le programme Mfold de M. Zuker. **186**
- Figure 77 :** Alignement des séquences nucléiques des régions promotrices du gène *ryhB* d'*E. coli* (Ec) et *E. chrysanthemi* 3937 (Ech). **188**
- Figure 78 :** Régions de complémentarité entre RyhB et le transcrit *ftnA* chez *E. chrysanthemi* 3937. **188**
- Figure 79 :** Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu L en présence de 20 μM de FeSO<sub>4</sub> détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *ΔryhB*. **189**
- Figure 80 :** Pouvoir pathogène du mutant *ftnAΩ* et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* sur saintpaulia. **191**

**Figure 81** : Pouvoir pathogène du mutant *ftnA*Ω et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* sur endive. **191**

**Figure 82** : Activité globale pectate lyase du mutant *ftnA*Ω et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi*. **191**

### ✓ **Chapitre III**

**Figure 83** : Propriétés de croissance du mutant *bfr*Ω en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], 2,2'-dipyridyl (200 μM) [C] et EDDHA (74 μM) [D]. **195**

**Figure 84** : Propriétés de croissance du mutant *bfr*Ω en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], EDDHA (37 μM) [C] et 2,2'-dipyridyl (100 μM) [D]. **197**

**Figure 85** : Propriétés de croissance des mutants *ftnA*Ω, *bfr*Ω, *ftnA*Ω *bfr*Ω et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L [A] et en milieu Tris [B]. **198**

**Figure 86** : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance des mutants *ftnA*Ω et *ftnA*Ω *bfr*Ω en milieu L [A] et milieu Tris [B] en absence ou en présence de FeCl<sub>3</sub>, de 2,2'-dipyridyl et d'EDDHA normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **200**

**Figure 87** : Propriétés de croissance du mutant *bfd::aphA3* et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu Tris en présence de glucose comme source de carbone [A], en présence de 100 μM de 2,2'-dipyridyl [B] et 37 μM d'EDDHA [C]. **199**

**Figure 88** : Sensibilité à la streptonigrine (1,5 μg/mL) [A], paraquat (6 μM) [B], spermine NONOate (70 μM) [C], et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mM) [D] des mutants *ftnA*Ω, *bfr*Ω, *ftnA*Ω *bfr*Ω et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **201**

**Figure 89** : Influence de l'expression la bactéroferritine Bfr sur la sensibilité à la streptonigrine du mutant *sufC*. **203**

**Figure 90** : Contenu en fer total du mutant *ftnA*Ω (hachuré) et *bfr*Ω (pointillé) en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir). **204**

**Figure 91** : Spectres Mössbauer de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 [A] et des mutants *ftnA*Ω [B], *bfr*Ω [C] et *ftnA*Ω *bfr*Ω [D]. **205**

**Figure 92** : Distribution du fer intracellulaire dans le mutant *ftnA*Ω, *bfr*Ω et *ftnA*Ω *bfr*Ω en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **206**

**Figure 93** : Production de chrysobactine par la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir) et les mutants *bfr*Ω (hachuré) et *ftnA*Ω *bfr*Ω (pointillé) cultivés en milieu Tris. **207**

**Figure 94** : Test de complémentation nutritionnelle avec les souches *acs37 cbsE* (référence) et *acs37 cbsE bfr*Ω. **208**



**Figure 95** : Expression de la fusion *bfr ::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. **209**

**Figure 96** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **210**

**Figure 97** : Influence de mutations *canR* et *expR* sur l'expression de la fusion *bfr ::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. **211**

**Figure 98** : Influence d'une mutation *rpoS* sur l'expression de la fusion *bfr ::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. **212**

**Figure 99** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et du mutant *rpoS*. **212**

**Figure 100** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et du mutant *furΩ*. **214**

**Figure 101** : Accumulation de transcrits *rpoS* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *furΩ*. **214**

**Figure 102 [A]** : Accumulation des transcrits *bfr* et *rpoS* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *furΩ*. **214**

**Figure 102 [B]** : Croissance du mutant *furΩ* et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. **215**

**Figure 103** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. **216**

**Figure 104** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *furΩ*. **217**

**Figure 105** : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir du mutant *furΩ*. **217**

**Figure 106** : [A] Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L après ajout de 20 μM de FeSO<sub>4</sub> détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *ΔryhB*. [B] Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L après ajout de 200 μM de 2,2'-dipyridyl détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *ΔryhB*. **218**

**Figure 107** : Symptômes sur feuilles d'endives après 48 h d'inoculation avec la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *bfr*Ω. **220**

**Figure 108** : Symptômes sur feuilles d'endives après 24 h d'inoculation avec la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *ftnA*Ω *bfr*Ω. **220**

## ✓ **Chapitre IV**

**Figure 109** : Contenu en protéines à fer de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* et du mutant *dps1*Ω. **222**

**Figure 110** : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *dps1*Ω en milieu L [A] et Tris [B] en absence (noir) ou en présence de fer (hachuré), 2,2'-dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **225**

**Figure 111** : Propriétés de croissance du mutant *dps1*Ω en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], EDDHA (100 μM) [C] et 2,2'-dipyridyl (200 μM) [D]. **224**

**Figure 112** : Propriétés de croissance du mutant *dps1*Ω en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], 2,2'-dipyridyl (100 μM) [C] et EDDHA (37 μM) [D]. **226**

**Figure 113** : Sensibilité au paraquat (6 μM) [A] et à la streptonigrine (1,5 μg/mL) [B] du mutant *dps1*Ω et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **227**

**Figure 114** : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) du mutant *dps1*Ω et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **228**

**Figure 115** : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) du mutant *dps1*Ω et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **229**

**Figure 116** : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **231**

**Figure 117** : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir du mutant *fur*Ω d'*E. chrysanthemi* 3937. **231**

**Figure 118** : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. **231**

**Figure 119** : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *rpoS* $\Omega$  d'*E. chrysanthemi* 3937. **233**

**Figure 120** : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *fur* $\Omega$  d'*E. chrysanthemi* 3937. **233**

**Figure 121** : Symptômes sur feuilles d'endives après 50 h d'inoculation avec la souche sauvage de *E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *dps1* $\Omega$ . **235**

## ❖ Discussion et perspectives

**Tableau 7** : Récapitulatif des phénotypes des différents mutants *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$  et *dps1* $\Omega$  et de la régulation des gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1* d'*E. chrysanthemi* 3937. **238**

**Figure 122** : Régulation de l'expression des ferritines d'*E. chrysanthemi* 3937. **248**

**Figure 123** : Modèle hypothétique de distribution intracellulaire du fer en carence en fer chez *E. chrysanthemi* 3937. **255**

## ❖ Annexes

**Annexe 1** : Séquences nucléique et protéique de la ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937. **281**

**Annexe 2** : Séquences nucléique et protéique de la bactérioferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937. **282**

**Annexe 3** : Alignement des séquences du facteur de transcription  $\sigma^S$  d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). **283**

**Annexe 4** : Représentation schématique de l'environnement du gène *rpoS* codant le facteur de transcription  $\sigma^S$  d'*E. chrysanthemi* 3937. **283**

**Annexe 5** : séquence nucléique et protéique du gène *rpoS* d'*E. chrysanthemi*. **284**

**Annexe 6** : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937. **285**

**Annexe 7** : Alignement des séquences de la protéine OxyR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle d'*E. coli* K12 (Ec). **286**

**Annexe 8** : Alignement des séquences de la protéine PerR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle d'*E. coli* K12 (Ec). **286**

**Annexe 9** : Alignement des séquences de la protéine PerR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle de *B. subtilis* (Bsu). **287**

**Annexe 10** : Publication 1. **288**

## Abréviations

---

ABC	ATP binding cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Amp	ampicilline
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adenosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
CAS	Chrome Azurol S
Ci	curie
Cm	chloramphénicol
CRP	Cyclic AMPc Receptor
Da	dalton
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DHBA	acide 2,3-dihydroxybenzoïque
DO	densité optique
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
EGTA	acide éthylène glycol-bis ( $\beta$ -aminoéthylether)-N,N,N',N'-tétraacétique
EPS	exopolysaccharide
ESR	Electron Spin Resonance spectrometry
Fe	fer
h	heure
HR	reaction hypersensible
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
kb	kilobases
kDa	kilodalton
Km	kanamycine
LPS	lipopolysaccharide
M	molaire
$\mu$ F	microfaraday
Mn	manganèse
min	minute
MOPS	acide morpholinopropane sulfonique
ms	milliseconde
NO	oxyde nitrique
$\Omega$	ohm
ONP	O-nitrophénol
ONPG	O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
ORF	phase ouverte de lecture
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Pel	pectate lyase
PGA	polygalacturonate
pI	point isoélectrique
PNP	paranitrophénol
PNPG	para-nitrophényle- $\beta$ -D-glucoside
ppGpp	guanosine 3',5'-bispyrophosphate

RBS	site de fixation du ribosome
RH	réaction hypersensible
rpm	rotation par minute ou tour par minute
RT-PCR	Transcription inverse associée à une PCR
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SOD	superoxyde dismutase
Spec	spectinomycine
SSC	tampon salin citrate de sodium
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
TGE	Tris-glycine-EDTA
TRIS	Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
UV	ultraviolet
V	volt
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
Zn	zinc

## Abréviations des acides aminés

---

Acide Aspartique	Asp	D
Acide Glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

## Espèces bactériennes

---

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>D. desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. hepaticus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>M. jannascii</i>	<i>Methanococcus jannascii</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. enterica typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica typhimurium</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>X. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>



## Synthèse bibliographique

# Chapitre I

*Erwinia chrysanthemi* et les déterminants de la virulence

Mon travail de thèse s'inscrit dans la problématique de l'équipe de Dominique Expert au laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes qui est axé sur le rôle du fer dans le pouvoir pathogène de la bactérie *Erwinia chrysanthemi* 3937. Je vous présenterai, dans un premier chapitre, cette espèce et les facteurs qui déterminent sa virulence. Dans un deuxième chapitre, je mettrai en évidence les stratégies mises en place par la bactérie pour assurer l'homéostasie du fer et le lien qui existe entre la réponse au stress oxydant et l'homéostasie du fer. Puis enfin, dans un troisième chapitre, je donnerai un aperçu des connaissances actuelles sur les ferritines, leurs fonctions physiologiques et leur régulation avant de présenter mon travail de thèse qui est focalisé sur la caractérisation des fonctions impliquées dans le stockage intracellulaire du fer et leur implication dans le pouvoir pathogène d' *E. chrysanthemi* 3937.

## I- *Erwinia chrysanthemi*.

La classification de l'espèce *Erwinia chrysanthemi* a été en pleine « controverse » ces dernières années. Cette espèce a d'abord été placée par les phyto bactériologistes dans le genre *Erwinia* au sein du groupe des *Erwiniae* macératrices d'après ses caractéristiques physiologiques et biochimiques. Elle a ensuite été reclassée dans le genre *Pectobacterium* (Burkholder et *al.*, 1953), puis dans le genre *Dickeya* (Samson et *al.*, 2005) d'après l'analyse des séquences d'ADN ribosomal 16S. Cette nouvelle nomenclature basée sur la taxonomie moléculaire n'est pas encore largement adoptée, c'est pourquoi nous conserverons l'ancienne dénomination. Cette entérobactérie peut survivre dans les sols ou l'eau et être transmise aux plantes par l'intermédiaire d'ouvertures naturelles telles que les stomates ou artificielles telles que des blessures causées par des méthodes culturales ou par des insectes comme les pucerons (Grenier et *al.*, 2006). Cette espèce affecte une large gamme de plantes hôtes incluant des plantes d'intérêt agronomique tels que le maïs, l'endive ou la pomme de terre, ainsi que des plantes ornementales comme le chrysanthème, l'œillet, ou la violette africaine à partir de laquelle a été isolée la souche 3937 d'*Erwinia chrysanthemi*. Elle est responsable d'une maladie systémique dite de pourriture molle caractérisée par la propagation des bactéries dans les tissus de la plante. Le principal symptôme associé à cette maladie est une macération rapide des tissus parenchymateux de la plante principalement causée par la dégradation de la pectine (composant majeur de la paroi cellulaire primaire) et la désorganisation de la paroi cellulaire.

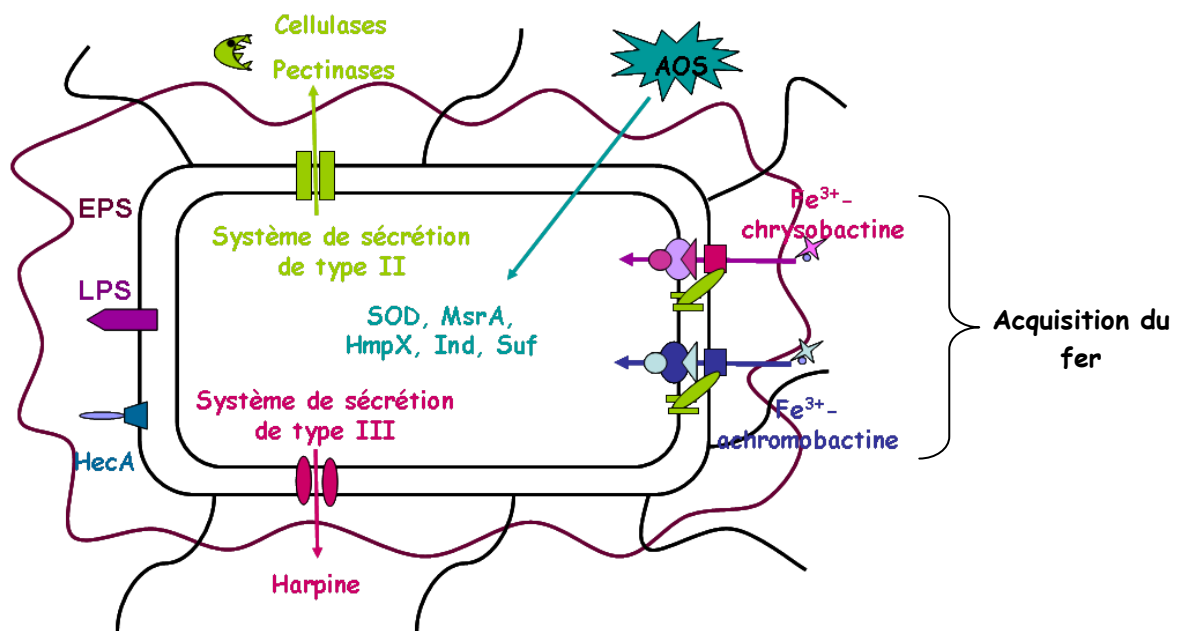


Figure 1 : Schéma des différents déterminants du pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* 3937 présentés dans l'introduction.

Cette souche a été retenue par les phytopathologistes comme modèle pour étudier les déterminants du pouvoir pathogène au niveau moléculaire. Par ailleurs, le génome d'*Erwinia chrysanthemi* 3937 a récemment été entièrement séquencé et fait actuellement l'objet d'une annotation à grande échelle. La bactérie *E.chrysanthemi* est un modèle de choix car les outils génétiques développés chez *E. coli* peuvent lui être appliqués.

## II- Les déterminants du pouvoir pathogène d'*Erwinia chrysanthemi*.

La virulence d'*E. chrysanthemi* est multifactorielle (fig. 1). Elle dépend de la synthèse et la sécrétion d'enzymes dégradatives, de sa résistance face au stress oxydant, de l'injection de facteurs de virulence par son système de sécrétion de type III, de ses propriétés d'adhésion (LPS, EPS et adhésines) et de la synthèse et l'excrétion de sidérophores en réponse à une carence en fer. Les différents déterminants du pouvoir pathogène énumérés ci-dessous ne sont pas présentés par ordre d'importance.

### A. Enzymes dégradatives.

Une des causes principales du pouvoir pathogène est la sécrétion massive d'enzymes lytiques capables de dégrader les différents composants des parois végétales. Le symptôme de pourriture molle est dû à une déstructuration de la paroi végétale qui est d'une grande complexité structurale. Essentiellement constituée de pectine, de cellulose et de protéines pariétales, sa dégradation nécessite des enzymes extracellulaires avec diverses activités. Lors de l'infection, tout un arsenal d'enzymes (pectinases, cellulases et protéases) est produit par *Erwinia chrysanthemi*. La plupart de ces enzymes sont sécrétées par la voie de sécrétion de type II ou machinerie Out, elle-même essentielle à la virulence.

#### 1. Les pectinases

Un des composants majeurs de la paroi végétale est la pectine, polymère constitué de chaînes linéaires d'acides D-galacturoniques essentiellement, liés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$  1→4 interrompues par des régions ramifiées. Ces régions ramifiées sont des structures plus complexes contenant différents sucres comme le rhamnose, le xylose, l'arabinose et le galactose sur la fonction acide en C6 des acides galacturoniques. Les résidus galacturonates de la pectine peuvent être méthylés en C6 et/ou acétylés par une liaison ester sur leurs groupes hydroxyles en C2 et C3.

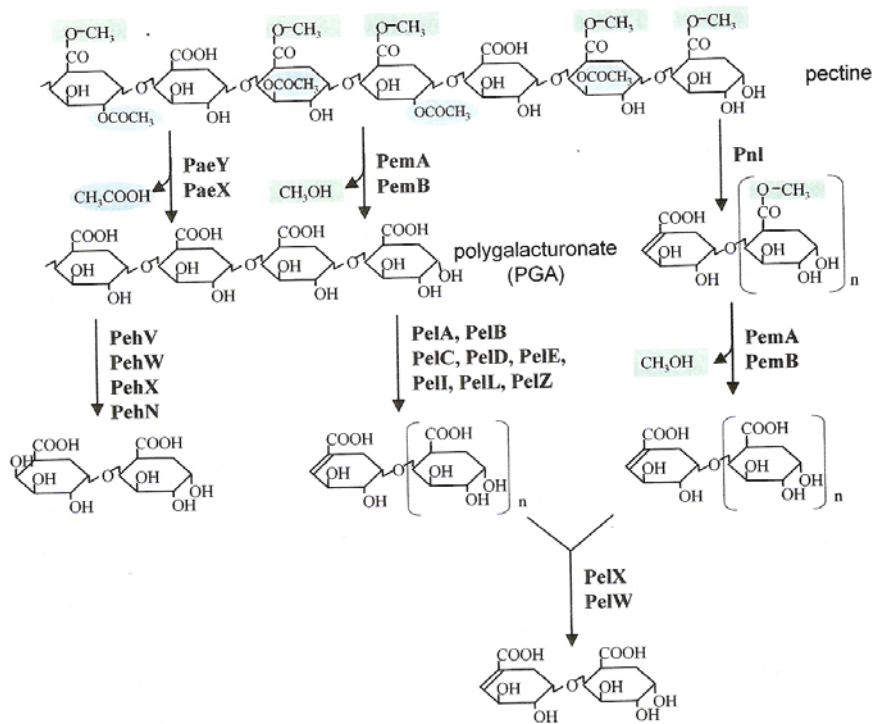


Figure 2 : Dégradation de la pectine chez *E. chrysanthemi* 3937. On distingue deux pectine méthylestérases PmA et PmB qui effectuent la déméthylation des groupements acides, deux pectine acétyl-estérases Pae Y et Pae X qui libèrent les groupements acétyles liés aux hydroxyles des résidus galacturoniques, cinq polygalacturonases (PehK, PehN, PehV, PehW et PehX) qui hydrolysent la liaison  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 du polygalacturonate et des lyases qui clivent la liaison  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 du polygalacturonate par un mécanisme de  $\beta$ -élimination ; celles-ci comprennent deux exopectate lyases (PelX et PelW), deux pectine lyases (PnIG et PnIH) et huit endopectate lyases Pel (Pel A, Pel B, Pel C, Pel D, Pel E, Pel I, Pel L et Pel Z).

Le degré d'estérification et d'acétylation de la pectine varie d'un tissu et d'une plante à l'autre. Le polygalacturonate (PGA) est le dérivé non estérifié de la pectine.

L'équipement pectinolytique d'*E. chrysanthemi* est relativement bien caractérisé (fig. 2). On dénombre au moins six types d'activité pectinolytique et de multiples isoformes qui dégradent la pectine en produits assimilables et utilisables comme source de carbone par la bactérie. On distingue deux pectine méthylestérases, une sécrétée PemA et l'autre ancrée dans la membrane externe PemB qui effectuent la déméthylation des groupements acides, deux pectine acétyl-estérases Pae Y et Pae X qui libèrent les groupements acétyles liés aux hydroxyles des résidus galacturoniques, cinq polygalacturonases (PehK, PehN, PehV, PehW et PehX) qui hydrolysent la liaison  $\alpha 1 \rightarrow 4$  du polygalacturonate et des lyases qui clivent la liaison  $\alpha 1 \rightarrow 4$  du polygalacturonate par un mécanisme de  $\beta$ -élimination. Celles-ci comprennent deux exopectate lyases (PelX et PelW), deux pectine lyases (PnlG et PnlH) et huit endopectate lyases Pel. Les pectate lyases, les endopectine lyases et les polygalacturonases permettent la dépolymérisation de la pectine. Les pectate lyases constituent une classe particulière de pectinases et sont très largement représentées, au nombre de huit Pel A, Pel B, Pel C, Pel D, Pel E, Pel I, Pel L et Pel Z. La séparation des pectates lyases d'*E. chrysanthemi* par électrofocalisation en gel de polyacrylamide et la détection de leur activité enzymatique ont permis de révéler la présence de cinq isoenzymes majeures PelA, PelB, PelC, PelD et PelE avec une activité d'endopectate lyase. L'activité intrinsèque des différentes pectate lyases est dépendante du pH de l'environnement (Tardy et al., 1997). Ces isoformes se distinguent également par leur spécificité de substrat et d'hôte. Les enzymes Pel B et Pel C agissent sur des substrats partiellement méthylés alors que Pel A, Pel D et Pel E préfèrent des substrats très faiblement méthylés (Tardy et al., 1997). Or le degré de méthylation varie selon la plante et le tissu infecté, l'importance de chaque pectate lyase dans la pathogénicité va ainsi dépendre de l'hôte infecté. Des mutants *pel A*, *pel D* et *pel E* sont affectés pour leur pouvoir pathogène sur saintpaulia alors que des mutants *pel B* et *pel C* ne diffèrent pas de la souche sauvage. Sur tubercule de pomme de terre, seules les activités Pel A et Pel E s'avèrent importantes pour le pouvoir pathogène. L'ensemble des Pels est essentiel au développement des symptômes sur feuilles d'endives (Beaulieu et al., 1993). La synthèse des Pels est très finement contrôlée par la bactérie en fonction de nombreux signaux environnementaux (Hugouvieux et al., 1996 ; Pissavin et al., 1996). La dégradation de la pectine entraîne la formation de 2-kéto-3 déoxygluconate (KDG) qui est le principal inducteur de cette voie métabolique. En absence d'inducteurs pectiques, la transcription des gènes impliqués dans la pectinolyse est réprimée par la protéine KdgR qui se fixe à une séquence de

17 pb appelée boîte KdgR et localisée dans la région promotrice de ces gènes. En présence d'inducteurs pectiques comme le KDG, la répression par la protéine KdgR est levée (Nasser et *al.*, 1994). Les régulateurs PecS et PecT répriment également les gènes impliqués dans la pectinolyse ; en réponse à un signal non déterminé à ce jour, la répression exercée est levée (Reverchon et *al.*, 2002). La production de pectate lyases est contrôlée positivement par la protéine CRP (**c**yclic **A**MP **r**eceptor **p**rotein) en présence d'AMPc (Nasser et *al.*, 1997; Reverchon et *al.*, 1997). L'expression des gènes *pel* est fortement augmentée en fin de phase exponentielle de croissance et implique un mécanisme de régulation de type quorum-sensing dépendant de la densité cellulaire via ExpI/ExpR (Nasser et *al.*, 1998). Une carence en fer induit partiellement l'expression des gènes *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE* et *pelL* de manière Fur dépendante (Franza et *al.*, 1999 ; Expert et *al.*, 1996). L'étude *in planta* de fusions transcriptionnelles *uidA* dans les différents gènes *pel* a révélé que l'ensemble des gènes *pel* est induit 9 heures après infection de plantes de saintpaulia à l'exception du gène *pelD* qui l'est plus tôt dès 6 heures (Masclaux et *al.*, 1996). Par ailleurs, le gène *pelD* est le plus fortement exprimé *in planta*; les gènes *pelE*, *pelB* et *pelC* le sont modérément et le gène *pelA* faiblement. Le profil d'expression des gènes *pel* est distinct sur pomme de terre ; en effet les gènes *pelA*, *pelB*, *pelC* et *pemA* sont modérément exprimés et les gènes *pelD* et *pelE* le sont fortement. Une analyse par puces à ADN a révélé que les gènes *pelD*, *pelE* et *paeX* sont induits au cours de l'infection de plantes de saintpaulia par *E. chrysanthemi* 3937 (Okinaka et *al.*, 2002).

## 2. Les cellulases

*E. chrysanthemi* produit deux cellulases Cel5 et CelY qui dégradent les fibres de cellulose. Ces cellulases sont aussi sécrétées par le système de sécrétion de type II. CelY est peu abondante (Guisseppi et *al.*, 1991), Cel5 représente 95% de l'activité totale cellulolytique (Aymeric et *al.*, 1988). La structure du domaine catalytique de l'enzyme Cel5 a été caractérisée par Chapon et *al.* (2001) et les résidus impliqués dans son activité ont été déterminés. Un mutant *celY* présente un retard dans l'apparition des symptômes alors qu'un mutant *cel5* est aussi virulent que la souche sauvage (Boccara et *al.*, 1994).



### 3. Les protéases

*E. chrysanthemi* sécrète, via son système de sécrétion de type I, quatre protéases dans le milieu extracellulaire : PrtA, PrtB, PrtC et PrtG. Des mutants d'*E. chrysanthemi* EC16 déficients dans la production de l'une ou plusieurs de ces protéases sont aussi virulents que la souche sauvage sur tubercules de pomme de terre. Par ailleurs, l'addition de protéases PrtB ou PrtC n'augmente pas le processus de macération par les pectate lyases (Dahler et al., 1990). Néanmoins, la maturation de l'endopectate lyase Pel I dans le milieu extracellulaire par les protéases PrtA et PrtC améliore la capacité de macération de PelI sur saintpaulia et sur tubercule de pomme de terre (Shevchik et al., 1998), suggérant que certaines protéases pourraient moduler l'activité de certaines pectinases.

#### B. Système de sécrétion de type III et harpine

La voie de sécrétion de type III est employée par les bactéries phytopathogènes pour injecter directement dans le cytoplasme de l'organisme hôte un certain nombre de facteurs de virulence ou éliciteurs de la réaction hypersensible ou RH (Wei et al., 1992). Bien qu'*E. chrysanthemi* soit classiquement décrite comme ne déclenchant pas de RH, des mutants altérés dans la production des 5 pectate lyases PelABCDE et des mutants de sécrétion *out* d'*E. chrysanthemi* incapables de macérer provoquent une RH typique sur feuilles de tabac et tomates suggérant que la rapide macération des tissus de la plante masque la RH (Yang et al., 2002). Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III sont appelées harpines (Jin et al., 2001). Ce système est indépendant de la machinerie SEC et implique au moins une vingtaine de protéines principalement localisées dans la membrane interne et au moins une dans la membrane externe. Ces protéines sont codées par les gènes *hrp* (pour **h**ypersensitive **r**esponse and **p**athogenicity) et *hrc* (pour **h**ypersensitivity **r**elated and **c**onserved, gènes *hrp* renommés *hrc* en raison de leur conservation dans l'ensemble des bactéries qui possèdent un système de sécrétion de type III). L'inoculation de feuilles de tabac par un mutant *hrpN* induit une légère RH avec une baisse de la fréquence d'apparition des symptômes alors qu'un double mutant *pelABCDE hrpN* est incapable d'induire une RH. Par ailleurs, la harpine purifiée HrpN d'*E. chrysanthemi* est capable d'induire à elle seule une RH sur feuille de tabac. Des mutants *hrcC* et *hrpG* voient leur virulence sérieusement diminuée sur des feuilles de saintpaulia, de même ils n'induisent pas de RH sur tabac contrairement à la souche sauvage alors qu'un mutant *hrpN* induit une légère RH. L'ensemble des données suggère que

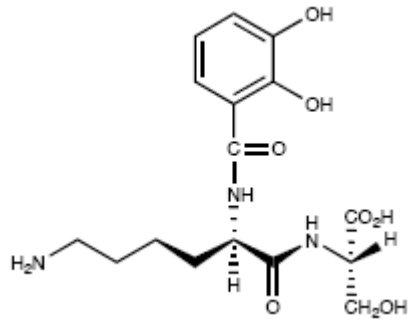
la protéine HrpN est importante lors des étapes précoces de l'infection (Yang *et al.*, 2002 ; Bauer *et al.*, 1995). En effet, le gène *hrpN* est induit au cours de l'infection par *E. chrysanthemi* 3937 de saintpaulia (Okinaka *et al.*, 2002). De plus, une coordination entre le système de sécrétion de type III et la pectinolyse a été mise en évidence par Nasser *et al.* (2005) montrant que le gène *hrpN* est réprimé par les régulateurs de la pectinolyse PecS et PecT.

### C. Composants de la surface bactérienne

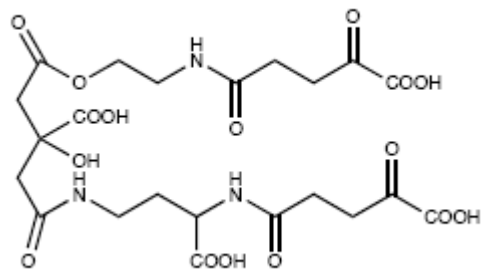
La première étape de l'interaction entre une bactérie et son hôte est son adhésion, qui requiert la présence des lipopolysaccharides (LPS), des exopolysaccharides (EPS) et des adhésines (Schoonejans *et al.*, 1987 ; Condemine *et al.*, 1999 ; Rojas *et al.*, 2002). Des mutants affectés dans la structure de leur LPS, ne sont plus pathogènes sur saintpaulia bien que capables de produire des enzymes dégradatives extracellulaires (Schoonejans *et al.*, 1987). Par ailleurs, ces mutants du LPS sont capables d'induire les réactions de défense de la plante. Le LPS serait impliqué dans les étapes précoces de l'infection en relation avec la réaction hypersensible. Des mutants affectés dans la biosynthèse d'EPS présentent un retard dans l'apparition des symptômes sur saintpaulia, et le stade de macération systémique n'est jamais atteint (Condemine *et al.*, 1999). Une mutation dans le gène *hecA* codant une adhésine réduit le pouvoir pathogène de la souche EC16 d'*E. chrysanthemi* sur des semis de *Nicotiana clevelandii* (Rojas *et al.*, 2002). L'hypothèse proposée est que les mutants du LPS, EPS et adhésine sont incapables d'adhérer à la paroi végétale et donc de réussir leur infection.

### D. Assimilation du fer

Dans la partie suivante, nous allons présenter en détail l'importance de l'assimilation du fer dans le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*. A cause de ses propriétés chimiques, de son importance dans les réactions biochimiques et de son insolubilité aux pH physiologiques en aérobie, le fer est souvent l'objet d'une compétition entre la bactérie et son hôte pour son acquisition. L'issue de cette compétition va déterminer le succès de l'infection. Durant l'infection, les bactéries se disséminent dans l'espace intercellulaire du végétal appelé apoplasme où elles sont confrontées à une faible disponibilité en fer (Neema *et al.*, 1993).



Chrysobactine



Achromobactine

Figure 3 : Structure des deux sidérophores chrysobactine et achromobactine d'*E. chrysanthemi* 3937.

Le fer se trouve sous forme de citrate ferrique principalement ou de malate dans l'apoplasme de la plante, or *E. chrysanthemi* est incapable d'utiliser directement le citrate ferrique comme source de fer. De plus, des ligands forts du fer tels les polyphénols sont produits par la plante en réponse à divers stress et limitent le développement des bactéries (Mila et al., 1996). Afin de lutter contre la faible disponibilité en fer, *E. chrysanthemi* comme la plupart des bactéries a développé des mécanismes d'acquisition du fer à haute affinité. Le type de système d'acquisition du fer le plus répandu est l'utilisation de sidérophores (Neilands, 1995). Il s'agit de petites molécules organiques pouvant atteindre jusqu'à 1200 daltons et ayant une très forte affinité pour l'ion ferrique. Il existe trois classes de sidérophores (catécholates, hydroxamates et hydroxycarboxylates) qui se distinguent par la structure chimique du groupement qui fixe le fer. Deux systèmes de transport du fer ont été identifiés chez *E. chrysanthemi* impliquant deux sidérophores de structure distincte : la chrysobactine et l'achromobactine (fig. 3). *E. chrysanthemi* est également capable d'utiliser des sidérophores exogènes comme l'entérobactine produite par *E. coli* et les espèces *Salmonella*, *Klebsiella* et *Shigella* ainsi que le ferrichrome produit par les champignons (Persmark et al., 1989 ; Crosa et Walsh, 2002 ; Schrettl et al., 2004).

### 1. La chrysobactine

Le premier sidérophore à avoir été caractérisé chez *E. chrysanthemi* a été la chrysobactine. Cette dernière est détectée dans les fluides de feuilles de plantes infectées avec la souche sauvage 24H après inoculation (Neema et al., 1993). Il s'agit d'un monocatécholate [N-(N2-(2,3-dihydroxybenzoyl)-D-lysyl)-L-sérine] dérivant de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA) sur lequel est condensé un dipeptide de résidus lysine et sérine (Enard et al., 1988 ; Persmark et al., 1989). Seuls les groupements hydroxyyles du catéchol sont impliqués dans la chélation du fer suggérant que deux ou trois molécules de chrysobactine sont nécessaires pour la coordination d'un atome de fer (Persmark et al., 1992). La chrysobactine possède un pFe de 17,1 plus important que celui du citrate ou du malate qui transportent le fer dans les plantes et peut ainsi capturer le fer à partir de ces complexes ferriques. Le pFe mesure la concentration en fer libre à pH 7,4 pour une concentration de chélateur de  $10^{-5}$  M et une concentration de fer égale à  $10^{-6}$  M.

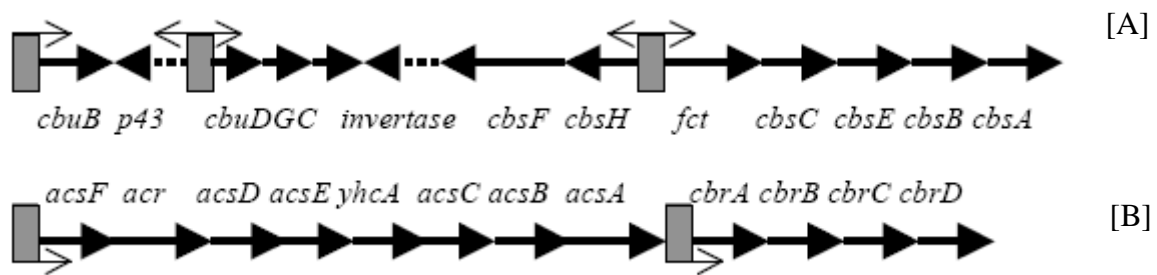


Figure 4 : Organisation génétique des gènes de biosynthèse (*cbs* et *acs*) et de transport (*fct*, *cbu*, *acr*, *cbr*) de la chrysobactine [A] et de l'achromobactine [B] chez *E. chrysanthemi* 3937. Les rectangles indiquent les promoteurs et les flèches indiquent les directions de transcription.

Les différentes étapes requises pour la biosynthèse de la chrysobactine et le transport de la ferri-chrysobactine à l'intérieur de la cellule ont pu être caractérisées à partir de mutants d'*Erwinia chrysanthemi* incapables de croître en présence du chélateur du fer EDDHA (Enard et al., 1988). Le système de transport du fer via la chrysobactine est codé par une région génique qui inclut trois opérons et deux unités monocistroniques (fig. 4 [A]). Ces opérons sont sous le contrôle de deux promoteurs divergents (bidirectionnels). Un premier opéron comporte les gènes *fct*, *cbsC*, *cbsE*, *cbsB* et *cbsA* codant respectivement le récepteur de la ferri-chrysobactine Fct situé sur la membrane externe et les enzymes responsables de la synthèse du DHBA de la chrysobactine (Franza et al., 1991). Le récepteur Fct (ferric chrysobactin transport), protéine de 81 kDa, est impliqué dans le passage de la ferri-chrysobactine à travers la membrane externe (Sauvage et al., 1996). Il interagit avec la protéine TonB qui lui transfère l'énergie nécessaire au transport de la ferri-chrysobactine. D'ailleurs un mutant *tonB* est incapable d'importer la ferri-chrysobactine (Enard et Expert, 2000). Les produits des gènes *cbsC*, *cbsE*, *cbsB* et *cbsA* sont homologues aux enzymes EntC, EntE, EntB, et EntA impliqués dans la biosynthèse de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA) précurseur de l'entérobactine chez *E. coli*. Les gènes *cbsA*, *cbsB*, *cbsC* et *cbsE* d'*E. chrysanthemi* peuvent compléter les mutants *entA*, *entB*, *entC* et *entE* d'*E. coli* respectivement : le DHBA est donc un intermédiaire commun à la biosynthèse de l'entérobactine et de la chrysobactine. Un second opéron est constitué de deux gènes *cbsF* et *cbsH* codant la protéine CbsF, une chrysobactine synthase (synthèse de peptide par voie non ribosomique) et la protéine CbsH, une oligopeptidase. La protéine CbsF permet l'assemblage des 3 composants de la chrysobactine qui sont le DHBA, la D-Lysine et la L-sérine. La protéine CbsH dégrade la chrysobactine dans le cytosol de la bactérie. Un mutant *cbsH* accumule la ferrichrysobactine dans son cytosol, suggérant que cette dernière n'est pas dégradée après son transport (Rauscher et al., 2002). Par ailleurs, il est affecté pour sa croissance en raison de la chélation du fer dans la cellule (Rauscher et al., 2002). Un troisième opéron comprend les trois gènes *cbuC*, *cbuD* et *cbuG* dont les produits forment la chrysobactine perméase CbuCDG. Le gène *p43* dont le produit est une protéine homologue à EntS d'*E. coli* supposée être impliquée dans l'excrétion de la chrysobactine dans le milieu extracellulaire (Expert et al., 2004). Quant au gène *cbuB*, il forme une unité monocistronique. La chrysobactine perméase CbuBCDG est un transporteur de type ABC homologue à la perméase de la ferri-entérobactine FepBCDG chez *E. coli* et qui est impliquée dans le passage de la ferri-chrysobactine à travers la membrane interne d'*Erwinia chrysanthemi*. La protéine CbuB est responsable de la fixation de la chrysobactine dans le périplasme, CbuC fixe l'ATP

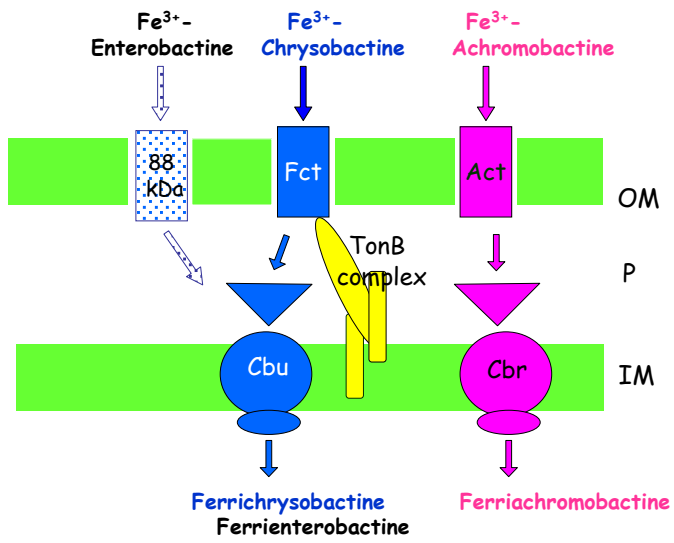


Figure 5 : Systèmes de transport des sidérophores, chrysobactine et achromobactine chez *E. chrysanthemi* 3937.

et les protéines CbuD et CbuG constituent la perméase à proprement dite. L'ensemble des acteurs du système de transport de la ferri-chrysobactine chez *E. chrysanthemi* 3937 est présenté sur la figure 5. Des expériences de complémentation nutritionnelle et de transport ont montré que des mutants *cbu* d'*E. chrysanthemi* affectés pour cette perméase sont incapables d'utiliser la chrysobactine. La ferri-entérobactine passe à travers la membrane interne par l'intermédiaire de la même perméase. En effet, des mutants *cbu* sont également incapables d'utiliser la ferri-entérobactine. Des mutants de biosynthèse de la chrysobactine sont affectés dans leur croissance et engendrent des symptômes localisés au niveau de la feuille inoculée sur saintpaulia contrairement à la souche sauvage. Les lésions initiées par le mutant deviennent sèches en quelques jours et n'aboutissent pas à une systémie (Masclaux and Expert, 1995).

## 2. L'achromobactine

Le deuxième sidérophore d'*E. chrysanthemi*, l'achromobactine a été identifié chez des mutants déficients dans la production de chrysobactine et qui présentaient encore une activité sidérophore, révélée par la formation d'un halo de décoloration sur milieu CAS agar. L'achromobactine permet aux mutants déficients pour la production de chrysobactine de croître en présence d'un chélateur du fer ferreux, comme le 2, 2'-dipyridyl. Des doubles mutants déficients pour la production d'achromobactine et de chrysobactine sont incapables de se développer en présence de 2,2'-dipyridyl et de former un halo de décoloration sur milieu CAS-agar. L'achromobactine appartient à la catégorie de sidérophores dérivés du citrate. Münzinger *et al.* (2000) ont déterminé la structure de ce sidérophore (fig. 3). Il est composé d'une molécule de citrate, d'éthanolamine, d'acide diamino-butyrique et deux molécules d'acide 2-oxo-glutarique.

Une analyse génétique a montré que les gènes de biosynthèse et de transport de l'achromobactine sont organisés en deux opérons juxtaposés (fig. 4 [B]). Le premier opéron comporte les gènes impliqués dans la biosynthèse (*acs*), l'excrétion (*yhcA*) et le transport (*acr*) de la ferri-achromobactine. Le gène *acsF* interviendrait dans la synthèse d'acide diamino-butyrique et d'acide 2-oxo glutarique, précurseurs de l'achromobactine. Les gènes *acsA*, *acsC* et *acsD* coderaient les trois composants de l'achromobactine synthase impliqués dans la formation des liaisons amide et ester lors de la condensation des précurseurs sur le citrate. Le gène *acr* code le récepteur spécifique de ce sidérophore au niveau de la membrane externe. La protéine Acr possède à son extrémité C-terminale une boîte TonB, caractéristique



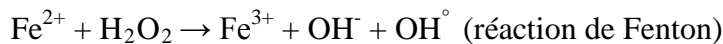
des récepteurs de membrane externe. Le second opéron comporte les gènes *cbrA*, *cbrB*, *cbrC* et *cbrD* codant la perméase de la ferri-achromobactine située au niveau de la membrane interne (fig. 5). Des mutants *cbr* qui ne produisent pas la perméase de l'achromobactine accumulent l'achromobactine dans le milieu extracellulaire et sont déréprimés pour la production de chrysobactine (Mahé et al., 1995). L'ensemble des acteurs du système de transport de la ferri-achromobactine chez *E. chrysanthemi* 3937 est présenté sur la figure 5. Le gène *yhcA* localisé avec les gènes de biosynthèse et d'import de l'achromobactine, code une protéine dont la séquence comporte les caractéristiques des pompes à efflux de type MFS (Major Facilitator Superfamily), suggérant que la protéine YhcA jouerait un rôle dans l'export de l'achromobactine dans le milieu extracellulaire chez *E. chrysanthemi*. Des mutants affectés dans la biosynthèse de l'achromobactine sont moins virulents que la souche sauvage sur plante : en effet, ils développent des lésions qui sont confinées à la zone inoculée (Franza et al., 2005).

Chez *Erwinia chrysanthemi*, une carence en fer va fortement induire les gènes de biosynthèse et de transport des sidérophores sous le contrôle du répresseur transcriptionnel Fur. Le mécanisme de régulation par Fur sera détaillé ultérieurement. L'expression des gènes de biosynthèse de l'achromobactine nécessite une carence en fer moins importante que celle de la chrysobactine qui est produite dès que la synthèse d'achromobactine décline. Par ailleurs, leur affinité pour le fer est distincte. Le rôle de l'achromobactine serait d'aider de manière transitoire les cellules bactériennes à faire face à une carence en fer jusqu'à ce que la chrysobactine soit complètement induite (Franza et al., 2005). D'ailleurs, l'induction des gènes de biosynthèse de la chrysobactine *in planta* coïncide avec l'induction des gènes codant les pectate lyases à l'exception du gène *pelD* qui est induit plus tôt (Masclaux et Expert, 1995). La mutation *tonB* abolit le transport de ferri-achromobactine, ferri-chrysobactine et ferri-entérobactine chez *E. chrysanthemi* 3937. Ces systèmes de transport du fer à haute affinité requièrent le complexe TonB pour apporter l'énergie nécessaire. Néanmoins, un mutant *tonB* d'*E. chrysanthemi* 3937 n'est pas sévèrement affecté pour sa virulence sur violette africaine, sans doute car il présente une activité pectate lyase deux fois plus importante que la souche sauvage (Enard et al., 2000). De plus, un deuxième gène *tonB* a été récemment identifié dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937.

## E. Facteurs de résistance au stress oxydant

### 1. Dommages causés par le stress oxydant

La résistance au stress oxydant est un déterminant important de la virulence d'un certain nombre de bactéries pathogènes dont *E. chrysanthemi*. Toute bactérie doit se prémunir contre les espèces actives de l'oxygène, comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, qui sont à l'origine de graves dommages cellulaires. L'anion superoxyde peut oxyder les clusters [Fe-S] des enzymes, libérant ainsi du fer ferreux dans le cytoplasme de la bactérie et inactivant ces enzymes (Fridovich, 1995). Quant au peroxyde d'hydrogène, il s'attaque aux clusters [4Fe-4S] et aux atomes de soufre des résidus méthionine et cystéine (Imlay, 2003). Par ailleurs, il réagit avec le fer ferreux libre selon la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxyles. Ces radicaux sont les espèces actives de l'oxygène les plus toxiques. Ils sont responsables de cassures de l'ADN, de la peroxydation des lipides et de la carbonylation des protéines (Imlay, 2003).



### 2. Défenses contre le stress oxydant

Pour contrer l'action de ces espèces actives de l'oxygène, les bactéries disposent de systèmes de détoxification ou de réparation.

#### a. La méthionine sulfoxide réductase

Beaulieu et Van Gijsem (1990) ont identifié des gènes spécifiquement exprimés par *E. chrysanthemi* au cours de l'infection de la plante hôte à partir d'une banque de mutants obtenus par mutagenèse par transposon mini-Mu. Ils ont constaté que certains mutants présentaient un pouvoir pathogène réduit sur *Sainfoin*, mais n'étaient pas affectés ni dans la production d'enzymes dégradatives, ni dans les systèmes de transport du fer. Ces loci spécifiquement induits en cours d'infection et nommés *pin* (*p*lant *i*nducible), ont été caractérisés au niveau moléculaire par Barras et son équipe. En particulier le locus *pin 14* qui s'est révélé être le gène *msrA* codant la méthionine sulfoxyde reductase qui catalyse la

réduction des résidus méthionines sulfoxydes en méthionine. Un mutant *msrA* d'*E. chrysanthemi* est incapable d'induire une réponse systémique sur saintpaulia (Hassouni et al., 1999) et est plus sensible au paraquat et au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage. Une étude par IVET (In vivo Expression Technology) a montré que le gène *msrA* est induit *in planta* au cours de l'infection de feuilles d'épinard par *E. chrysanthemi* (Yang et al., 2004). Une seconde méthionine sulfoxyde réductase MsrB a été identifiée chez *E. chrysanthemi* : celle-ci pourrait fonctionner conjointement avec MsrA pour réparer les protéines endommagées.

#### b. Les superoxyde dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases constituent un moyen de défense contre le stress oxydant dû aux anions superoxyde. La réaction est catalysée par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature détermine trois types de SOD chez de nombreuses bactéries: la superoxyde dismutase à fer Fe-SOD, la superoxyde dismutase à manganèse Mn-SOD et la superoxyde dismutase à cuivre/zinc Cu-Zn-SOD (Touati et al., 2000). Les superoxyde dismutases réalisent la conversion de deux anions superoxyde  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et  $O_2$ . *Erwinia chrysanthemi* possède une seule superoxyde dismutase cytoplasmique Mn-SOD qui est codée par le gène *sodA* et une superoxyde dismutase Cu,Zn-SOD périplasmique qui est codée par le gène *sodC*. Un mutant *sodA* d'*Erwinia chrysanthemi* est incapable de provoquer de réponse systémique sur saintpaulia, il produit seulement de petites lésions nécrotiques. A l'inverse, ce mutant macère des tubercules de pomme de terre comme la souche sauvage. L'activité Mn-SOD semble être importante au cours des premières étapes de l'infection de saintpaulia par *E. chrysanthemi* où une production d'anions superoxydes  $O_2^-$  est déclenchée par la plante hôte (Santos et al., 2001).

#### c. Flavohémoglobine

Un autre facteur important pour la pathogénicité d'*Erwinia chrysanthemi* est la flavohémoglobine HmpX (Favey et al., 1995). Cette dernière catalyse l'oxydation de l'oxyde nitrique en nitrate moins toxique. Elle est composée d'un domaine N-terminal homologue aux hémoglobines possédant un hème et d'un domaine C-terminal homologue aux ferredoxine-NADP<sup>+</sup> oxydo-réductases (Wu et Poole, 2003). Chez *E. chrysanthemi*, HmpX consomme le NO jouant ainsi un rôle dans la protection contre un stress nitrosilant. La protéine HmpX d'*E.*

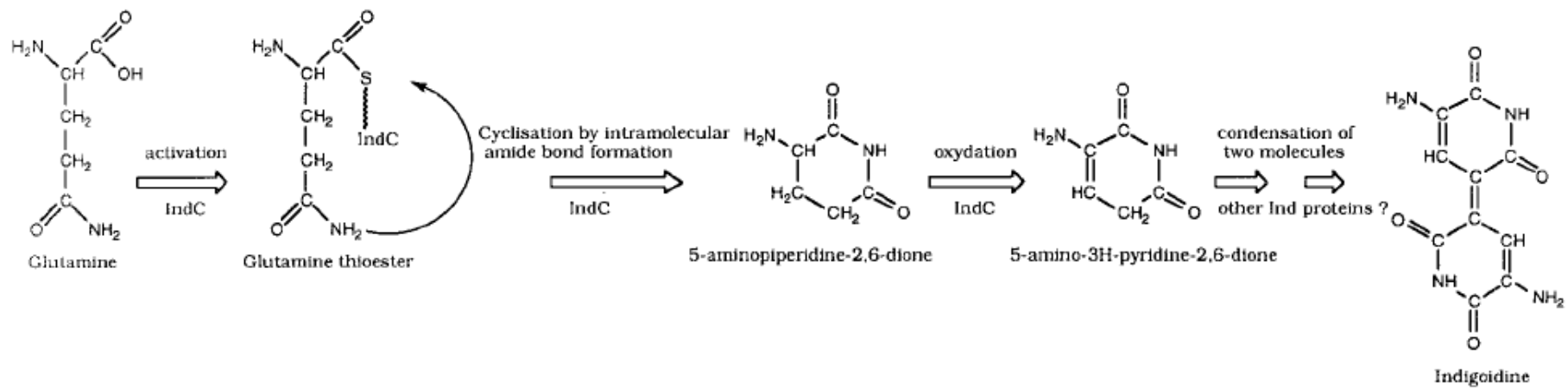


Figure 6 : Voie de biosynthèse de l'indigoïdine chez *E. chrysanthemi* 3937.

*chrysanthemi* est critique pour la pathogénicité sur saintpaulia : en effet un mutant *hmpX* d'*Erwinia chrysanthemi* est incapable de macérer des feuilles de saintpaulia et présente une croissance *in planta* limitée (Favey et al., 1995 ; Boccara et al., 2005).

#### d. Indigoidine

*Erwinia chrysanthemi* 3937 synthétise un pigment bleu dérivé du 3-3' dipyridyl, l'indigoidine [5,5'-diamino-4,4'-dihydroxy-3,3'-diazadiphenquinone-(2,2')], comme d'autres bactéries phytopathogènes (*Clavibacter michiganensis* sous-espèce *insidiosum*) (Starr et al., 1966) ou saprophytes (*Arthrobacter atrocyaneus* et *Vogesella indigofera*) (Heumann et al., 1968 ; Kuhn et al., 1965). Reverchon et al. (2002) ont identifié trois gènes *indA*, *indB* et *indC* impliqués dans la biosynthèse de l'indigoidine. L'expression des gènes *ind* est fortement déréprimée dans un contexte *pecS* suggérant que PecS est le principal régulateur de la synthèse de ce métabolite secondaire. Un mutant *ind* d'*E. chrysanthemi* affecté dans la production de ce pigment n'induit pas de réponse systémique sur saintpaulia et présente une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène : l'indigoidine protégerait les cellules bactériennes contre les espèces actives de l'oxygène produites par la plante en réponse à l'infection (Reverchon et al., 2002). En effet, le gène *indA* est induit au cours de l'infection de feuilles d'épinard par *E. chrysanthemi* (Yang et al., 2004).

#### e. Les catalases et peroxydases

Une production de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été montrée *in planta* sur feuilles de tabac lors de l'infection par *E. chrysanthemi* par Miguel et al. (2000) et également au laboratoire dans les espaces intercellulaires d'*Arabidopsis thaliana* où sont confinées les bactéries. Cette production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la plante lors de l'interaction plante-pathogène aurait pour but de lutter contre l'infection et constitue un mécanisme de défense. Une augmentation de l'activité catalase est d'ailleurs enregistrée sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles de tabac infectés par *E. chrysanthemi*, cependant son origine est principalement végétale, ce qui vient à l'encontre de l'effet antimicrobien du peroxyde d'hydrogène (Miguel et al., 2000). Un mutant d'*E. chrysanthemi* altéré dans le gène *oxyR* codant un régulateur transcriptionnel des gènes de défense face au peroxyde d'hydrogène présente des activités catalases et glutathione réductases réduites en comparaison à la souche sauvage et est plus sensible à une dose létale *in vitro* de peroxyde d'hydrogène.

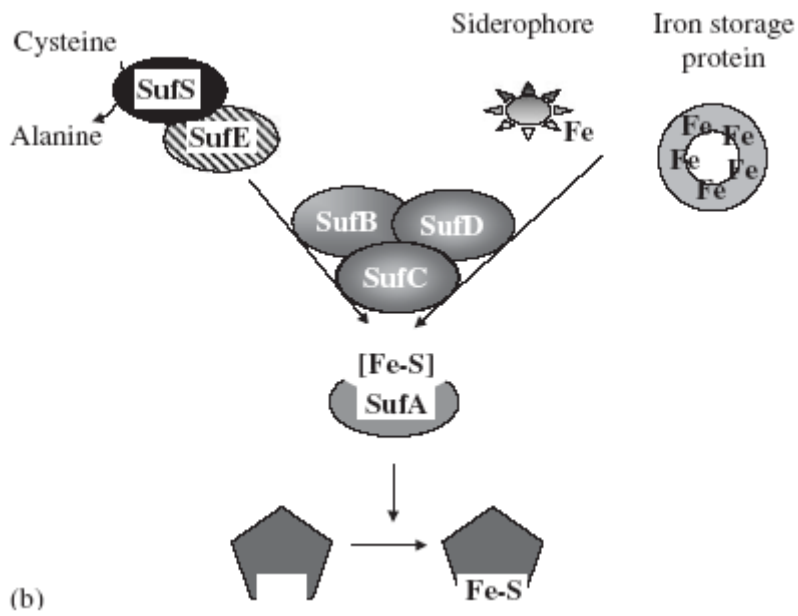


Figure 7 : Modèle d'action de la machinerie Suf impliquée dans la réparation des centres [Fe-S] des métalloprotéines chez *E. coli* en conditions de stress oxydant ou de carence en fer.

Les catalases catalysent la conversion de deux molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en une molécule de O<sub>2</sub> et deux molécules de H<sub>2</sub>O, permettant ainsi de détoxifier le peroxyde d'hydrogène. Il en existe deux types chez *E. chrysanthemi*, comme chez *E. coli*, HPI (hydroperoxidase I), catalase homotétramérique et HPII (hydroperoxidase II), catalase homohexamérique codées respectivement par les gènes *katG* et *katE* (Loewen *et al.*, 1984 et 1985). Néanmoins, le rôle des catalases et des peroxydases au cours de l'infection par *E. chrysanthemi* reste à déterminer. En effet, un mutant *oxyR* d'*E. chrysanthemi* est aussi virulent que la souche sauvage sur tubercules de pomme de terre et sur feuilles de tabac. *E. chrysanthemi* possède également une alkyl hydroperoxyde reductase AhpCF formée d'une sous-unité catalytique AhpC et d'une sous-unité réductase AhpF (Poole *et al.*, 1996 ; Storz *et al.*, 1989). Une analyse par puces à ADN a révélé que le gène *ahpF* est induit au cours de l'infection par *E. chrysanthemi* de plantes de saintpaulia (Okinaka *et al.*, 2002)

#### f. Machinerie Suf

L'augmentation de la concentration intracellulaire en fer réactif consécutive à la destruction des centres [Fe-S] de protéines peut stimuler la production des formes actives de l'oxygène. C'est pourquoi, la réparation des clusters [Fe-S] est primordiale pour la bactérie afin de réduire la concentration du fer réactif dans le cytosol et de limiter ainsi son effet délétère. Cette fonction est assurée par le système Suf qui est en ce sens un acteur central de l'homéostasie du fer durant l'infection par la bactérie, notamment en conditions de stress oxydant et/ou carence en fer (Nachin *et al.*, 2003). Le locus *pin 10*, mis en évidence par Beaulieu et Van Gijsem (1990) pour son importance dans la virulence d'*E. chrysanthemi*, est homologue au locus *suf* d'*E. coli* (Patzer et Hanke, 1999) et comporte les gènes *suf ABCDSE* organisés en opéron. Les différentes protéines de la machinerie Suf sont organisées en deux complexes SufSE et SufBCD et la protéine SufA (fig. 7). SufS serait une cystéine désulfurase qui catalyse la conversion de L-cystéine en L-alanine et un acide sulfénique. Loiseau *et al.* (2003) ont constaté à leur grande surprise que SufS seul présente une faible activité cystéine désulfurase. Ils ont montré que l'interaction de SufS avec SufE augmente drastiquement son activité Cystéine désulfurase. Des expériences de mutagenèse dirigée ont révélé que la cystéine en position 364 de la protéine SufS est essentielle à l'activité cystéine désulfurase du complexe SufSE. La protéine SufC serait une ATPase appartenant à la famille des transporteurs de type ABC localisée dans le cytoplasme où elle interagit avec SufB et SufD formant un complexe. Elle semble être la protéine la plus critique pour la constitution des

centres [Fe-S] au cours d'un stress oxydant ou une carence en fer (Nachin et *al.*, 2003 ; Outten et *al.*, 2003). Les protéines SufB et SufD sont paralogues entre elles et n'ont aucune homologie avec des protéines de fonction connue (Loiseau et *al.*, 2003). Le complexe SufBCD permet d'augmenter l'activité cystéine desulfurase du complexe SufSE (Outten et *al.*, 2003). Quant à la protéine SufA, elle serait une protéine d'échafaudage pour l'assemblage des centres [Fe-S]. Elle est supposée fixer le centre[Fe-S] par l'intermédiaire de trois cystéines conservées et serait impliquée dans le transfert des centres [Fe-S] aux apoprotéines cibles (Loiseau et *al.*, 2003). Chez *E. chrysanthemi*, un mutant *sufS* est plus sensible à une carence en fer générée par le 2, 2'-dipyridyl. L'inactivation des gènes *sufC* et *sufD* entraîne une sensibilité accrue d'*E. chrysanthemi* au paraquat, par contre l'absence des autres protéines Suf ne modifie en rien cette sensibilité. Par ailleurs, un mutant *sufS* est significativement affecté en présence de streptonigrine dont l'activité toxique est activée par le fer. Plus récemment, Nachin et *al.* (2003) ont montré que les mutants *sufB*, *sufC* et *sufD* sont incapables d'utiliser la chrysobactine ferrée comme source de fer. La machinerie Suf serait donc impliquée dans la réparation des centres [Fe-S] d'une métalloprotéine requise au « relarguage » du fer à partir de la ferrichrysobactine. Il a été proposé que la réductase de la ferrichrysobactine, responsable de la libération du fer à partir de la chrysobactine, soit une protéine à centre [Fe-S], dont le centre serait mis en place par la machinerie Suf. Cet opéron *suf* est important pour le développement d'une réponse systémique sur saintpaulia (Beaulieu et Van Gijsegem, 1990). Des travaux de Nachin et *al.* (2001) ont révélé que le gène *sufC* est essentiel au pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* sur endives et saintpaulia.



## Chapitre II

### Homéostasie du fer

## I- Le paradoxe du fer

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, néanmoins il est très peu disponible dans l'environnement. En solution aqueuse, le fer se présente sous deux formes ioniques interconvertibles, l'ion ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  et l'ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ . C'est la forme ferrique qui prédomine aux pH physiologiques en aérobie. Compte tenu de son insolubilité, il est toujours complexé à des molécules. A pH 7, la solubilité du fer ferrique est de l'ordre de  $10^{-17}$  M alors que les besoins pour la croissance bactérienne sont de l'ordre du micromolaire (Braun and Killmann, 1999). Il s'agit d'un élément indispensable pour la croissance et le développement de tout organisme. En effet, de par ses propriétés, il participe à une grande variété de réactions d'oxydoréduction, et catalyse de nombreuses réactions impliquant l'oxygène moléculaire. Il est impliqué dans divers processus biologiques essentiels à la vie, allant de la respiration à la synthèse de l'ADN. Les seules exceptions à cette exigence en fer sont les bactéries lactiques qui utilisent le manganèse et le cobalt à la place du fer (Archibald 1983 ; Bruyneel et al. 1989 ; Imbert et Blondeau 1998 ; Pandley et al., 1994 ; Weinberg 1997) et *Borrelia burgdorferi* qui utilise le manganèse (Posey et Gerhardini, 2000). Paradoxalement, le fer peut être toxique à l'état ferreux de par sa faculté à exacerber le stress oxydant en présence d'oxygène en générant via la réaction de Fenton des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ) hautement toxiques.

Il y a donc nécessité pour la bactérie de réguler finement ses concentrations cellulaires en fer. Il s'agit de maintenir une concentration intracellulaire en fer suffisante pour répondre aux besoins cellulaires et non excessive pour éviter son effet toxique. C'est la définition même de l'homéostasie du fer.

## II- Homéostasie du fer et coordination entre les systèmes de transport, de consommation/distribution et de stockage du fer

De par la toxicité du fer et son besoin fondamental, la bactérie doit assurer l'homéostasie du fer en coordonnant ses systèmes de transport, de consommation/distribution et de stockage du fer en fonction de la disponibilité de ce métal dans son environnement et des stress externes.

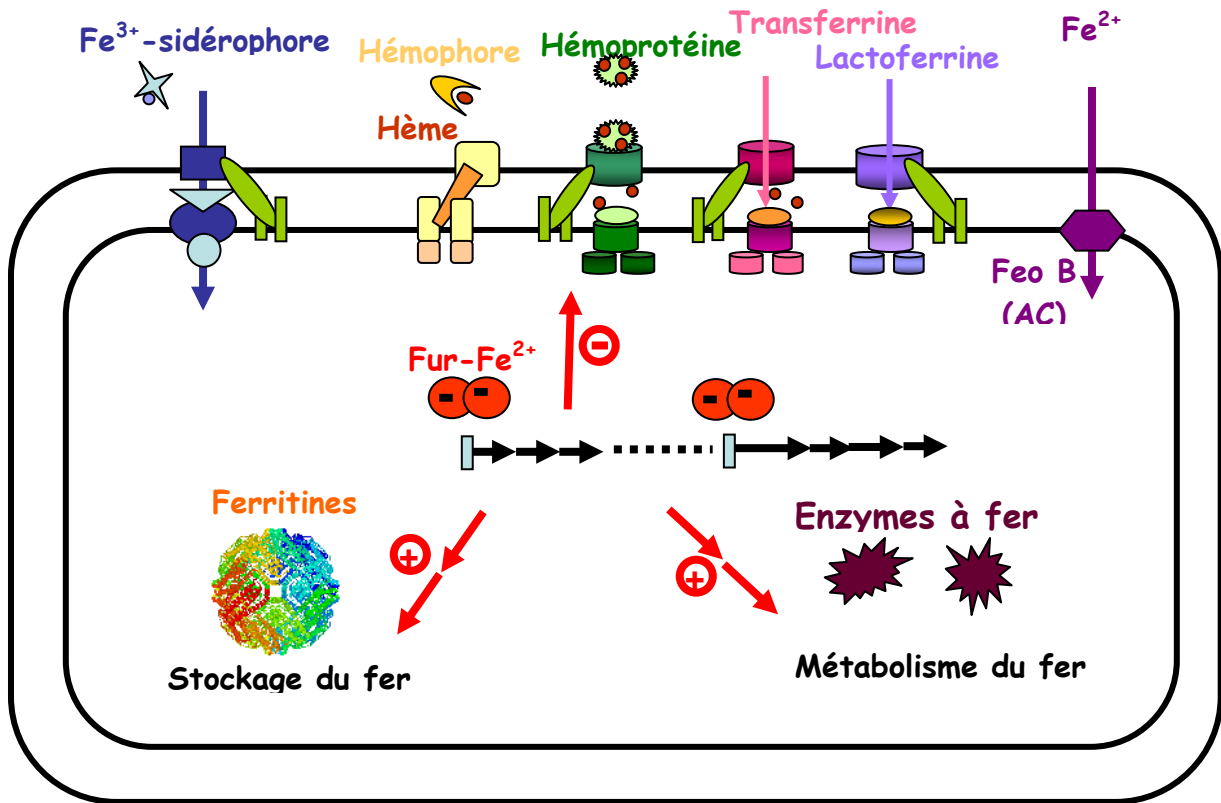


Figure 8 : Schéma représentant les différents systèmes de transport du fer et d'hème chez les bactéries Gram<sup>-</sup>. On distingue les voies d'acquisition du fer ferrique via les sidérophores, du fer ferreux via le système Feo, d'acquisition de l'hème via les hémophores ou les hémoprotéines et de transport des protéines transferrine et lactoferrine. L'ensemble de ces systèmes d'assimilation du fer est contrôlé par le répresseur transcriptionnel Fur qui en présence de fer les réprime. Fur est un senseur du fer et un régulateur global du métabolisme du fer. Pour assurer l'homéostasie du fer, la bactérie va coordonner ses systèmes d'acquisition du fer, mais également ses systèmes de stockage du fer (ferritines) et son métabolisme, c'est-à-dire ses besoins en fer (enzymes à fer).

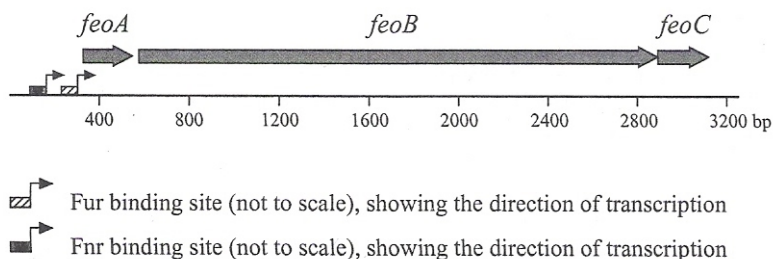


Figure 9 : Organisation génétique de l'opéron *feoABC* impliqué dans le transport de fer ferreux chez *E. coli* K-12. Des boîtes Fur (Ferric Uptake Regulator) et Fnr sont présentes en amont du gène *feoA*. Fur est un répresseur transcriptionnel répondant à la présence de fer alors que Fnr est un activateur transcriptionnel répondant à l'absence d'oxygène.

## A. Transport du fer

### 1. Import

Les bactéries ont développé de nombreuses stratégies pour importer le fer selon les conditions environnementales rencontrées (fig. 8).

#### a. Transport du fer à haute affinité dépendant des sidérophores

Des systèmes à haute affinité ubiquitaire chez les différentes bactéries interviennent lorsque le fer est limitant dans l'environnement. Il implique de petites molécules appelées sidérophores qui sont relativement bien caractérisées et sont responsables du transport du fer sous forme ferrique. Les sidérophores ont une masse moléculaire trop élevée pour leur permettre de passer à travers les porines. Des transporteurs sont donc nécessaires pour les excréter dans le milieu extracellulaire. Malgré l'effort réalisé, très peu de travaux ont mis en évidence des systèmes d'export de sidérophores. Récemment, le gène *yhcA* a été identifié chez *E. chrysanthemi* (Franza et al., 2005).

#### b. Transport de fer ferreux

Il existe également un système de transport de fer ferreux qui a également son importance notamment dans des conditions d'anaérobiose où le fer est principalement à l'état ferreux. En effet dans ces conditions, le fer ferreux est plus stable et plus soluble que le fer ferrique. Il diffuse librement par l'intermédiaire des porines de la membrane externe des bactéries. Une fois dans l'espace périplasmique, il est pris en charge par un transporteur de fer ferreux désigné Feo. Le premier système bactérien de transport Feo a été découvert chez *E. coli*. L'analyse de la séquence du locus *feo* d'*E. coli* a suggéré dans un premier temps la présence de 2 gènes, *feoA* et *feoB* (Kammler et al., 1993). Aujourd'hui, on sait que le locus y est constitué de 3 gènes *feoA*, *feoB* et *feoC* organisés en opéron (fig. 9). Cependant, le gène *feoC* n'est pas systématiquement associé au système Feo comme chez *E. chrysanthemi*. FeoB est une grosse protéine de 773 acides aminés de la membrane cytoplasmique avec au moins 7 domaines transmembranaires, capable de fixer du GTP au niveau de son extrémité N-terminale. FeoB est requise au transport de fer ferreux ; en ce qui concerne FeoA et FeoC, leurs fonctions respectives ne sont pas encore déterminées.

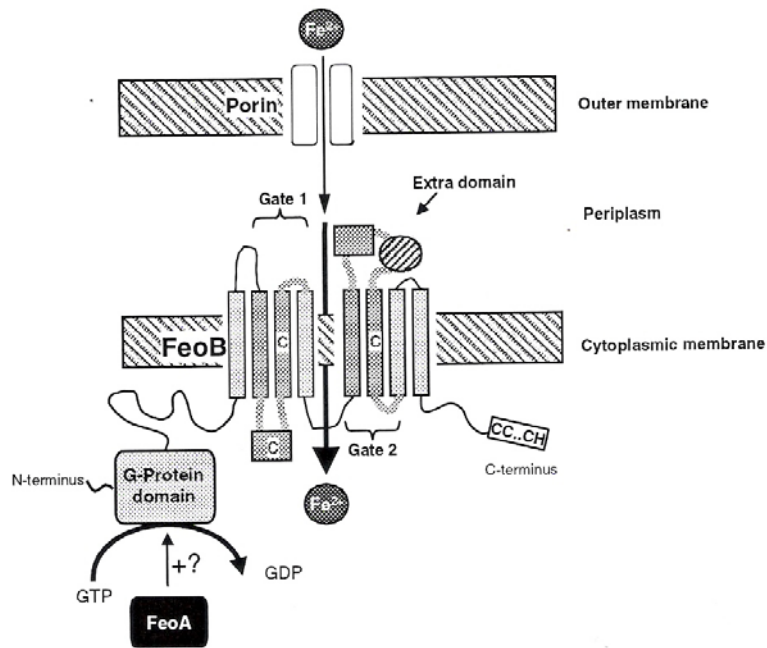


Figure 10 : Système de transport du fer ferreux Feo chez *E. coli* K-12. Le fer ferreux traverse la membrane externe par les porines et se retrouve dans le périplasm. Le transport de fer ferreux à travers la membrane cytoplasmique est assuré par la protéine FeoB avec l'aide des protéines FeoA et FeoC.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130     140
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    MYGNPNCCKTTLFNVLTGGKQTVGNMPCGTVVEKKGYSYRQQQVTLVDLPGVYSLNP--SSESSSEDERVVRDYILSGEANLVNIVDASMLERNLYLTAQLLDHQPVMVAVNMDIATARKLDIDIAGLQQR
Ec     MKKLTIGLIGNPNSGKTLFNQLTGSRRQVGNMAGVTVVERKEGGFSTTDHQVTLVDLPGTYSLTTISSQTSLEQIACHYILSGDADLLINVVDASMLERNLYLTLQELLEGIPIVALNMLDIAEKQNTIRIEIDALSAR
Consensus .....$!GNPNCCKTTLFNQLTGrQrVGNMAGVTVVERKGG%rtq%QVTLVDLPGTYSLNP.SS#SSeDeR!ArDYILSG#R#LIn!VDASMLERNLYLTAQLL#q!Pc!VAINM#DIAearnirI#IaalqaR

141    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260    270    280
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    LGCPYIPITASQKKGIEHLHEVCQAAALAQPIPPYSIPYDAPLSRAAQAIRERLQGGPAIRNPHMLAQIQLEGGDYTVRNRVTADALAFADQVTRLVAEYEDELDFLADARYQFVGTVAREVITRRGEVSATLTKIDR
Ec     LGCPYIPLVSTRGRGIEALKLAIDRYKANENVELVH--YAQPLLEADSLAKVNPSPDPLKQRRRLGLQMLEGDIYSR-AYAGESQHLDAALRLRNEHDDPA-LHIAADARYQCIARAICDVSNTLTAEPSRFTTAVDK
Consensus LGCPYIPItasrgrGIEALheac#aalA#en!eiVh..YaaPLIra#aiaer$gq#iair#rr#MLaiQ$LEGD!tsR.ayaa#AlahaDAaLaRLraEn#Dea.ihIAADARYQc!aa!areVinrrgaeeparlTda!Dr

281    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390    400    410    420
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    VVLRHFRFGIPIFLLVHYLMFVFTINVGSFIDFFDKLFGALLVEGFGELLAMHTPEMLKTLADGVGGGIQTVSTFIPVIGCLYLFLSMLEDSGYMARAARFVMDRFMRISGLPGKAFVPLIVGFGCNVPAVMATRHER
Ec     IVLNRFLGLPIFLFVHYLMFLAINDIGALQPLFDVGSVALFVHGIQMIGYTLHFPDMLTIFLAQGLGGGINTVLPVPIQIMHYLFLSFLSDSGYMARAARFVMDRLMQRLGLPGKSFVPLIVGFGCNVPSVMGARTLDA
Consensus !VLRHFRFGIPIFLLVHYLMFLLaIN!GgAlqldfDkgfGALlVeGiqeigla#HfP#HLkiLLa#GIGGGI#TVlPl!PqIGc$YLFSLFLEDSGYMARAARFVMDRLMraIGLPGKaFVPLIVGFGCNVPaVMaaRT$a

421    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520    530    540    550    560
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    HSDRVVTVHMAPFMSGARLPVYVLFASALFVEGGQNHVFLYLVGIAAAIATGFLLNKNTALKGDASAFVMEIPPYHLPSLRSVLIRTWERLKGFLLRAGRLIVVVVTVLGFVNSHGTDGSFGNQNTQKSVLSAVGQAIY
Ec     PRERLMIHMAPFMSGARLRAFAVFAAFFGQNGALAVFSLYHMGVMAVLTGLMLKYTIHRGEATPFVHELPPYHVPVHVKSLSLIQTWQRLKGFVLRAGKVIIVSIFLSAFHSFSLSGKIVD-NINDSALASVSRVIT
Consensus hr#RLnT!HMAPFMSGARLa!aIFaaAlFg#nGanaVfGLy$IGIaa!aTGl$KlNta#rG#AaSFVMEIPYHlPhlrSliIrTW#RLKGFLLRAGrI!!vsifLgaNSngldGkig#.Ni#dSaLaaVgraIt

561    570    580    590    600    610    620    630    640    650    660    670    680    690    700
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    PVFKPMGIREEMAPRAVGVFTGIFAKEAVVGTLDLSLYGHAASQSGGAKKEKTFSLTGGIHDRALATIPENLGLKGDALLNPNGINVGDLDTDITIAKDNKFSVTSLTVISQHFQDRLGAFSYLLMVLVLYIPCVAVSRIH
Ec     PVFKPIGVHEDNQATVGLFTGAMAKEVYVGTNLNTLYTAENIQDEEFNPAEFNLG----EELFSAIDETMQSLKDTFSLSVLHN----PIEASKGDGEMGTGAMGVMDQKFGSARAAYSYLIFVLLYVPCISVMGRIIA
Consensus PVFKPiG!rE#NMQaaVGLFTGanAKEaVVGTL#sLYGaeeaq#eegakaEknlg.....e#aalaaIdEnlqklgDallnpgiN.....di#aiaGOnengtga$gVidQkFdgaaaRZSYLInVLLY!PC!aangRIa

701    710    720    730    740    750    760    770    780    788
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech    REVGTAHTLFCAGHTIQGVGYSTAVVYQIGRFQHPLYSLCALLGVRAMLCVTVMLLRRNGLQRQRAVGEAK
Ec     RESSRGHMGFSLNGLNIAYSLATLFYQVASYSQHPYSLVCILAVILFNIVVIGLLRRARSRVIELLATRKSYSGCCAASSTGDCH
Consensus RESgraHngFcagHgi#!aYSIAtLfyQ!ar%aQHPLYSLcaILaVaamcVt!gLLRRARlrr#realaeaK.....

```

➤ 45 % d'identité de séquence

Figure 11 : Alignement des séquences des protéines FeoB d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et *E. coli* K12 (Ec).

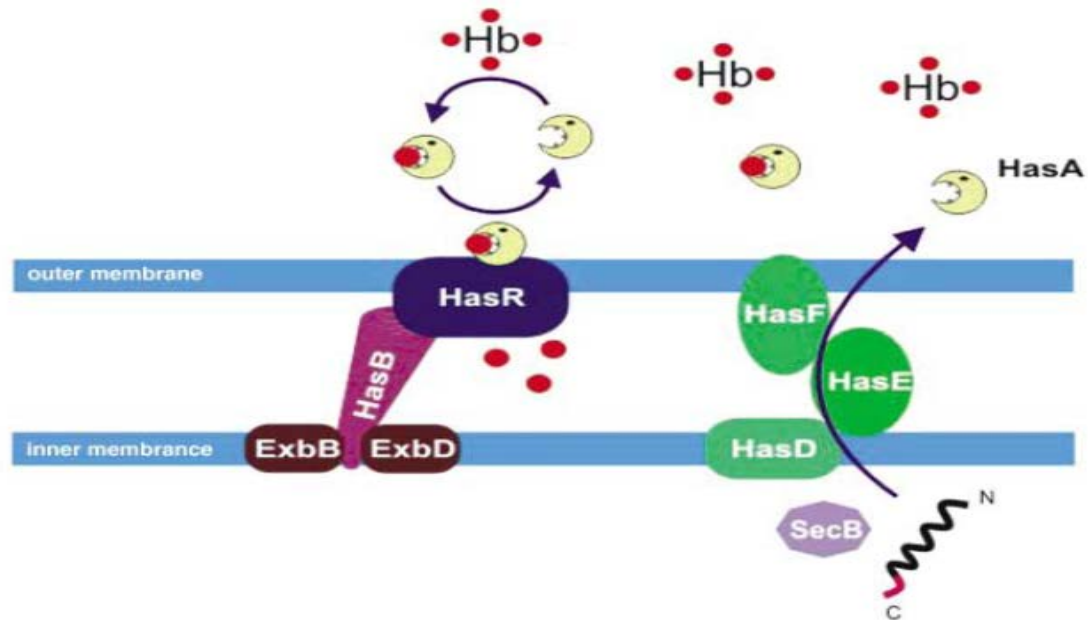


Figure 12 : Schéma représentant le système de transport de l'hème dépendant des hémophores chez *S. marcescens*. L'hémophore Has A (19 kDa) est sécrété dans le milieu extracellulaire par un transporteur de type ABC formé des protéines HasD, HasE et HasF où il fixe un hème libre ou dérobo l'hème d'un substrat tel que l'hémoglobine. Une fois chargé en hème, Has A interagit avec le récepteur de la membrane externe HasR et change de conformation libérant l'hème dans l'espace périplasmique et l'apo-hémophore se dissociant du récepteur. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est dégradé par une hème oxygénase libérant du fer qui pourra être utilisé par le métabolisme.

La figure 10 présente le modèle proposé pour le système Feo chez *E. coli*. L'importance du système Feo a été soulignée par des essais de transport de fer ferreux Fe<sup>55</sup> chez *E. coli* (Kammler et al., 1993). En effet, un mutant *feoB* est incapable de transporter du fer ferreux suggérant que FeoB a un rôle majeur dans le transport de fer ferreux. Le système Feo est un déterminant majeur de la virulence de plusieurs pathogènes notamment chez *E. coli* (Stojiljkovic et al., 1993), *H. pylori* (Velayudhan et al., 2000) et *P. gingivalis* (Dashper et al., 2005). Des homologues aux gènes *feoA* et *feoB* sont retrouvés chez *E. chrysanthemi* 3937 (fig. 11). Une analyse par puces à ADN a révélé que le gène *feoB* est induit au cours de l'infection de plantes de saintpaulia par *E. chrysanthemi* (Okinaka et al., 2002). Des travaux réalisés par Dominique Expert au laboratoire ont montré qu'une mutation *feoB* a un effet additif sur les mutations dans les gènes *cbs* et *acs* dans le pouvoir pathogène sur saintpaulia (D. Expert, communication personnelle).

### c. Transport d'hème

L'hème constitue également une source de fer pour certaines espèces bactériennes. Étant donné sa taille, il ne peut diffuser librement à travers la membrane externe par l'intermédiaire des porines. Le mécanisme le plus fréquent est la fixation directe de l'hème ou de l'hémoprotéine sur un récepteur spécifique situé sur la membrane externe HmuR. L'hème est ensuite relargué dans le périplasma et est transporté à travers la membrane cytoplasmique par un transporteur de type ABC composé des protéines HmuT, HmuU et HmuV. D'après l'analyse du génome d'*E. chrysanthemi* 3937, cette dernière possède un système analogue. Les bactéries Gram<sup>-</sup> disposent de systèmes spécifiques de transport de l'hème plus efficaces via des protéines nommées hémophores dont le premier a été caractérisé chez *S. marcescens* (Letoffe et al., 1999 ; Wandersman et Delepelaire, 2004 ; Cwerman et al., 2006 ; Izadi-Pruneyre et al., 2006). L'hémophore Has A (19 kDa) est sécrété dans le milieu extracellulaire par un transporteur de type ABC formé des protéines HasD, HasE et HasF où il fixe un hème libre ou dérobe l'hème d'un substrat tel que l'hémoglobine. Une fois chargé en hème, Has A se fixe au récepteur de la membrane externe HasR, provoquant un changement de conformation de la protéine HasA qui transfère son hème au récepteur HasR. HasR transporte l'hème dans l'espace périplasmique tandis que l'apo-hémophore se dissocie du récepteur. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est dégradé par une hème oxygénase libérant du fer qui pourra être utilisé par le métabolisme. Un tel système n'est pas trouvé chez *E. chrysanthemi* 3937. D'autres systèmes de transport de haute affinité existent chez de nombreuses espèces,



en particulier ceux permettant l'acquisition des protéines de l'hôte telles la lactoferrine et la transferrine.

L'énergie requise au transport des sidérophores, des hémophores, de la lactoferrine ou la transferrine est fournie par des complexes comportant les protéines TonB et ExbBD qui sont localisées dans la membrane cytoplasmique. Ces complexes transduisent l'énergie aux récepteurs de la membrane externe à partir d'une force proton motrice (gradient de charge électrochimique). Comme rapporté précédemment, le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 présente deux gènes *tonB* dont un a été caractérisé par Enard et Expert (2000) et dont le produit présente 58% d'identité de séquence avec la protéine TonB de *S. marcescens*. Le gène *tonB1* d'*E. chrysanthemi* 3937 affiche une séquence consensus de reconnaissance par Fur dans sa région promotrice suggérant une répression par Fur en présence de fer au même titre que chez de nombreuses bactéries (Postle, 1990 ; Young et *al.*, 1994).

L'ensemble des systèmes de transport du fer est contrôlé par un mécanisme pléiotropique dépendant de la protéine Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulator), senseur du fer dans la bactérie. Cette dernière fait 17 kDa chez *E. coli* et est constituée de deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice à l'extrémité N-terminale et un domaine de dimérisation qui possède deux sites de fixation à des métaux à l'extrémité C-terminale. Ce domaine C-terminal de Fur est nécessaire à la dimérisation de la protéine et comporte un site de fixation pour le fer et un autre distinct pour le zinc qui est essentiel à son activité (Bagg and Neilands, 1987 ; Saito and Williams, 1991 ; Jacquamet et *al.*, 1998 ; Althaus et *al.*, 1999). Le mécanisme par lequel Fur est activé par le fer n'est pas encore déterminé. L'hypothèse formulée est que la fixation du fer à Fur entraîne un changement de conformation de cette dernière avec une exposition de l'hélice impliquée dans la reconnaissance de l'ADN (Gonzalez de Peredo et *al.*, 2001). Lorsque le fer atteint une concentration intracellulaire suffisante, le fer ferreux se fixe à Fur, à raison d'un ion  $Fe^{2+}$  par monomère, ce qui augmente son affinité pour une séquence d'ADN conservée appelée boîte Fur située au niveau du promoteur entre les sites -35 et -10 des gènes cibles. La régulation par Fur est fondée sur une compétition directe entre Fur et l'ARN polymérase pour se fixer aux séquences cibles. Il en résulte un blocage de la transcription des gènes cibles. Lorsque le fer devient limitant, la protéine Fur perd son co-répresseur  $Fe^{2+}$  et n'a plus d'affinité pour la boîte Fur. Il en résulte une levée de répression des gènes cibles. Chez *E. coli*, la boîte Fur a été décrite comme une séquence consensus palindromique de 19 paires de bases riche en A-T (incluant deux motifs inversés) sur des faces opposées de l'hélice d'ADN (De Lorenzo et *al.*, 1987).

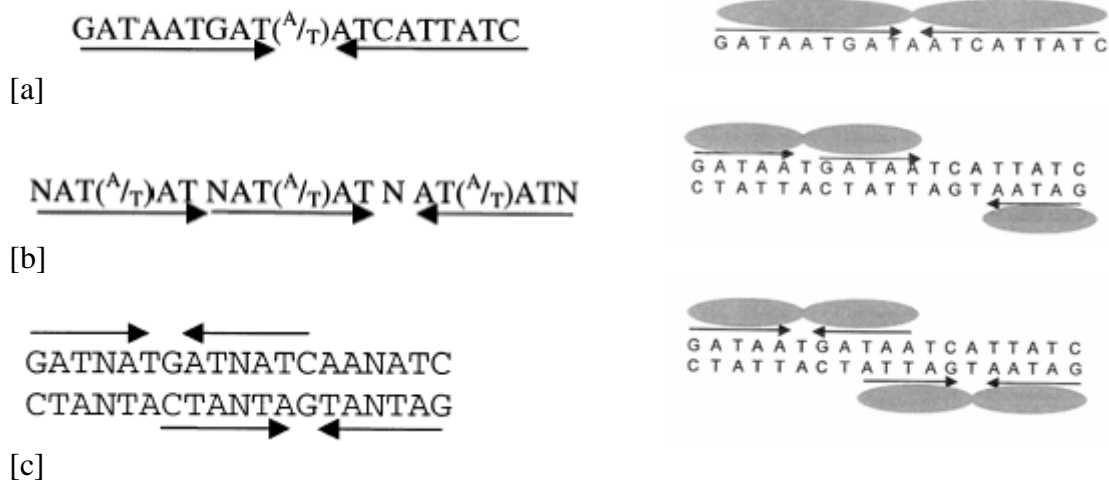


Figure 13 : Différents modèles d'interaction de la protéine Fur sur la séquence consensus définie pour la boîte Fur chez *E. coli*.

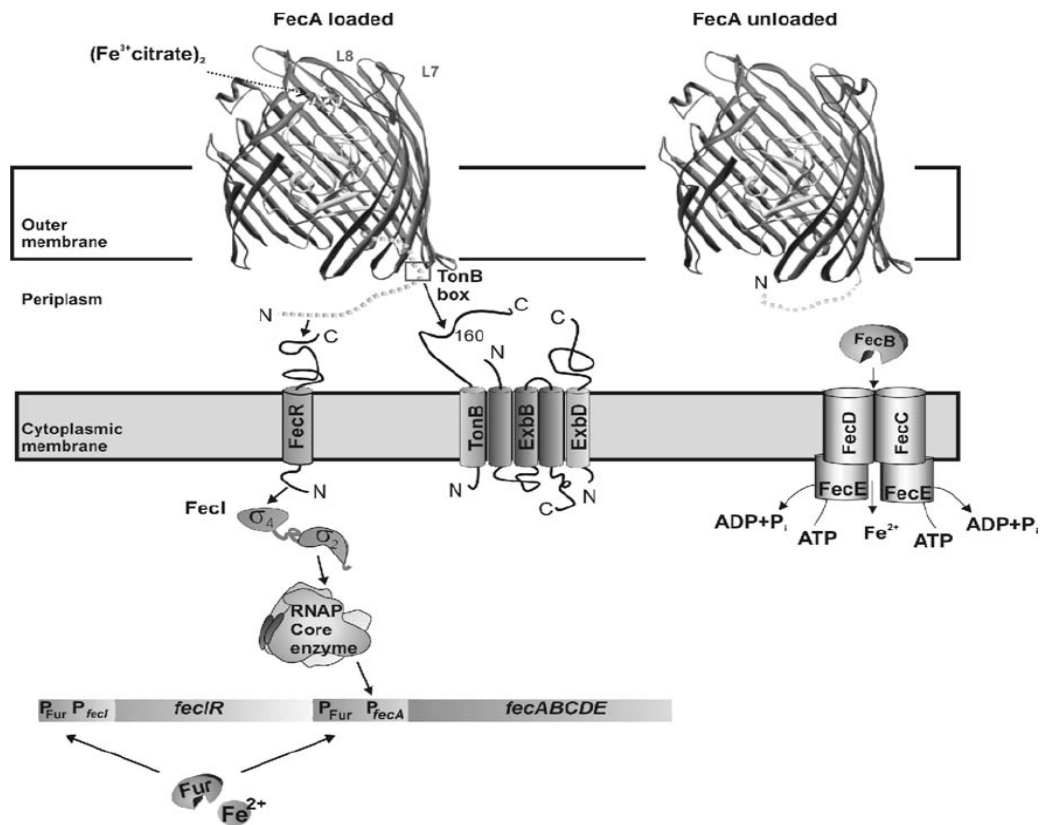


Figure 14 : Schéma représentant le système de transport du citrate ferrique et son mécanisme de régulation chez *E. coli* (Braun et al., 2006) : le récepteur FecA situé dans la membrane externe, la protéine périplasmique FecB qui prend en charge le dicitrate ferrique et le délivre à la perméase de type ABC FecCDE. La fixation de dicitrate ferrique sur le récepteur FecA engendre un changement de conformation de FecA qui interagit avec le facteur anti- $\sigma$  FecR au niveau de la membrane cytoplasmique délivrant le facteur  $\sigma$  FecI qui se fixe à l'ARN polymérase et induit la transcription des gènes *fecABCDE*.

Un premier modèle propose que chaque monomère de Fur se fixe à un motif de 9 paires de bases séparé de l'autre motif par une paire de base sur chaque face de l'ADN (fig. 13a) (Bagg et Neilands, 1987 ; Stojiljkovic et *al.*, 1994). Néanmoins des expériences d'empreintes à la DNaseI ont montré que Fur protège une région plus étendue que la boîte Fur de 19 pb attendue. Ce modèle a été réinterprété par Escolar et *al.* (1998) proposant qu'un monomère de Fur se fixe sur trois motifs hexamériques dont deux en sens direct et un en sens inversé (fig. 13b). Un autre modèle a été proposé dans lequel les sites de fixation de Fur sont chevauchants (fig. 13c), permettant ainsi à deux monomères de Fur de se fixer sur une boîte Fur (Lavrrar et *al.*, 2003 ; Baichoo et Helmann, 2002). *E. chrysanthemi* possède également la protéine Fur qui est composée de 148 acides aminés et présente 89% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* (Franza et *al.*, 1999).

En présence de fer, les systèmes d'assimilation du fer sont très rapidement éteints. Fur agit comme une soupape de sécurité en abolissant rapidement le transport du fer pour éviter toute accumulation intracellulaire de fer. Lorsque la concentration intracellulaire en fer atteint un certain seuil, Fur contrôle négativement le transport du fer via les sidérophores et le système Feo, le transport de l'hème, de la lactoferrine et la transferrine. Parallèlement, Fur contrôle également négativement la protéine TonB qui apporte l'énergie nécessaire aux différents systèmes de transport du fer.

Dans les bactéries Gram<sup>-</sup>, certains systèmes de transport du fer sont spécifiquement induits par la présence d'une source de fer particulière par un mécanisme faisant intervenir des facteurs sigma  $\sigma$  de type ECF et anti- $\sigma$ . La fixation d'un signal extracellulaire libère le facteur  $\sigma$  de l'emprise du facteur anti- $\sigma$  et induit la transcription des opérons cibles et son propre opéron qui inclue également le gène du facteur anti- $\sigma$  (Helman, 2002). Les exemples les plus étudiés sont celui du système de transport du citrate ferrique chez *E. coli* et du système de transport de l'hème par les hémophores chez *S. marcescens*. La fixation de dicitrate ferrique sur le récepteur FecA situé sur la membrane externe engendre un changement de conformation de FecA qui interagit avec le facteur anti- $\sigma$  FecR au niveau de la membrane cytoplasmique délivrant le facteur  $\sigma$  FecI qui se fixe à l'ARN polymérase et induit la transcription des gènes *fecABCDE* qui codent le récepteur FecA et la perméase FecCDE de type ABC (fig. 14, Braun et *al.*, 2003 ; Braun et *al.*, 2006).

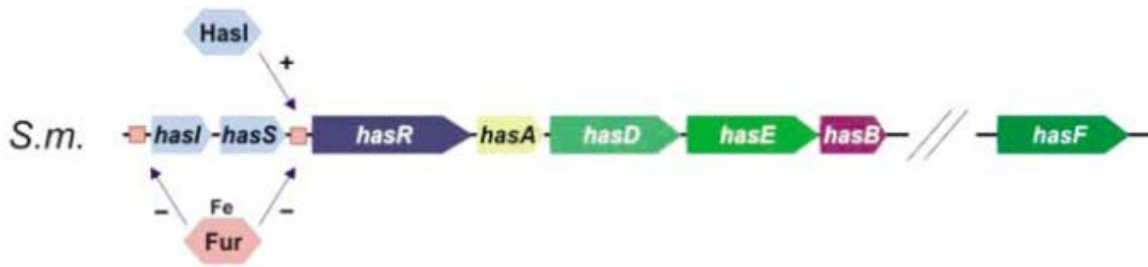


Figure 15 : Organisation génétique du cluster *has* de *S. marcescens*. Une boîte Fur est présente en amont du gène *hasI* et du gène *hasR*. Le répresseur transcriptionnel Fur régule négativement les deux opérons *has*. Un mécanisme de régulation spécifique faisant intervenir le facteur  $\sigma$  HasI et le facteur anti- $\sigma$  HasS contrôle le transport de l'hème par HasA. La fixation de l'hémophore chargé d'hème sur le récepteur HasR inactive HasS qui séquestre jusqu'ici HasI, ayant pour conséquence la libération de HasI qui peut donc initier la transcription de l'opéron *has* (Biville et *al.*, 2004).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ech	MNSHYARLVMTAAFLATATALSIFG	HKVYAWMYTGSVSLLASLVDSLVDIAASLVNLLVVRYSLQPADTEHTFGHGKAESLAALAQSMFISGSALFLLLT									
Ec	MNQSYGRLYSRAAIAATAMASL	LLLKIFAWMYTGSVSLAALVDSLVDIGASLVNLLVVRYSLQPADDNHSFGHGKAESLAALAQSMFISGSALFLLT									
Consensus	MNqHYARLVmAAIAATAmA	LLlLgIK!%AWMYTGSVSiLaALVDSLVDIAASLVNLLVVRYSLQPADd#HsFGHGKAESLAALAQSMFISGSALFLLT									
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Ech	GAQHLITPQLQGP	ELGHWITIIALVATGLLVSFQRWVIRKTHSQAVRADMLHYQSDVLMNGAILLSLALS	SKGINWADAVFALGIGVYILGSALRMAYE								
Ec	GIQHLISPTPMTDPGVGV	IYTIYALICTIILVSFQRWVVRTQSQAVRADMLHYQSDVMMNGAILLALGLSWYGMHRADALFALGIGIYILYSALRMAYE									
Consensus	GaQHLIsPqP\$qdPeIGni!	TI!AL!aTgiLVSFQRWV!RrTqSQAVRADMLHYQSDV#MNGAILLaLaLSWkGinrADAlFALGIG!YILgSALRMaYE									
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Ech	RIQALLDRALPDEERQEII	NIYSSWPGVSGAHLRTRRS	SGPTRFIQLHLEMADNLPVESHQIADELEQALLKRFPGSDVIIHQDPVSVVPQEQRGRWVL								
Ec	AVQSLLDRALPDEERQEII	IVTSWPGVSGAHLRTRRS	SGPTRFIQIHLEMEDSLPLVQAHHVADQVEQAILLRFP	PGSDVIIHQDPCSVVPR	EGKRSMLS						
Consensus	R!QaLLDRALPDEERQEII#IVs	SWPGVSGAH#LRTRrSGPTRFIQIHLEMaDnLPLV#aHq!AD#LEQAiLrRFP	PGSDVIIHQDcSVVPrEqrrrnll								

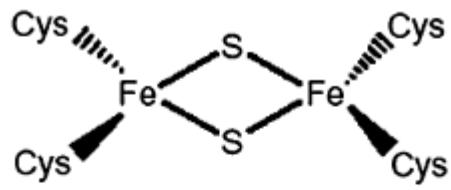
➤ 74% d'identité de séquence

Figure 16 : Alignement des séquences des protéines FieF d'*E. chrysanthemi* (Ech) et *E. coli* (Ec).

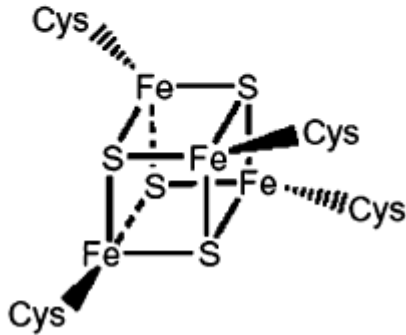
Chez *S. marcescens*, le transport de l'hème par les hémophores est contrôlé par les protéines HasI facteur  $\sigma$  et HasS anti- $\sigma$  (fig. 15). La fixation de l'hémophore chargé d'hème sur le récepteur HasR inactive HasS qui séquestre jusqu'ici HasI, ayant pour conséquence la libération de HasI qui peut donc initier la transcription de l'opéron *has* (Biville et al., 2004). Ces facteurs  $\sigma$  et anti- $\sigma$ , FecI et FecR d'une part et HasI et HasR d'autre part ne sont pas autorégulés, mais sont contrôlés négativement par le répresseur transcriptionnel Fur lorsqu'il est chargé fer (Braun et al., 2006 ; Biville et al., 2004). Ce type de régulation s'ajoute à celui exercé par Fur et permet un contrôle très fin pour la mise en route de ces systèmes d'acquisition du fer.

## 2. Export

Le fer en forte concentration peut être toxique pour la bactérie comme tous les métaux lourds. Les bactéries ont donc développé des pompes à efflux à métaux lourds pour les éliminer en les exportant dans le milieu extracellulaire. Des pompes à efflux ont été décrites pour éliminer l'excès de cobalt, nickel, cuivre, etc... mais aucune pour exporter le fer (Nies, 2003). Récemment, la première pompe à efflux du fer ferreux a été caractérisée chez *E. coli*. Il s'agit de la protéine FieF (**Ferrous Iron Efflux**) qui appartient à la famille CDF (**Cation Diffusion Faciliator**) et serait impliquée dans l'homéostasie du fer chez *E. coli* (Grass et al., 2005). Elle est localisée dans la membrane cytoplasmique. L'énergie nécessaire au transport du fer dépend d'un antiport de protons. Un mutant  $\Delta fieF$  complétement par un plasmide portant la copie sauvage du gène *fieF* accumule deux fois moins de fer  $Fe^{55}$  qu'un mutant  $\Delta fieF$ . Par ailleurs, l'induction du gène *fieF* abaisse la toxicité du fer dans un double mutant  $\Delta fur \Delta fieF$ . La transcription du gène *fieF* est induite par des concentrations croissantes de fer (supérieure à 10  $\mu M$ ), mais n'implique vraisemblablement pas le répresseur transcriptionnel Fur. En effet, la délétion du gène *fur* ne modifie pas l'expression du gène *fieF*. *E. chrysanthemi* 3937 possède un homologue au gène *fieF* très conservé avec celui de *E. coli* (fig. 16).



2Fe-2S



4Fe-4S

Figure 17 : Structure des principaux centres [Fe-S].

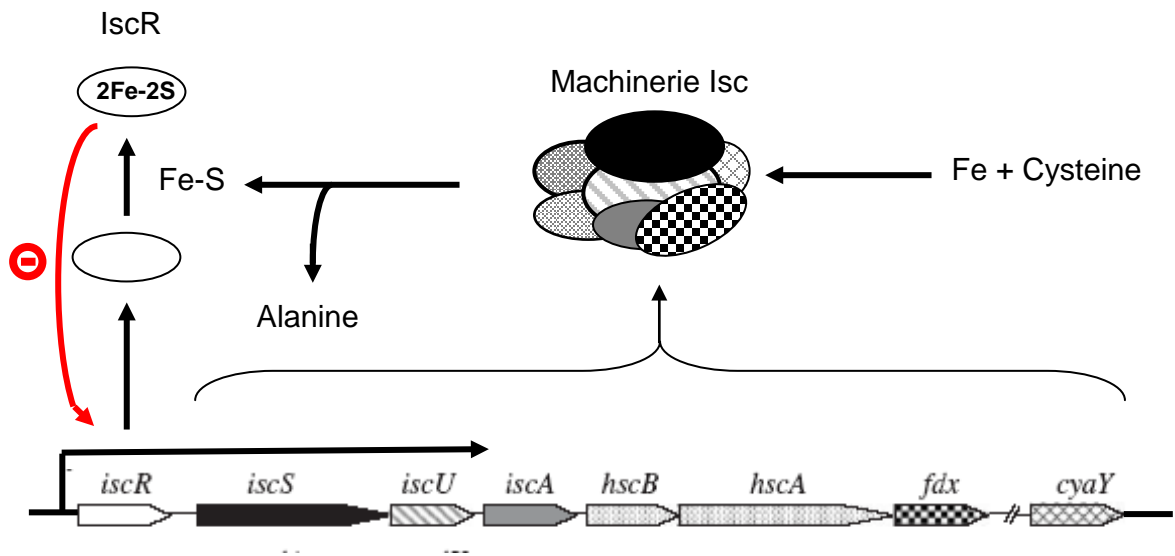


Figure 18 : Composants de la machinerie Isc impliquée dans la biogenèse des centres [Fe-S] chez *E. coli*.

## B. Consommation/distribution de fer

Pour assurer l'homéostasie du fer, les micro-organismes doivent contrôler la répartition de ce métal en régulant l'expression des protéines contenant du fer. De nombreuses protéines possèdent ce métal important pour leur activité que l'on peut séparer en trois classes principales : les protéines à groupement hème, les protéines à clusters [Fe-S] et les protéines à fer nucléaire.

Les protéines à groupement hème remplissent des fonctions comme la catalyse de réaction (catalase, peroxydase) ou transfert d'électrons (cytochromes). Quant aux protéines à fer nucléaire, elles regroupent des enzymes telles les dioxygénases et les superoxyde dismutases. Les protéines contenant des centres [Fe-S] jouent un rôle dans le transfert d'électrons ou la catalyse de réactions qui sont à la base du métabolisme bactérien. Ces protéines interviennent dans des processus aussi divers que la respiration, la photosynthèse, la fixation de l'azote, ou la régulation génique, *etc...* Les centres les plus répandus dans la nature sont les clusters [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (fig. 17) ; mais il existe d'autres types de centres plus complexes qui sont associés à d'autres groupements prosthétiques ou d'autres métaux (Ollagnier, 1998). Leur biosynthèse requiert une série de protéines fortement conservées et nommées Isc (Iron-sulfur cluster). Chez *E. coli*, le système Isc est codé par huit gènes *iscRSUA-hscB-hscA-fdx-cyaY* qui sont présentés sur la figure 18 et sont requis pour la pleine activité de nombreuses protéines à clusters [Fe-S] (Zheng *et al.*, 1998). Les gènes *hscBA-fdx* ne semblent pas être co-régulés avec les gènes *iscSUA* (Zheng *et al.*, 2001). L'opéron *iscRSUA* est induit par du peroxyde d'hydrogène ou une carence en fer sous le contrôle de IscR (Zheng, 2001 ; Outten *et al.*, 2004). La protéine IscR, homologue à SoxS (Martin et Rosner, 2001) possède un centre [2Fe-2S] capable de subir une oxydo-réduction réversible et qui semble être important à la répression des gènes *iscRSUA* par IscR (Schwartz *et al.*, 2001). Il a été proposé que IscR servirait à la fois de « senseur » et d'autorégulateur en fonction des besoins cellulaires en centre [Fe-S] (Frazzon et Dean, 2001). Ainsi, si IscR est dépourvue de son centre [Fe-S], signal d'un déficit général en clusters [Fe-S] dans la cellule, il en résulte une levée de la répression de l'opéron Isc et une reprise de la synthèse des clusters [Fe-S]. Inversement lorsque les centres [Fe-S] sont suffisamment produits, IscR est de nouveau majoritairement sous sa forme holo-IscR et réprime l'opéron *iscSUA*. IscS grâce à son activité cystéine désulfurase décompose la L-cystéine en soufre et alanine. De cette première réaction, découle la formation d'un persulfure sur la cystéine du site catalytique de IscS.

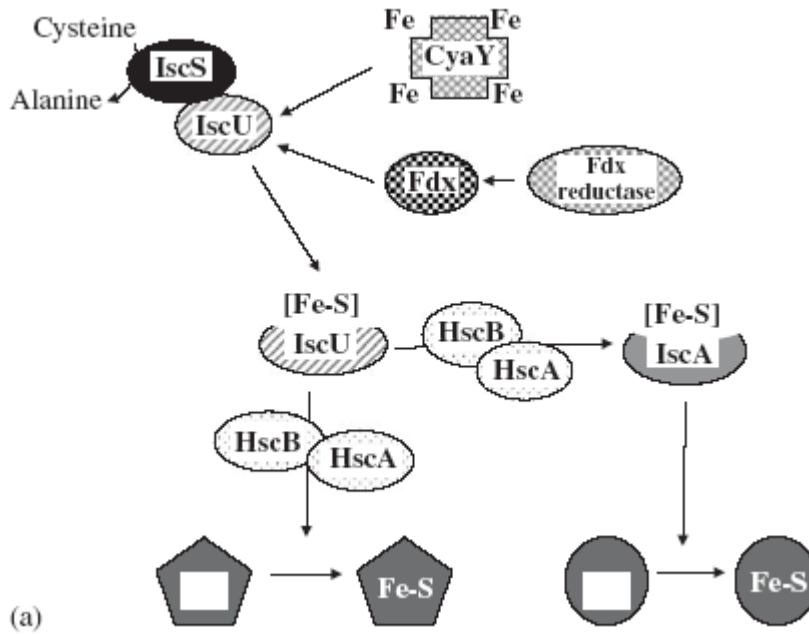


Figure 19 : Modèle d'action de la machinerie Isc impliquée dans la biosynthèse des centres [Fe-S] des métalloprotéines chez *E. coli* (review, Barras et al., 2005). A partir de cystéine, un atome de soufre est produit par la cystéine desulfurase IscS. L'atome de fer est ensuite transféré sur la protéine IscU où a lieu l'assemblage du centre [Fe-S]. Le centre [Fe-S] est transféré à la protéine IscA avec l'aide des protéines chaperones HscA et HscB. La protéine IscA cède ensuite son cluster [Fe-S] à l'apoprotéine cible.

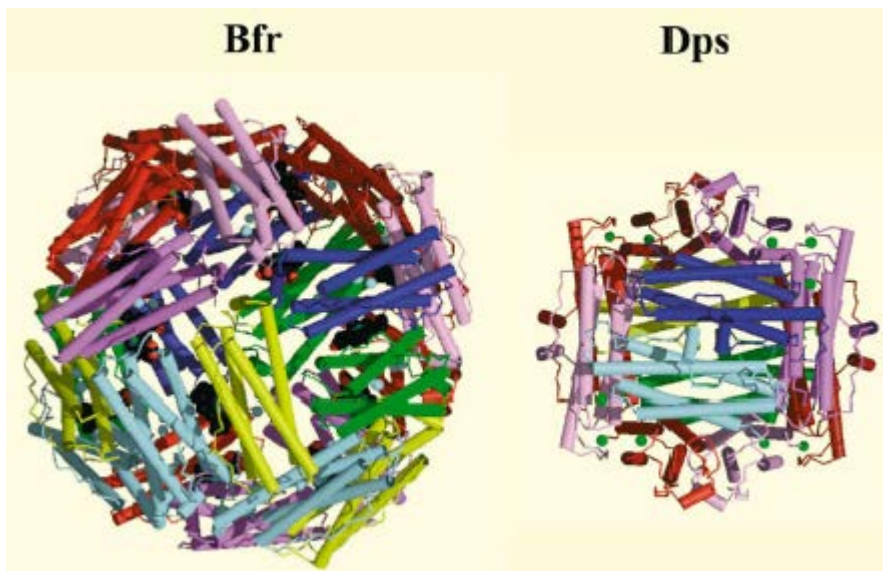


Figure 20 : Structures de la bactéroferritine Bfr et de la protéine Dps d'*E. coli* (Andrews et al., 2003). Les ferritines sont composées de 24 sous unités pour la ferritine de type eucaryote Ftn et la bactéroferritine Bfr et 12 sous unités pour les protéines Dps qui s'assemblent pour former une coque protéique sphérique. Chaque sous unité correspond à un fagot de 4 hélices  $\alpha$ .



La libération de soufre à partir de ce persulfure implique une étape de réduction, peut-être réalisée par la ferrédoxine Fdx. IscU interagit avec IscS qui lui transfère le groupe soufre (Smith et *al.*, 2001 ; Urbina et *al.*, 2001). La source de fer nécessaire pour la formation des centres [Fe-S] est inconnue, mais IscA et/ ou CyaY seraient de bons candidats de par leur aptitude à fixer du fer (Layer et *al.*, 2006 ; Ding et Clark, 2004). Des expériences ont montré que IscA d'*E. coli* présente une forte affinité pour le fer suggérant que IscA serait un donneur de fer au cours de la biosynthèse des centres [Fe-S] (Ding et *al.*, 2004). Ollagnier-de-Choudens (2004) a montré que la forme holo de IscU transfère son cluster [Fe-S] à la forme apo de IscA. Les protéines IscU et IscA sont des protéines d'« échafaudage » (scaffold) qui seraient maintenues dans une conformation adéquate pour recevoir les centres [Fe-S] grâce à l'action de deux protéines chaperonnes HscA et HscB. La forme holo-IscA pourrait transférer à son tour son centre [Fe-S] aux apo-protéines cibles. Le modèle d'action de la machinerie Isc est présenté sur la figure 19. Les gènes *iscRSUA-hscB-hscA-fdx-cyaY* sont conservés selon la même organisation dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937. On ne possède aucune donnée sur les sources de fer et les mécanismes mis en jeu pour la métallation des protéines à fer nucléaires.

### C. Stockage du fer

Les bactéries peuvent engranger des réserves en fer au sein d'une classe particulière de protéines nommées ferritines. Les ferritines constituent une large famille de protéines de stockage du fer répandue dans les 3 règnes du vivant. Chez les bactéries, il existe trois types de protéines de stockage du fer : i) les ferritines présentes également chez les eucaryotes, ii) les bactérioferritines spécifiques des eubactéries et iii) les protéines Dps présentes exclusivement chez les procaryotes. Ces différentes ferritines forment des familles distinctes du point de vue évolutif, néanmoins elles sont relativement proches quant à leur structure. Plusieurs ferritines ont été cristallisées et toutes possèdent une architecture similaire. Il s'agit de protéines multimériques composées de 24 sous-unités identiques (pour les ferritines et les bactérioferritines) ou 12 (pour les protéines Dps) qui s'assemblent pour former une coque protéique sphérique entourant une cavité centrale qui sert de réservoir de stockage du fer à l'état ferrique (fig. 20). Ces protéines sont localisées dans le cytoplasme des bactéries et permettent d'engranger des réserves de fer lorsque le fer est abondant dans l'environnement, qui seront mobilisées lorsque les conditions deviennent moins favorables. Ces protéines feront l'objet ultérieurement d'un chapitre.

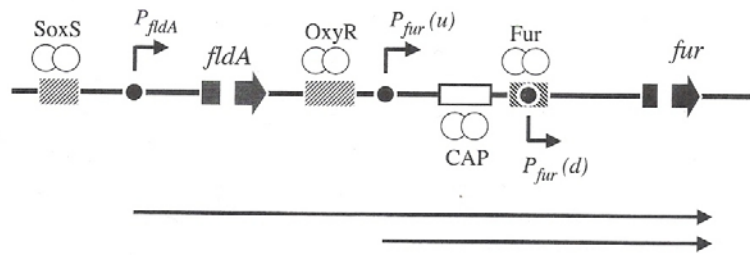


Figure 21 : Organisation génétique de l'opéron *fldA-fur* chez *E. coli*. Le gène *fur* possède un promoteur fort qui est activé par le facteur de transcription OxyR en réponse au peroxyde d'hydrogène. Il y a un autre promoteur juste en amont du gène *fur* avec une boîte Fur et une boîte CRP (Cyclic AMPc Receptor). En plus de ses propres promoteurs, le gène *fur* possède un promoteur commun avec le gène *fldA* inductible par le système SoxRS en réponse aux anions superoxyde.

### III- Effecteurs du contrôle de l'homéostasie du fer

Dans ce paragraphe, nous décrivons les différents effecteurs qui participent au contrôle de l'homéostasie du fer. Ces effecteurs interviennent spécifiquement en réponse à différents signaux, la disponibilité en fer, la présence de peroxyde d'hydrogène ou autre espèce active de l'oxygène et plus globalement dès l'entrée en phase stationnaire de croissance.

#### A. Contrôle de l'homéostasie du fer en réponse à disponibilité en fer par Fur

##### 1. Protéine Fur

L'identification de la protéine Fur a permis de comprendre comment la bactérie est capable de sentir la biodisponibilité en fer dans son environnement et d'y répondre en modulant non seulement le transport, le stockage et le métabolisme intracellulaire du fer, mais également des fonctions non reliées directement au fer. En 1981, Hantke a décrit un mutant d'*E. coli* exprimant de façon constitutive les gènes responsables de la production et du transport de sidérophores dont le gène affecté a été cloné et séquencé. Ces travaux font suite à ceux de Garibaldi et *al.* (1956) et Ernst et *al.* (1978) qui concluaient à l'existence d'un régulateur des systèmes d'acquisition du fer nommé Fur pour **f**erric **u**ptake **r**egulation.

##### 2. Régulation du gène *fur*

Chez *E. coli*, le gène *fur* est localisé en aval du gène *fldA* codant la flavodoxine, une protéine contenant une flavine impliquée dans des réactions redox, avec lequel il peut être co-transcrit (fig. 21). Des homologues du gène *fur* ont été identifiés chez de nombreuses bactéries Gram-négatives dont plusieurs pathogènes humains comme *Y. pestis*, *P. aeruginosa* ou *L. pneumophila* et des bactéries phytopathogènes telles que *E. chrysanthemi* et *X. campestris* où l'organisation génique est conservée. Le gène *fur* possède un promoteur fort qui est activé par le facteur de transcription OxyR en réponse au peroxyde d'hydrogène (Zheng et *al.*, 1999). Il y a un autre promoteur juste en amont de ce premier promoteur avec une boîte Fur et une boîte CRP, suggérant que le gène *fur* s'autorégule et est faiblement contrôlé par la protéine CRP (Cyclic AMPc Receptor) (De Lorenzo et *al.*, 1988). En plus de ses propres promoteurs, le gène *fur* peut être transcrit à partir du promoteur du gène *fldA* inductible par le système SoxRS en réponse à un stress généré par des anions superoxyde

(Zheng et al., 1999). La protéine Fur est très abondante chez *E. coli* avec 5000 copies par cellule en phase exponentielle de croissance, atteignant plus de 10 000 copies par cellule après un stress oxydant (Zheng et al., 1999). Or, habituellement les régulateurs se trouvent généralement à de faibles concentrations dans les bactéries. Cette observation peut s'expliquer par la capacité de Fur à polymériser sur l'ADN et par le grand nombre de gènes contrôlés par ce régulateur, plus de 100 gènes chez *E. coli* (Mc Hugh et al., 2003). Le gène *fur* d'*E. chrysanthemi* a été cloné par complémentation fonctionnelle d'un mutant *fur* d'*E. coli* (Franza et al., 1999). La régulation décrite chez *E. coli* n'est pas complètement conservée chez *E. chrysanthemi* 3937; en effet aucune boîte Fur n'a été retrouvée en amont du gène *fur*.

### 3. Régulon de la protéine Fur

#### a. Régulation négative par Fur

La protéine Fur a été initialement identifiée pour son rôle dans la répression des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse et le transport du fer lorsqu'il est abondant. En outre, Fur contrôle des gènes codant des protéines ne participant pas dans le métabolisme du fer et à l'homéostasie du fer notamment la respiration, la synthèse de l'ADN, la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques, le métabolisme purinique, la résistance au stress oxydant et la biosynthèse de méthionine (Andrews et al., 2003). Des mutants *fur* d'*E. coli* et de *V. cholerae* sont incapables de se développer en présence de sources de carbone non fermentable, suggérant un rôle de Fur dans la respiration (Hantke, 1987). L'inactivation du gène *fur* chez de nombreuses bactéries provoque l'incapacité d'utiliser le succinate pour se développer. Un mutant *fur* d'*E. coli* est plus sensible au stress oxydant induit par le fer (Touati et al., 1995). Fur réprime aussi plusieurs facteurs de virulence, incluant la verocytotoxine et la toxine Shiga produite par des souches pathogènes d'*E. coli* et *S. dysenteriae* (Calderwood et Mekalanos, 1987). Chez *P. aeruginosa*, la synthèse de l'exotoxine A est aussi sous le contrôle négatif du fer et de Fur (Prince et al., 1993). Chez *S. flexneri* et *S. typhimurium*, l'inactivation du gène *fur* augmente la sensibilité à l'acidité du milieu : Fur jouerait un rôle important dans la réponse au stress acide (Oglesby et al., 2005 ; Foster et al., 1992). Par ailleurs, chez *E. chrysanthemi*, Fur régule négativement les gènes codant les pectate lyases PelD et PelE. En effet, les gènes *pelD* et *pelE* présentent des niveaux de transcription plus importants dans un mutant *fur* que dans la souche sauvage et présentent des boîtes Fur dans leur promoteur (Franza et al., 1999). L'action de la protéine Fur est fondée sur un mécanisme d'anti-activation bloquant l'action de CRP.

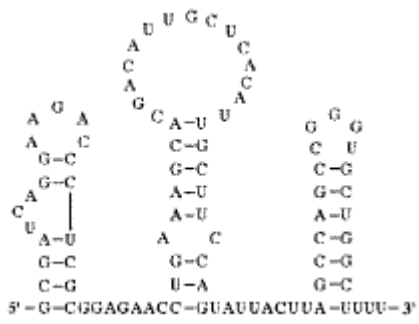


Figure 22 : Structure du petit ARN non-codant RyhB d'*E. coli* (Massé and Gottesman, 2002).

## b. Régulation positive par Fur

### - Découverte et cibles du petit ARN RyhB

Certains gènes ne sont pas réprimés, mais induits au contraire par le fer de manière dépendante de Fur et ne possèdent pas de boîte Fur dans leur région promotrice, notamment les gènes codant certaines protéines à centres [Fe-S] et les ferritines. L'exemple le plus étudié est celui du gène *sodB* codant la superoxyde dismutase à fer chez *E. coli* qui est induit par le fer et Fur. La demi-vie du transcrite *sodB* est considérablement réduite dans un mutant *fur* d'*E. coli*, suggérant que la régulation par Fur a lieu à un niveau post-transcriptionnel et aboutirait à la stabilisation du messager *sodB* (Dubrac and Touati, 2000). L'induction du gène *sodB* par Fur requiert une séquence palindromique située au site +1 de transcription suivie d'une séquence riche en A-T en aval, faisant penser à un élément de régulation de type IRE (Iron Responsive Element) retrouvé chez les organismes eucaryotes. Récemment, un petit ARN non-codant nommé RyhB a été identifié chez *E. coli* par Massé et Gottesman (2002) et a permis de comprendre le mécanisme par lequel Fur régule positivement certains gènes. D'après une analyse bioinformatique réalisée par Massé et Gottesman (2002), cet ARN de 90 nucléotides présenterait une structure secondaire avec 3 tige-boucle (fig. 22). Le gène *ryhB* présente une boîte Fur dans sa région promotrice, laissant supposer une régulation du gène *ryhB* par Fur. D'ailleurs, des expériences de Northern-blot chez *E. coli* et *V. cholerae* ont montré qu'une carence en fer induit l'expression du gène *ryhB* et que dans un mutant *fur* l'expression du gène *ryhB* est constitutive indépendamment de la disponibilité en fer (Massé and Gottesman, 2002 ; Mey et al., 2005). Par ailleurs, l'expression de RyhB coïncide avec une diminution de la quantité de transcrits *sdhCDAB* comme le laissait prévoir la région d'appariement ARN-ARN observée entre RyhB et le transcrite *sdhCDAB* codant la succinate déshydrogénase. Cet appariement va bloquer la traduction de cet opéron (Massé and Gottesman, 2002). C'est pourquoi un mutant *fur*, dans lequel le gène *ryhB* est déréprimé, est incapable d'utiliser le succinate comme source de carbone. D'autres gènes sont déréprimés dans un mutant *ryhB* d'*E. coli* : les gènes *sodB*, *acnA*, *bfr*, et *ftnA* codant respectivement la superoxyde dismutase, l'aconitase A, la bactérioferritine et la ferritine. Le schéma de régulation est le suivant : en carence en fer, RyhB régule négativement l'expression des gènes codant des protéines séquestrant du fer. Le gène *ryhB* est lui-même réprimé par Fur lorsque le fer est abondant et cela conduit à une régulation positive par Fur des gènes cibles. Une expérience de microarray réalisée chez *E. coli* en exprimant RyhB à partir d'un promoteur inductible par l'arabinose montre que RyhB régule directement au moins 18 transcrits, tous

impliqués dans le métabolisme du fer. L'expression de RyhB provoque l'arrêt de la synthèse de plusieurs protéines qui à priori séquestrent le fer, générant une augmentation de la concentration intracellulaire en fer et l'activation de Fur réduisant ainsi l'expression des gènes du régulon Fur (Massé et *al.*, 2005). La fonction de RyhB serait d'augmenter rapidement et de manière efficace le pool de fer disponible dans la bactérie, en libérant ce métal à partir des protéines non essentielles contenant du fer, pour assurer la disponibilité en fer aux protéines essentielles lors d'une carence en fer. Des travaux plus récents montrent que RyhB influence la concentration intracellulaire en fer en régulant négativement la synthèse des protéines non essentielles à fer et dirige le fer nouvellement importé à partir du milieu extracellulaire vers les enzymes à fer indispensables (Jacques et *al.*, 2006).

#### - Mécanisme d'action de RyhB

Le mécanisme d'action de RyhB serait son appariement à l'extrémité 5' d'un ARN messager cible au niveau ou à proximité du site de fixation du ribosome (RBS) et induit sa dégradation en recrutant le dégradosome (Massé et *al.*, 2003). RyhB requiert *in vivo* la protéine Hfq pour son activité (Massé and Gottesman, 2002). La protéine Hfq a été décrite au début des années 1970 comme un facteur hôte nécessaire à la réplication du phage Q $\beta$  (Franze de Fernandez et *al.*, 1968). Elle a été plus récemment identifiée comme un régulateur pléiotropique de l'expression de nombreux gènes en influençant l'interaction d'ARNs antisens non-codant avec leur messager cible (Muffler et *al.*, 1997 ; Tsui et *al.*, 1997). Hfq se fixe préférentiellement à une région d'ARN simple brin riche en AU au voisinage d'une tige-boucle (Moller et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2002). Elle fonctionnerait comme une protéine chaperonne qui faciliterait l'interaction entre l'ARN RyhB et l'ARNm cible en contrôlant l'accès de RyhB aux régions complémentaires du transcrit. Geissman et Touati (2004) ont montré que la fixation de Hfq ne change pas la structure de RyhB, par contre elle change la structure du transcrit cible *sodB*, ce qui favoriserait son appariement à RyhB. Une autre hypothèse quant à la fonction de la protéine Hfq serait de protéger l'ARN RyhB de la dégradation par la RNase E en masquant les sites reconnus par la RNaseE (Massé et *al.*, 2003 ; Moll et *al.*, 2003). Effectivement, RyhB est rapidement dégradé par la RNaseE dans un mutant *hfq* (Massé et *al.*, 2003). Il a été montré que la dégradation de RyhB par la RNaseE est inhibée *in vitro* par la protéine Hfq (Moll et *al.*, 2003). RyhB, stabilisé par Hfq, va s'apparier au messager cible et être dégradé simultanément au messager cible par la RNaseE (Massé et *al.*, 2003). Chez *E. coli*, en carence en fer RyhB contrôle négativement de nombreuses protéines à fer dispensables incluant la superoxyde dismutase SodB, la succinate

déhydrogénase SdhCDAB, la fumarase FumA, la NADH déhydrogénase NuoABCEFGHIJKLMN, la bactérioferritine Bfr et la machinerie Isc (Massé et *al.*, 2005). Par ailleurs RyhB n'affecte pas l'expression de certains gènes essentiels comme l'opéron *suf* qui est indispensable à la formation des clusters [Fe-S] en carence en fer alors que l'opéron *isc* est fortement réprimé par RyhB (Massé et *al.*, 2005). De plus, l'analyse d'un mutant *ryhB* d'*E. coli* a montré que RyhB est essentiel à la croissance bactérienne en carence en fer et que le défaut de croissance d'un mutant *fur* est supprimé par une mutation *ryhB*, attribuant ainsi le défaut de croissance à une expression constitutive du gène *ryhB* dans un mutant *fur* (Jacques et *al.*, 2006).

#### Autres ARNs de régulation

Des ARNs homologues à RyhB d'*E. coli* sont présents dans les espèces bactériennes, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* et *Erwinia chrysanthemi* suggérant que ce mécanisme de régulation est relativement conservé. Pourtant, certains organismes en sont dépourvus comme par exemple *P. aeruginosa* qui toutefois possède deux ARN fonctionnellement analogues à RyhB, PrrF1 et PrrF2 (Wilderman et *al.*, 2004) qui contrôlent certains gènes cibles communs à ceux contrôlés par RyhB chez *E. coli* : la superoxyde dismutase SodB, la succinate deshydrogénase SdhCDAB et la bactérioferritine potentielle BfrB sont contrôlés par ces ARNs. PrrF1 et PrrF2 partagent 95% d'identité de séquence et sont transcrits individuellement sous le contrôle de Fur. Bien que *P. aeruginosa* possède la protéine Hfq, on ne sait pas si PrrF1 et PrrF2 dépendent de cette protéine pour leur activité et leur stabilité. Les espèces *P. putida*, *P. fluorescens* et *P. syringae* possèdent également les ARNs PrrF1 et PrrF2 (Wilderman et *al.*, 2004) confortant l'idée que la répression par ces ARNs des gènes impliqués dans la consommation du fer seraient un mécanisme commun aux différentes bactéries.

#### - Régulation positive directe par Fur

Bien que la protéine Fur ait toujours été présentée comme un répresseur, elle peut induire directement la transcription de certains gènes. Chez *N. meningitidis*, Fur peut activer les gènes *panI*, *norB* et *nuoA* (dont les produits sont impliqués dans la respiration) par un mécanisme impliquant la fixation directe de Fur au promoteur de ces gènes en présence de fer (Delany et *al.*, 2004). La protéine Fur est classiquement décrite comme un répresseur nécessitant du fer comme co-répresseur pour se fixer aux boîtes Fur du promoteur de nombreux gènes cibles. Cependant certains travaux ont montré que Fur est capable de se fixer



sous forme apo. Chez *H. pylori*, la fixation de Fur sous forme apo au niveau du promoteur  $P_{pfr}$  réprime la transcription d'un gène codant la ferritine Pfr. Par contre, la fixation de fer ferreux à Fur provoque une diminution de l'affinité de Fur pour ce promoteur  $P_{pfr}$  et une levée de répression du gène *pfr* (Delany et al., 2001).

## B. Contrôle de l'homéostasie du fer en coordination avec la réponse au stress oxydant

De nombreux travaux soutiennent l'hypothèse qu'il existe une coordination entre la réponse au stress oxydant et l'homéostasie du fer. Comme explicité précédemment, l'ion ferreux  $Fe^{2+}$ , en présence d'oxygène, peut exacerber le stress oxydant en générant, via la réaction de Fenton, des radicaux hydroxyles ( $OH^\circ$ ) hautement toxiques. Nachin et al. (2003) ont d'ailleurs mis en évidence l'implication de la machinerie Suf, qui participe à la réparation des centres [Fe-S] en conditions de stress oxydant, dans l'utilisation de ferri-chrysobactine chez *E. chrysanthemi*. Par ailleurs, certains régulateurs de la réponse au stress oxydant (PerR, OxyR, SoxR/S) interviennent dans l'homéostasie du fer.

### 1. PerR

PerR, membre de la famille de Fur, est un répresseur transcriptionnel répondant au peroxyde d'hydrogène. Des homologues à PerR ont été décrits chez de nombreux organismes comme *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. jejuni* et *E. coli* (van Vliet et al., 1999 ; King et al., 2000 ; Horsburgh et al., 2001). PerR contient deux sites de fixation de métaux par monomère : un site de fixation du zinc et un site divalent qui fixe soit un cation  $Fe^{2+}$  soit un cation  $Mn^{2+}$ , avec une préférence pour le  $Fe^{2+}$  (Herbig et Helmann, 2001). Le groupe de Helmann a montré que le répresseur PerR existe sous deux formes selon que le site de régulation de PerR soit occupé par  $Fe^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , l'une sensible au peroxyde d'hydrogène (PerR-Fe) et l'autre non (PerR-Mn). Des interrogations subsistent en ce qui concerne les mécanismes par lesquels PerR perçoit le peroxyde d'hydrogène et répond différemment selon qu'il soit sous forme PerR-Fe ou PerR-Mn. Dans un premier modèle, le fer ferreux, co-répresseur de PerR, serait oxydé en fer ferrique, entraînant sa dissociation. Dans un second modèle, le fer ferreux est supposé générer des radicaux hydroxyles selon la réaction de Fenton ; ces derniers vont alors oxyder et inactiver PerR. Dans un troisième modèle par analogie aux autres senseurs de peroxyde d'hydrogène, il a été suggéré que les cystéines impliquées dans le site de fixation du métal vont réagir avec le peroxyde d'hydrogène et générer un pont disulfure, ce qui va aboutir à la

dissociation du métal du site de fixation. Plus récemment, Lee et *al.* (2006) ont montré que la protéine PerR de *B. subtilis* est oxydée suite à la fixation d'un ion ferreux mais pas au niveau de cystéines comme pour OxyR. En revanche les résidus histidine H37 et H91, qui sont des ligands du fer ferreux dans PerR, sont oxydés en 2-oxo-histidine inactivant ainsi PerR.

Ce régulateur a été largement étudié chez *B. subtilis* où il contrôle la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant (entre autres la catalase KatA et l'alkyl hydroperoxyde réductase AhpCF) et dans le stockage du fer (la protéine MrgA homologue à Dps), mais également son propre gène *perR* et le gène *fur* (Fuanthong et *al.*, 2002). Dans un mutant *perR*, le niveau de transcription de ces gènes est nettement plus important que dans la souche sauvage, exception faite pour les gènes *perR* et *fur*. Les gènes *mrgA* et *katA* sont réprimés par PerR-Fe et fortement induits en présence de peroxyde d'hydrogène, alors que la répression des gènes *perR* et *fur* est due à PerR-Mn et aucun des deux gènes n'est fortement induit par le peroxyde d'hydrogène. Ces données montrent une coordination au point de vue génétique entre les systèmes de réponse au stress oxydant et à la disponibilité en fer. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, la bactérie doit veiller à abaisser sa concentration intracellulaire en fer en induisant des protéines de stockage du fer. Chacun des gènes du régulon PerR possède une ou plusieurs séquences hautement conservées, reconnues par PerR et appelées boîtes PerR. La boîte PerR est localisée immédiatement en aval ou en amont des sites -10 et -35 respectivement des promoteurs des gènes cibles et diffère au niveau d'une position par rapport au motif défini pour Fur (Fuanthong et *al.*, 2003). Il n'existe pas de véritable PerR chez *E. chrysanthemi* 3937.

## 2. OxyR et SoxRS

En présence d'anions superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, il est donc nécessaire de limiter la concentration intracellulaire en fer en réprimant notamment les systèmes d'import du fer ou en induisant les ferritines et autres protéines fixant le fer pour éviter la production de radicaux hydroxyles. C'est pourquoi chez *E. coli* la protéine Fur, qui contrôle le métabolisme du fer, est régulée par OxyR et SoxRS, régulateurs de la réponse au stress oxydant. D'ailleurs, un mutant *fur* d'*E. coli* est plus sensible que la souche sauvage au stress oxydant; cet effet est annulé si le transport de fer par les sidérophores est bloqué suite à une mutation *tonB* ou si la capacité de stockage du fer est augmentée suite à une surexpression du gène *fnA* (Touati et *al.*, 1995).

OxyR induit le gène *fur* en réponse à de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène, alors que SoxRS induit la transcription du gène *fur* en réponse à des composés générant des anions superoxyde. L'induction du gène *fur* par OxyR et SoxRS entraîne une hausse des quantités de protéine Fur, qui réduit l'acquisition du fer, entraînant un abaissement de la production de radicaux hydroxyles (Zheng et al., 1999). OxyR d'*E. coli* est le premier facteur de transcription inductible par le peroxyde d'hydrogène à avoir été caractérisé (Storz and Zheng, 2000 ; Zheng and Storz, 2000). OxyR est un activateur transcriptionnel qui appartient à la famille LysR des régulateurs. Une étude menée par Zheng et al. (2001) a montré que le régulon de OxyR comporte notamment des gènes impliqués dans le métabolisme et la protection vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (*katG*, *ahpC*, *ahpF*, *dps*) et des régulateurs importants comme Fur et OxyS (Zheng et al., 2001a,b). OxyR est produite constitutivement et est oxydée par le peroxyde d'hydrogène. La forme oxydée de OxyR se fixe aux régions promotrices des gènes cibles et active leur transcription par une interaction directe avec l'ARN polymérase. Lors de premières études de mutants, l'équipe de Storz a montré que seule la Cystéine 199 est responsable de l'activation par le peroxyde d'hydrogène par la formation d'un acide sulfénique (SOH). Par ailleurs, l'équipe de Stamler a constaté qu'une S-nitrosylation peut également activer OxyR lorsqu'elle est traitée par des S-nitrosothiols. La forte réactivité de la cystéine 199 avec des peroxydes est probablement causée par l'ionisation de ce résidu en anion thiolate, qui est stabilisé par un résidu arginine à proximité. Une fois oxydée, la cystéine 199 réagit avec une autre cystéine (Cys208) pour former un pont disulfure intramoléculaire. L'oxydation aboutit au repliement du domaine de régulation, et ces modifications structurales affectent l'aptitude de OxyR à interagir avec l'ADN, et aussi avec l'ARN polymérase. OxyR est rapidement désactivée par un mécanisme de réduction du pont disulfure qui est catalysée par la glutarédoxine-1 GrxA qui est elle-même régulée positivement par OxyR (Zheng et al., 1998). La transcription du gène *oxyR* augmente durant la phase exponentielle de croissance sous le contrôle de la protéine CRP. Par contre, elle décline dès l'entrée en phase stationnaire de croissance de manière OxyR dépendante selon un mécanisme non élucidé. En effet, en absence de RpoS, OxyR s'accumule en phase stationnaire de croissance (Gonzalez-Flecha and Demple, 1997). Le petit ARN OxyS est impliqué dans la régulation en particulier des gènes *fhlA* et *rpoS* (Altuvia et al., 1997). Il inhibe la traduction du transcrit cible en empêchant la fixation du ribosome sur le messenger de manière Hfq dépendante (Argaman et al., 2000 ; Altuvia et al., 1998 ; Zhang et al., 1998). OxyS et le transcrit cible sont ensuite dégradés. Le petit ARN OxyS est lui-même contrôlé positivement par OxyR. Un homologue à OxyR est présent chez *E. chrysanthemi* 3937, mais

en revanche, aucun homologue au gène *oxyS* n'a été identifié dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937.

La protéine SoxR est un homodimère qui comporte un cluster [2Fe-2S] par sous-unité (Hidalgo et al., 1997 ; Wu et al., 1995). Ce dernier est oxydé en [2Fe-2S]<sup>2+</sup> en présence d'un composé qui génère des anions superoxyde et la protéine SoxR ainsi activée va induire la production de SoxS, un facteur de transcription qui induit à son tour la transcription des gènes du régulon Sox dont les produits permettent de détoxiquer les anions superoxydes ou réparer les dommages causés par ce stress tels la superoxide dismutase SodA, les flavodoxines FldA et FldB, l'endonucléase IV Nfo, le répresseur transcriptionnel Fur, la glucose-6-phosphate déhydrogénase Zwf, la NADPH-ferredoxine Fpr, la pompe à efflux AcrAB et le petit ARN MicF (Hidalgo et al., 1997, Storz and Imlay, 1999 ; Gaudu et al., 2000). La forme réduite de SoxR est capable de se fixer au promoteur du gène *soxS*, mais est incapable d'induire la transcription des gènes du régulon Sox. Les clusters [Fe-S] de SoxR sont rapidement réduits, levant ainsi l'expression du régulon SoxRS (Ding et al., 1997). SoxR peut être activé par le NO grâce à un mécanisme de nitrosylation des clusters [Fe-S] (Ding et al., 2000). La forme nitrosylée a cependant une demi-vie plus brève *in vivo*. L'analyse du génome d'*E. chrysanthemi* montre l'absence des gènes *soxR* et *soxS*.

D'autres signaux sont à l'origine du contrôle du métabolisme du fer, notamment la carence nutritionnelle (carbone, azote ou phosphate). Les bactéries exposées à une carence nutritionnelle réadaptent leur métabolisme pour limiter leurs dépenses énergétiques.

### C. Contrôle de l'homéostasie du fer en fonction de la phase de croissance par RpoS

L'acteur principal de ce type de contrôle est le facteur  $\sigma^S$  qui est une sous-unité de l'ARN polymérase responsable de la reconnaissance du promoteur du gène cible par l'ARN polymérase et nécessaire à l'initiation de la transcription. Il contrôle l'expression de plus de 100 gènes impliqués dans la survie cellulaire en réponse à l'entrée en phase stationnaire et intervient dans l'adaptation à la résistance à une carence nutritionnelle (carbone, azote ou phosphate), un stress thermique, osmotique ou oxydant (Loewen et al., 1998 ; Ishihama, 2000 ; Vijayakumar et al., 2004). Le facteur  $\sigma^S$  (ou RpoS) a été décrit pour la première fois chez *E. coli*. Depuis, il a été retrouvé chez de nombreuses protéobactéries de la subdivision  $\gamma$ .

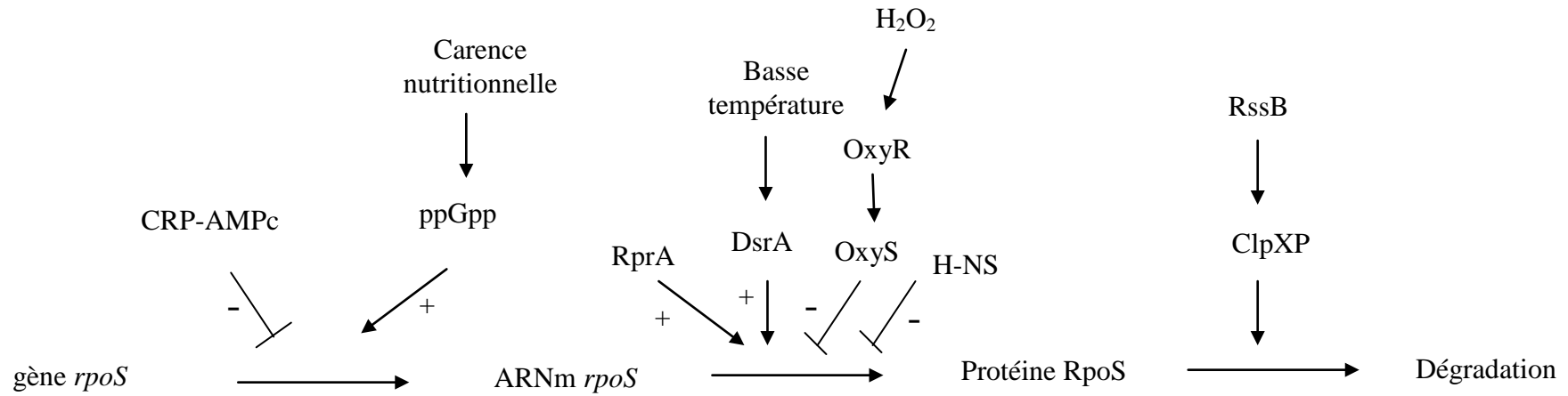


Figure 23 : Schéma récapitulant les mécanismes régulant la protéine RpoS ( $\sigma^S$ ).

Une mutation dans le gène *rpoS* a un effet pléiotropique car RpoS régule positivement de nombreuses protéines, des enzymes de réparation de l'ADN comme l'exonucléase XthA et la méthyle-transférase Ada, ainsi que des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant comme la superoxyde dismutase SodC et les catalases KatE et KatG. L'expression des gènes *bfr* et *dps* impliqués dans le stockage du fer est également induite par RpoS en phase stationnaire (Lacour et al., 2004 ; Jeong et al., 2006).

La régulation de RpoS est complexe et multifactorielle. Elle a lieu à plusieurs niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel et est résumée sur la figure 23. La transcription du gène *rpoS* est induite par le ppGpp (guanosine 3',5'-bispyrophosphate) chez *E. coli* et *Pseudomonas* en réponse à une carence nutritionnelle (acides aminés, carbone, azote ou phosphate) (Gentry et al., 1993, Lange et al., 1995 ; Van Delden et al., 2001 ; Hirsch and Elliott, 2002). Par ailleurs, la protéine CRP en présence d'AMPc régule négativement la transcription du gène *rpoS* comme en témoigne la présence de deux sites de fixation de CRP-AMPc (ou boîte CRP) en amont et en aval du promoteur du gène *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002).

RpoS est principalement régulé au niveau traductionnel et post-traductionnel. Chez *E. coli*, la régulation traductionnelle de *rpoS* fait intervenir trois petits ARNs non codant, DsrA, RprA et OxyS. Cette induction de la traduction nécessite la protéine Hfq (Brown and Elliott, 1997). La traduction du transcrit *rpoS* est promue par les ARNs non-codant RprA et DsrA qui s'apparient à la région leader du messenger *rpoS* en amont de l'épingle à cheveux et libèrent la séquence Shine Dalgarno pour la traduction. RprA est induit par un stress hyperosmotique alors que DsrA est fortement synthétisé à basse température (inférieure à 30°C) et sa stabilité varie selon la température. Par contre, OxyS réprime la traduction du transcrit *rpoS* sans doute en modulant l'activité de la protéine Hfq. OxyS, comme tout membre du régulon OxyR, est induit par le peroxyde d'hydrogène.

Une baisse drastique des quantités de  $\sigma^S$  en phase exponentielle de croissance est due à la protéine H-NS, une protéine histone-like intervenant dans l'organisation du nucléoïde. En effet, des mutants *hns* d'*E. coli* présentent de fortes quantités de  $\sigma^S$  en phase exponentielle équivalentes à celles atteintes par la souche sauvage en phase stationnaire ou sous des conditions de stress (Yamashino et al., 1995 ; Barth et al., 1995). Le mécanisme mis en jeu par H-NS pour réguler négativement la traduction du gène *rpoS* n'est pas encore caractérisé à ce jour. H-NS pourrait affecter la structure secondaire du transcrit *rpoS* en s'y fixant ou s'opposer à l'effet de régulateurs positifs de la traduction du gène *rpoS* tels que Hfq.

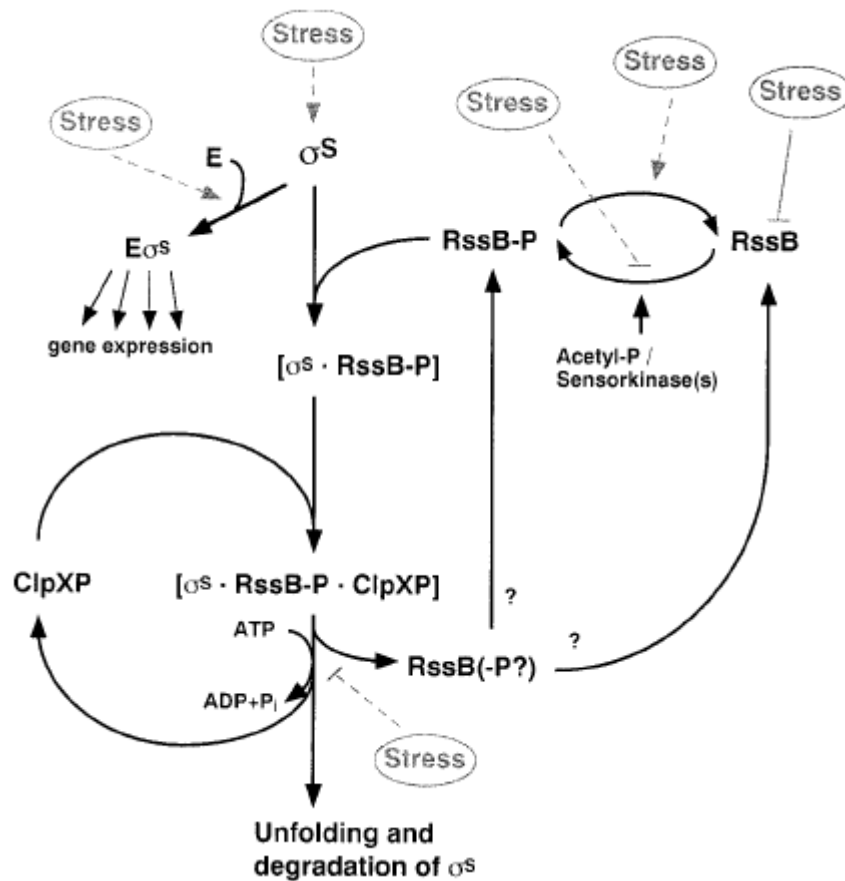


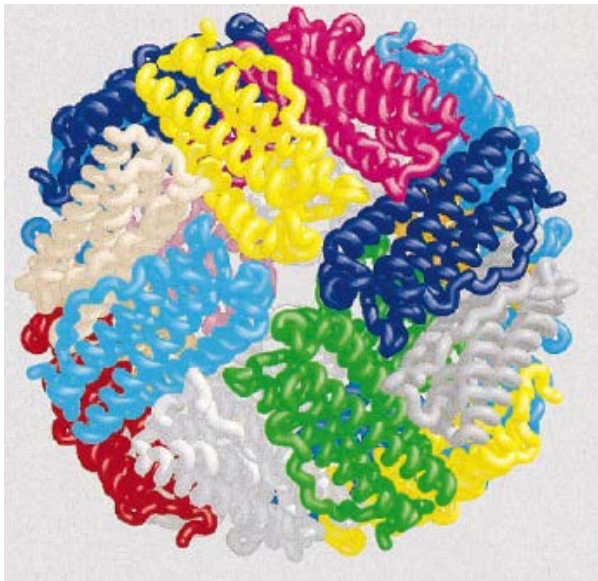
Figure 24 : Schéma récapitulant le mécanisme moléculaire de la protéolyse de  $\sigma^S$  chez *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002). En réponse à un signal environnemental inconnu, RssB est phosphorylée. Ainsi activée, elle se fixe au facteur  $\sigma^S$  qu'elle présente à la protéase ClpXP.  $\sigma^S$  est alors déplié et complètement dégradé par la protéase ClpXP. Alors que RssB ne l'est pas et peut intervenir dans un nouveau cycle.

La concentration cellulaire de RpoS reste basse en phase exponentielle de croissance en raison de la dégradation rapide de RpoS par la protéase ClpXP. Des mutations affectant ClpP ou ClpX contribuent à stabiliser  $\sigma^S$  (Schweder et *al.*, 1996). Contrairement à d'autres substrats de la protéase ClpXP,  $\sigma^S$  requiert un facteur spécifique de reconnaissance, la protéine RssB qui appartient à la famille des régulateurs à 2 composantes dont l'activité est modulée par phosphorylation. Une mutation dans le gène *rssB* provoque la stabilisation de  $\sigma^S$  et une augmentation des quantités de  $\sigma^S$  en phase exponentielle (Hengge-Aronis, 2002). Le mécanisme moléculaire implique que la protéine RssB est phosphorylée au niveau d'un résidu aspartate en position 58 dans le domaine N-terminal en réponse à un signal environnemental inconnu à ce jour. Aucune phosphatase ou kinase responsable de la phosphorylation de RssB n'a pu être identifiée. La protéine RssB est alors activée et se fixe au facteur  $\sigma^S$  qu'elle présente à la protéase ClpXP. Il en résulte que  $\sigma^S$  est déplié et complètement dégradé par la protéase ClpXP alors que RssB ne l'est pas et est libéré prêt à intervenir dans un nouveau cycle. La dégradation de  $\sigma^S$  par la protéase ClpXP est un mécanisme dépendant de l'ATP (fig. 24).

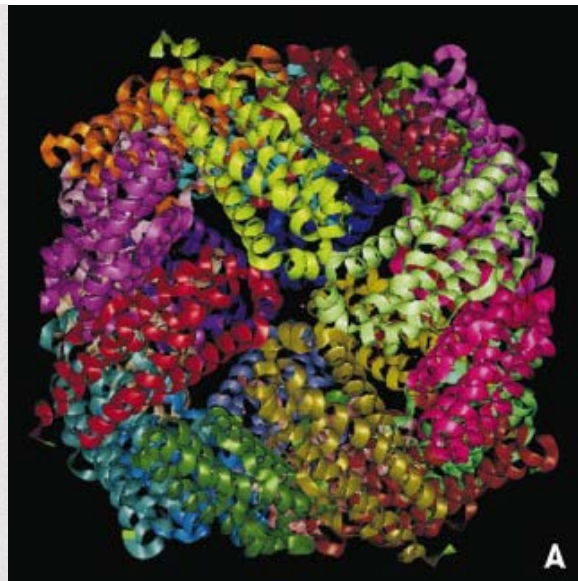


## Chapitre III

Les ferritines, protéines de stockage du fer



[A]



[B]

Figure 25 : Structure de la ferritine d'*E. coli* (Chasteesn et al., 1999) [A] et de la bactérioferritine de *D. desulfuricans* (Carrondo et al., 2003) [B].

## I- La structure des différentes ferritines

### A. Ferritine et bactérioferritine

Plusieurs structures de ferritines bactériennes et de bactérioferritines ont été caractérisées ; notamment les ferritines d'*E. coli* (Hemstead et al., 1994 ; Stillman et al., 2001) et *L. innocua* (Ilari et al., 2000) et les bactérioferritines d'*E. coli* (Frolow et al., 1994 ; Dautant et al., 1998, Frolow and Kalib, 2001), *R. capsulatus* (Cobessi et al., 2002), et *D. desulfuricans* (Macedo et al., 2003). Toutes ces ferritines ont une architecture moléculaire très conservée avec 24 sous-unités d'environ 20 kDa identiques ou très semblables qui s'assemblent avec une symétrie axiale 4/3/2 pour former une coque protéique avoisinant 450 kDa de masse moléculaire, sphérique, extrêmement stable et creuse (fig. 25). La cavité centrale peut abriter jusqu'à 4500 ions ferriques sous forme de ferrihydrite à l'intérieur d'un cœur inorganique complexe. Chaque sous-unité individuelle correspond à une structure en fagot de 4 hélices  $\alpha$  A, B, C et D coiffée par une courte hélice E à l'extrémité C-terminale (fig. 26).

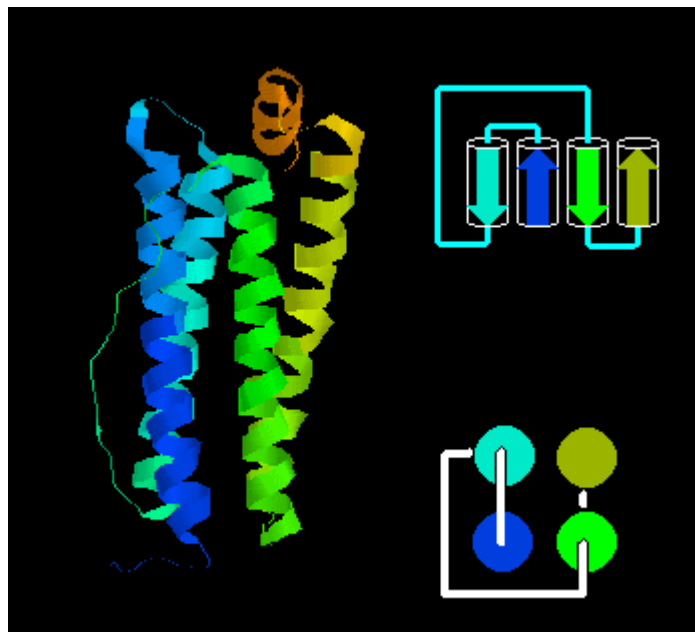


Figure 26 : Structure d'un fagot de 4 hélices  $\alpha$  correspondant à une sous-unité de ferritine.

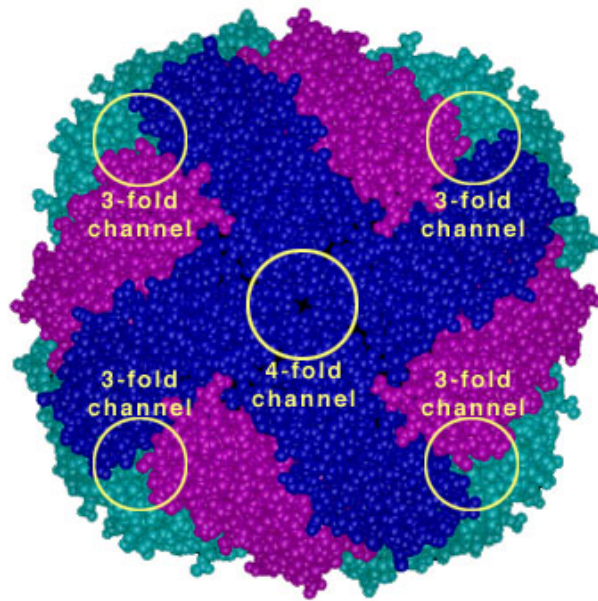


Figure 28 : Modèle représentant les pores d'ordre 3 et d'ordre 4 de la ferritine.

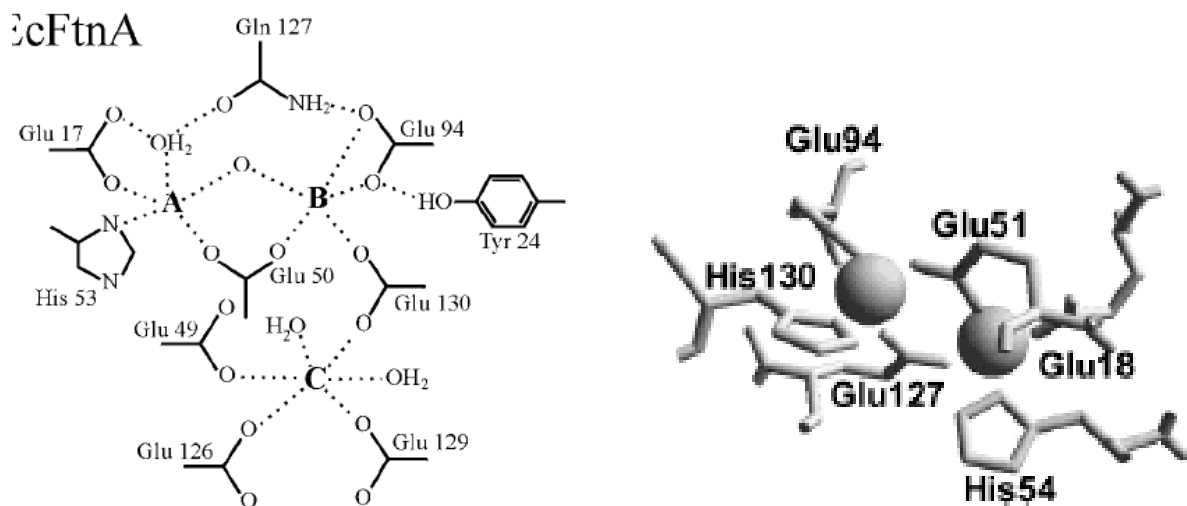


Figure 27 : Centre ferroxidase de la ferritine [A] et de la bactérioferritine [B] d'*E. coli* (Stillman et al., 2003). Deux sites de fixation du fer sont présents par centre ferroxidase. [A] Dans le premier site de fixation du fer A, l'atome de fer est coordonné par les résidus Glu17, Glu 50, His53 et Gln127 ; dans le deuxième site B, l'atome de fer est coordonné par les résidus Glu50, Glu94, Gln 127 et Glu 130. [B] Dans le premier site, l'atome de fer est coordonné par les résidus Glu18, Glu 51, His54 et Glu127 ; dans le deuxième site l'atome de fer est coordonné par les résidus Glu51, Glu94, Glu127 et His 130.

Elle comporte un centre catalytique ferroxidase localisé à l'intérieur du fagot de 4 hélices  $\alpha$  et des sites de nucléation faisant face à la cavité interne. Les centres ferroxidase des sous-unités de la ferritine de type eucaryote et de la bactérioferritine sont similaires à ceux de ferritines de mammifères et correspondent à des résidus glutamate, histidine et glutamine (fig. 27). D'ailleurs, ces résidus fixant le fer sont hautement conservés au cours de l'évolution notamment avec ceux de la chaîne H de la ferritine de mammifères (Andrews et *al.*, 1991). De petits canaux hydrophobes et hydrophiles sont disposés selon des axes de symétrie d'ordre quatre et trois respectivement et traversent la cavité (fig. 28).

Izuhara et ses collaborateurs (1991) ont démontré la présence dans le génome d'*E. coli* d'un gène *ftnA*, qu'ils ont cloné, codant un polypeptide de 165 acides aminés similaire à la sous-unité de la ferritine H humaine. Mais, la première ferritine Ftn à avoir été isolée à partir d'un procaryote est celle de *B. fragilis* (Rocha et *al.*, 1992). Un an plus tard, les ferritines Pfr de *H. pylori* et FtnA d'*E. coli* ont été purifiées et étudiées (Doig et *al.*, 1993 ; Frazier et *al.*, 1993 ; Hudson et *al.*, 1993). L'analyse par cristallographie à haute résolution de la ferritine FtnA d'*E. coli* réalisée par Stillman et *al.* (2000) dévoile une structure tridimensionnelle fortement similaire à la chaîne H de la ferritine humaine, malgré sa faible homologie de séquence avec cette dernière. La ferritine FtnA de *E. coli* fait un diamètre externe de 13 nm et avec une cavité centrale de 7,9 nm de diamètre. Les ferritines Ftn de *B. fragilis* et Pfr de *H. pylori* qui présentent 42% et 37% d'identité de séquence respectivement avec FtnA d'*E. coli* ont été caractérisées et conservent la même structure. Chez *E. coli*, il existe un gène *ftnB* distant du gène *ftnA* de 1,3 kb et qui pourrait être co-transcrit avec ce dernier et coder une seconde ferritine. Il n'est pas certain que FtnB fonctionne comme une protéine de stockage du fer car, contrairement à FtnA, sa structure primaire révèle l'absence de centre ferroxidase actif (Abdul-Tehrani et *al.*, 1999). D'autres microorganismes, possèdent ce deuxième type de ferritine notamment *C. jejuni* (Wai et *al.*, 1995, 1996), *P. gingivalis* (Ratnayake et *al.*, 2000), *V. cholerae*, etc... (Andrews et *al.*, 1998).

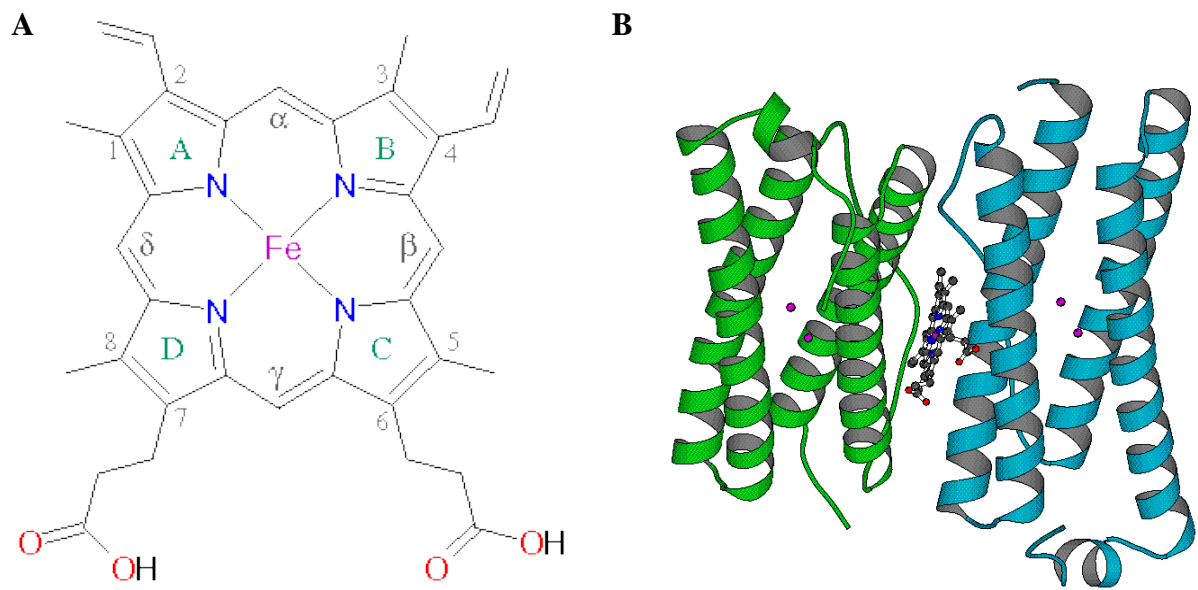


Figure 29 : [A] Structure de l'hème de type protoporphyrine IX de la bactéroferritine d'*E. coli*. [B] Structure des deux sous unités de la bactéroferritine d'*E. coli* avec un centre ferroxidase binucléaire par sous unité et un hème localisé entre les deux sous unités.

La première bactérioferritine décrite a été celle d'*A. vinelandii* en 1979 (Stiefel and Watt, 1979), néanmoins le gène codant une bactérioferritine a été cloné pour la première fois chez *E. coli* par Andrews et al. (1989). Le gène *bfr* est organisé en opéron avec le gène *bfd* chez *E. coli* et de nombreuses espèces comme *M. leprae*, *A. vinelandii*, *V. cholerae*, etc ... (Pessolani et al., 1994 ; Garg et al., 1996 ; Mey et al., 2005). Le gène *bfr* d'*E. coli* code un polypeptide de 158 acides aminés correspondant à une sous-unité individuelle. Les structures cristallographiques de plusieurs bactérioferritines ont été caractérisées comme celles de *R. capsulatus*, *D. desulfuricans* et *E. coli*. Comme les ferritines de type eucaryote, les bactérioferritines sont des protomères de 24 sous-unités qui s'assemblent selon une symétrie axiale 4/3/2. Malgré leur faible identité de séquence avec les ferritines, les bactérioferritines se replient globalement de manière semblable en un fagot de 4 hélices  $\alpha$  anti-parallèles englobant le centre ferroxidase. La bactérioferritine d'*E. coli* fait un diamètre externe d'environ 12 nm et possède une cavité centrale de 6 nm de diamètre. Le centre ferroxidase des ferritines et bactérioferritines sont fortement conservés chez *E. coli* et ne diffèrent que par deux résidus en position 127 et en position 130; en effet les résidus Gln 127 et Glu 130 sont remplacés par des acides aminés Glu 127 et His 130 dans la bactérioferritine Bfr (Fig. 27 [B] ; Yang et al., 2000). La particularité de la bactérioferritine est qu'elle possède en plus 12 hèmes de type b (soit un hème pour deux sous-unités) sous forme de protoporphyrine IX (fig. 29 [A]). Chaque groupement hème est localisé entre deux sous-unités et est lié par deux résidus méthionine (fig. 29 [B]). L'atome de fer est coordonné par l'atome de S d'un résidu méthionine de chacune des deux sous-unités (Frolow et al. 1994). Une expérience de mutagenèse dirigée sur 3 résidus méthionine conservés de la bactérioferritine de *E. coli* a montré qu'une bactérioferritine mutée en position 52 Met<sup>52</sup>→Ala<sup>52</sup> était dépourvue d'hème, suggérant que le résidu méthionine Met<sup>52</sup> de la sous-unité de la bactérioferritine est un ligand de l'hème (Andrews et al., 1995). La fonction des groupements hème n'est pas encore connue (Chasteen, 1998 ; Romao et al., 2000), néanmoins l'hème n'est pas requis au stockage du fer. Un rôle dans la réduction du coeur ferrique et dans la libération du fer à partir de la protéine a été proposé (Andrews, 1998). Contrairement aux ferritines bactériennes, certaines bactérioferritines sont des hétéropolymères composés de deux types de sous-unités différentes dont l'une serait capable de fixer un groupement hème et l'autre posséderait une activité ferroxidase, un cas de figure rappelant les chaînes H et L des ferritines de mammifères. Par exemple, la bactérioferritine de *N. gonorrhoeae* est formée des deux sous-unités BfrA (18 kDa) et BfrB (22 kDa) codées respectivement par les gènes *bfrA* et *bfrB* ordonnés en tandem (Chen and Morse, 1999). Les deux sous-unités Bfr A et Bfr B sont considérablement

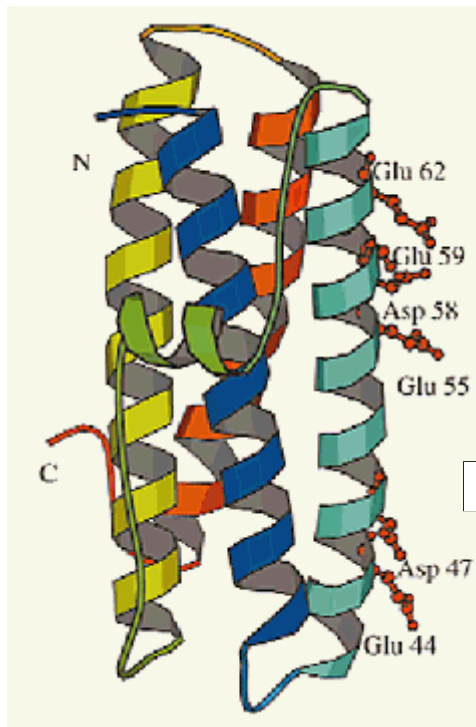
différentes quant à leur séquence en acides aminés présentant seulement 39,7% d'identité de séquence entre elles. BfrA présente le centre ferroxidase alors que BfrB présente le ligand fixant l'hème. Par ailleurs, les sous-unités BfrA et BfrB de *N. gonorrhoeae* se révèlent être identiques respectivement à 41,3 % et 56,1 % avec la bactérioferritine d'*E. coli*. La bactérie *P. putida* et la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 possèdent également une bactérioferritine hétéropolymérique avec deux sous-unités distinctes A et B codées respectivement par les gènes *bfrA* et *bfrB* dans lesquelles soit le centre ferroxidase soit le site de fixation de l'hème est absent (Miller et al., 2000 ; Keren et al., 2004). La sous-unité A est plus proche que la sous-unité B de la sous-unité originale de la bactérioferritine (Kim et al., 1997 ; Miller et al., 2000). Chez *P. aeruginosa*, l'existence d'une bactérioferritine hétéropolymérique est controversée. Moore et ses collaborateurs (1994) ont suggéré que la bactérioferritine est formée de sous-unités distinctes  $\alpha$  et  $\beta$ , alors que Ma et al. (1999) ont montré qu'il existent deux bactérioferritines différentes, l'une composée de sous-unités  $\alpha$  et l'autre de sous-unités  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  est plus proche que la sous-unité  $\alpha$  de la sous-unité originale de la bactérioferritine. Quant à la protéine Bfd d'*E. coli*, elle est supposée fonctionner en coopération avec Bfr, hypothèse suscitée par l'organisation en opéron des gènes correspondants (Quail et al., 1996). Ce polypeptide de 64 acides aminés, possède un centre [2Fe-2S] et présente un faible potentiel redox. Cette ferredoxine serait responsable de la réduction du cœur ferrique et de la libération du fer à partir de la bactérioferritine Bfr. Elle est similaire à la protéine FhuF d'*E. coli* supposée être impliquée dans la réduction du sidérophore ferrichrome dans le cytoplasme de la bactérie permettant le déchargement du fer (Matzanke et al., 2004 ; Quail et al., 1996).

## B. Protéine Dps

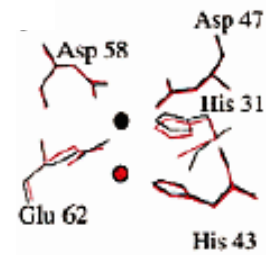
La première protéine Dps (**D**NA binding **p**rotein from **s**tarved cells) a été décrite chez *E. coli* (Almiron et al., 1992). Il s'agit d'une protéine dodécamérique de 205 kDa avec un diamètre externe de 9 nm. Sa résolution cristallographique par rayons X a révélé qu'elle est formée de 12 sous-unités identiques disposées selon une symétrie axiale d'ordre 3/2 et chacune de ces sous-unités est formée de 4 hélices  $\alpha$  A, B, C et D avec une courte hélice  $\alpha$  E située entre les hélices B et C qui constituent une structure en fagot similaire aux ferritines (fig. 30 [A] ; Grant et al., 1998). La protéine Dps d'*E. coli* peut accumuler jusqu'à 500 atomes de fer à l'intérieur de sa cavité centrale d'un diamètre de 5 nm approximativement (Zhao et al., 2002).



A



B



C

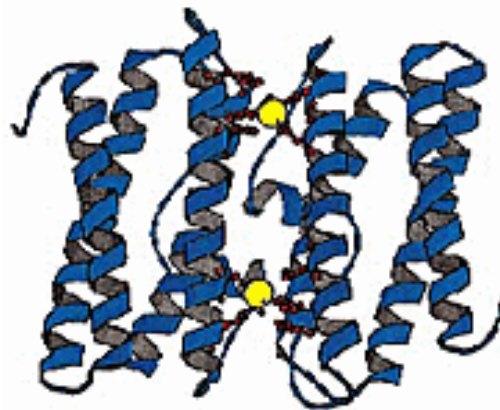


Figure 30 : [A] Structure d'une sous unité de la protéine Dps de *L. innocua* (Ilari et *al.*, 2000). Chaque sous-unité est formée d'un fagot de 4 hélices  $\alpha$  A (bleu foncé), B (bleu clair), C (jaune), D (orange) avec une courte hélice E (vert) reliant les hélices  $\alpha$  B et C. Le centre ferroxidase est localisé entre deux sous unités et est formé de deux sites de fixation du fer. [B] Les résidus impliqués dans la fixation du fer au niveau du centre ferroxidase sont les résidus His31, His43 et Asp47 d'une sous unité et les résidus Asp58 et Glu 62 de l'autre sous unité (Ilari et *al.*, 2000). [C] Structure d'un dimère de deux sous unités de la protéine Dps de *L. innocua* avec à leur interface le centre ferroxidase binucléaire (Ilari et *al.*, 2000).

Le site ferroxidase potentiel de la protéine Dps est de nature distincte à celle retrouvée dans les ferritines, il s'agit de résidus aspartate, glutamate et histidine (fig. 30 [B]). De plus, le site ferroxidase n'est pas localisé au sein de chaque sous-unité (fagot de 4 hélices  $\alpha$ ) comme pour les ferritines et bactérioferritines, mais entre deux sous-unités (fig. 30 [C]) (Ilari et al., 2000, 2002). Cependant, ce site est capable d'oxyder le fer ferreux en fer ferrique et de l'incorporer dans sa cavité centrale (Zhao et al., 2002). Des homologues à la protéine Dps ont été découverts depuis chez de nombreuses bactéries, chez *A. tumefaciens* (Ceci et al., 2003), *M. smegmatis* (Roy et al., 2004), et des protéines similaires à Dps, Dpr chez *S. mutans* (Yamamoto et al., 2000), *S. suis* (Niven et al., 2001) et *D. radiodurans* (Romao et al., 2006), MrgA chez *B. subtilis* (Chen and Helmann, 1995), HP-NAP de *H. pylori* (Tonello et al., 1999), les protéines Dlp-1 et Dlp-2 chez *B. anthracis* (Papinutto et al., 2002), et Fri de *L. innocua* (Ilari et al., 2000). L'ensemble des protéines Dps présente une structure cristallographique superposable. Par ailleurs, le centre ferroxidase est caractéristique pour l'ensemble des protéines Dps bien que les protéines Fri de *L. innocua*, Dpr de *S. mutans*, Dpr de *S. suis*, Dlp-1 et Dlp-2 de *B. anthracis* ne présentent que 28,6%, 27,6%, 25%, 18% et 21% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* respectivement (Bozzi et al., 1997 ; Ilari et al., 2000 ; Papinutto et al., 2002). La protéine Dps d'*E. coli* possède à son extrémité N-terminale des motifs de fixation à l'ADN qui contiennent des résidus chargés positivement, trois résidus lysine en positions 5, 8 et 10 et un résidu arginine en position 18, selon le motif K-X<sub>2</sub>-K-X<sub>1</sub>-K-X<sub>7</sub>-R, permettant à Dps d'interagir avec la double hélice d'ADN chargée négativement (Grant et al., 1998). Cette région N-terminale est flexible et très variable en terme de longueur au sein des protéines Dps contrairement au centre ferroxidase qui est fortement conservé parmi ces protéines. Ces régions ne reconnaissent pas une séquence spécifique de l'ADN, elles polymérisent autour de la double hélice d'ADN compactant la molécule d'ADN (Almiron et al., 1992). Cependant, cette région N-terminale impliquée dans la fixation à l'ADN n'est pas systématiquement présente dans les protéines Dps. L'interaction de Dps de *M. smegmatis* à l'ADN est associée à la présence de résidus chargés positivement lysine et arginine à son extrémité C-terminale (Roy et al., 2004). Par ailleurs, les protéines Dps d'*A. tumefaciens* et de *C. jejuni* ou similaires à Dps comme Fri de *L. innocua* (Ilari et al., 2000), HP-NAP de *H. pylori* (Zanotti et al., 2002), Dlp-1 et Dlp-2 de *B. anthracis* (Papinutto et al., 2002), Dpr de *S. mutans* (Yamamoto et al., 2002) sont incapables de se fixer à l'ADN *in vitro*.

## II- Biochimie des ferritines

La constitution du centre ferrique à l'intérieur de la cavité centrale des ferritines se déroule en 3 étapes : i) entrée du fer ferreux ii) oxydation du fer ferreux en fer ferrique iii) constitution du centre ferrique (Le Brun *et al.*, 1993 ; Harrison *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 2000 ; Zhao *et al.*, 2002).

Les études portant sur les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la constitution du centre ferrique ont été principalement réalisées sur des ferritines de mammifères. Ainsi, le fer ferreux est transporté dans la coque protéique à travers des canaux tapissés de résidus hydrophiles situés selon l'axe de symétrie d'ordre 3. Ces canaux sont au nombre de huit dans les ferritines de type eucaryote et bactérioferritines alors qu'on en dénombre quatre dans les protéines Dps. A l'intérieur de ces canaux, il existe un gradient électrostatique négatif dirigé vers l'intérieur de la cavité de la chaîne H de ferritine humaine en direction du site ferroxidase. Ces canaux permettent le passage de cations comme le fer ferreux ou de petites molécules vers les centres ferroxidase (Douglas and Ripoll, 1998). Une analyse par mutagenèse dirigée a montré que les résidus D127 et E130 des pores sont responsables de l'entrée du fer ferreux aux sites ferroxidases des ferritines humaines (Levi *et al.*, 1989 ; Treffry *et al.*, 1993). Ilari *et al.* (2000) ont montré que l'entrée du fer ferreux dans la protéine Dps de *L. innocua* suivait le même type de cheminement au travers de canaux hydrophiles d'ordre 3 grâce à un gradient électrostatique négatif. Le fer ferreux est ensuite oxydé en fer ferrique au niveau des centres ferroxidases. Les différentes ferritines fixent le fer à l'état ferreux à raison de deux ions ferreux par centre ferroxidase qui est dit binucléaire. Dans les ferritines de mammifères, ces deux ions ferreux sont oxydés par l'oxygène, au niveau de chaque centre ferroxidase, en un complexe dinucléaire de fer ferrique à pont oxo ( $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-Fe}^{3+}$ ), précurseur du centre ferrique. L'oxygène est réduit en peroxyde d'hydrogène (Yang *et al.* 1998). Chez les bactéries, le mécanisme de ferroxidation dans la ferritine est identique à celui des protéines de mammifère. Quant à la bactérioferritine d'*E. coli*, elle réalise la réaction de ferroxidation en deux étapes, avec dans un premier temps la réduction de l'oxygène  $\text{O}_2$  en peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  au niveau d'un centre ferroxidase, puis dans un second temps la réduction rapide du peroxyde d'hydrogène en  $\text{H}_2\text{O}$  au niveau d'un second centre ferroxidase. Les données suggèrent que le peroxyde d'hydrogène est un meilleur oxydant que l'oxygène (Bou-Abdallah *et al.*, 2002).

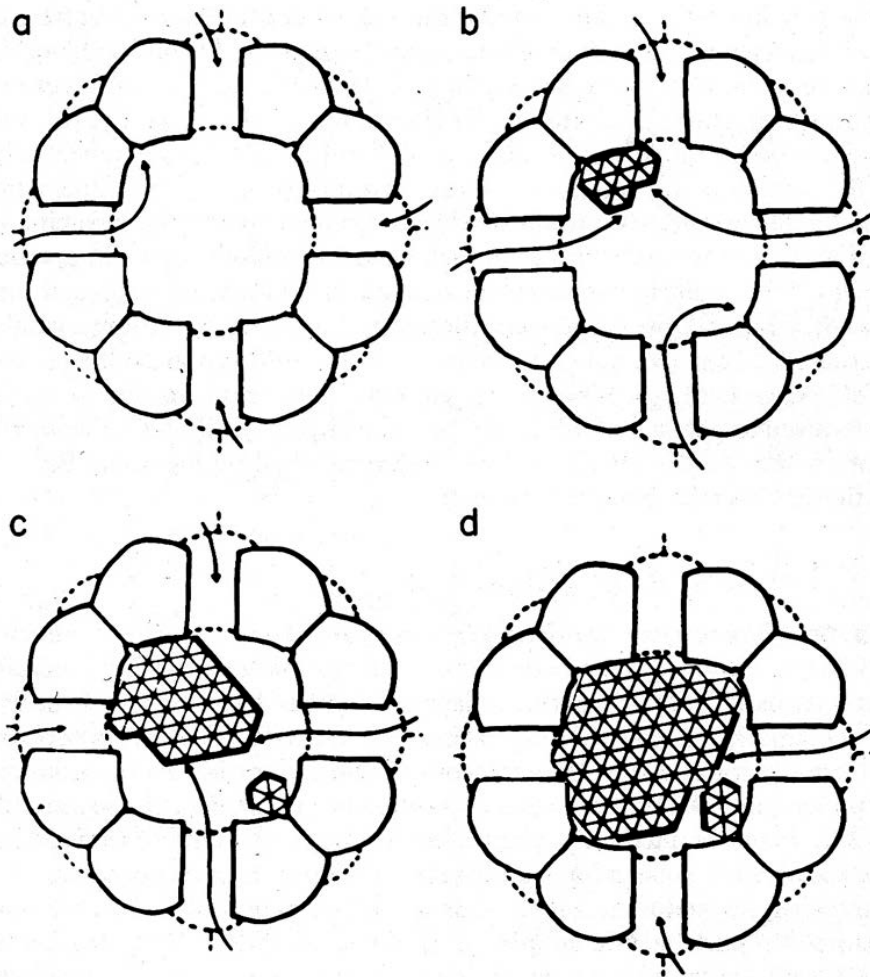
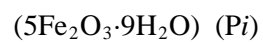
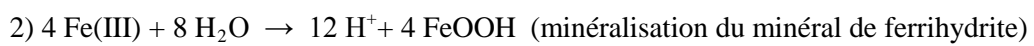
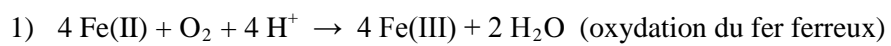


Figure 31 : Modèle présentant la formation des cristaux de ferrihydrite à l'intérieur de la ferritine (P.M. Harrison et T.H. Lilley in *Iron Carriers and iron Proteins* (1989)).



La protéine Dps d'*E. coli* utilise préférentiellement le peroxyde d'hydrogène pour oxyder le fer ferreux. Néanmoins, elle est capable d'utiliser l'oxygène comme oxydant même si la conversion du  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  se fait plus lentement (Zhao et al., 2002). La bactérioferritine et la protéine Dps consomment donc le peroxyde d'hydrogène et participent ainsi à sa détoxification prévenant la formation de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton.

Après l'oxydation du fer ferreux, le centre ferroxidase est ensuite régénéré pour fixer à nouveau deux ions ferreux tandis que le fer à l'état ferrique passe dans la cavité centrale de l'apoferritine, riche en résidus carboxylates ; ces régions constituent les sites de nucléation situés sur la face intérieure de la coque protéique (Yang et al., 1998). La formation du cœur ferrique appelée biominéralisation est initiée par la fixation de 2 ions ferriques au centre de nucléation (Gallois et al., 1997 ; Granier et al., 1998 ; Hempstead et al., 1997). Les centres de nucléation correspondent à des résidus carboxylates conservés qui font face à la cavité centrale des ferritines à l'intérieur de laquelle est constitué le centre ferrique. La nature du cristal formé diffère en fonction du type de ferritine et de l'espèce. Dans les ferritines de mammifères, il est formé de cristaux de ferrihydrite ( $5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) formés d'atomes de fer et d'oxygène (Chasteen and Harrison, 1999); alors que le cœur ferrique des bactérioferritines est riche en phosphate et amorphe. La présence de phosphate semble jouer un rôle important dans la formation du cœur ferrique de la bactérioferritine d'*E. coli* en augmentant le taux de réaction (Aitken-Rogers et al., 2004). Une fois que la nucléation a eu lieu, le cristal de ferrihydrite ( $5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) continue à croître à l'intérieur de la cavité centrale où il est accroché à la surface interne et reste ainsi confiné (fig. 31). Des expériences de mutagenèse dirigée sur la ferritine humaine ont montré qu'une modification du centre ferroxidase et de nucléation provoque l'incapacité des ferritines à oxyder ou incorporer le fer au sein de sa cavité centrale (Wade et al., 1991 ; Sun et al., 1993). Un centre ferroxidase fonctionnel est indispensable à la bactérioferritine d'*E. coli* pour constituer son cœur ferrique (Baaghil et al., 2003). La protéine Dpr de *S. suis* mutée au niveau des résidus aspartate et glutamate du centre ferroxidase est incapable d'incorporer du fer *in vivo* (Pulliainen et al., 2003). Une substitution en alanine du site carboxylate de nucléation dans la ferritine humaine L abolit complètement la réaction de biominéralisation (Waldo et al., 1996 ; Liu et al., 2004). Néanmoins, certaines mutations dans le centre de nucléation des sous-unités des ferritines H n'affectent pas le taux de la réaction de biominéralisation. En effet, contrairement aux sous-unités L de ferritines, les sous-unités H ont un centre ferroxidase fonctionnel et la formation de complexes dinucléaires de fer ferrique à pont oxo est suffisante pour assurer la minéralisation.

Lorsque le métabolisme intracellulaire le requiert, le fer de la ferritine sous forme minérale, non toxique et biodisponible est mobilisé par réduction du cœur de ferrihydrite. La nature de l'agent qui est à l'origine de la réduction *in vivo* n'est pas connue, néanmoins il a été montré expérimentalement que l'ascorbate et les flavines peuvent réduire le fer ferrique des ferritines *in vitro* (Jones *et al.* 1978, Takagi *et al.* 1998). Le mécanisme moléculaire par lequel le fer est libéré à partir de la cavité centrale des ferritines n'est en effet pas connu à ce jour. Les canaux d'ordre 4 pourraient donner lieu à un gradient électrostatique dirigé de l'intérieur de la cavité vers l'extérieur constituant une porte de sortie pour le fer durant le processus de déminéralisation (Douglas and Ripoll, 1998).

### III- Fonction des ferritines

La principale fonction des ferritines est de conserver le fer sous forme ferrique non réactive pour en limiter la toxicité. Elles oxydent l'excès de fer ferreux présent dans le cytoplasme grâce à leur centre ferroxidase et le stockent sous forme ferrique dans leur cavité centrale qui constitue un site non réactif. Le fer stocké par les ferritines peut être mobilisé par réduction lorsque la disponibilité en fer exogène devient insuffisante. Les bactéries disposent de trois types de ferritines (ferritine de type eucaryote, bactérioferritine, Dps) qui peuvent coexister au sein d'une même bactérie. Néanmoins, certaines espèces comme *B. subtilis*, *L. innocua*, *S. mutans*, *M. jannascii*, *M. pneumoniae* et *Synechocystis PCC6803*, ne possèdent ni ferritine ni bactérioferritine d'après l'analyse de leur séquence génomique. Cependant ces espèces possèdent des protéines Dps. Compte tenu de la multiplicité des ferritines, on s'interroge sur leur fonction respective notamment dans l'homéostasie du fer. L'étude de mutants incapables de synthétiser ces ferritines et l'analyse du contenu intracellulaire en fer de ces mutants a permis de mieux comprendre la fonction physiologique de ces ferritines dans un organisme donné.

#### A. Ferritine Ftn

En ce qui concerne les organismes eucaryotes, une délétion du gène codant la ferritine est létale chez la souris (Ferreira *et al.*, 2000) et des maladies humaines du système nerveux central sont associées à des mutations dans la ferritine H ou L (Curtis *et al.*, 2001 ; Roetto *et al.*, 2002). Un mutant *fnA* d'*E. coli* présente un taux de croissance réduit dans des conditions

limitantes en fer. Ceci est observé uniquement lorsque les précultures des souches sont réalisées avec suffisamment de fer pour permettre à FtnA d'engranger des réserves, suggérant ainsi que la fonction de FtnA est de stocker du fer durant la phase stationnaire qui pourra être mobilisé pour répondre aux besoins du métabolisme bactérien lorsque les conditions seront moins favorables (Abdul-Tehrani et al., 1999). Par ailleurs, l'inactivation du gène *ftnA* de *E. coli* résulte en une réduction d'approximativement 50% du contenu en fer total en phase stationnaire dans des conditions riches en fer. Cette baisse du contenu en fer total est attribuée à une réduction d'un facteur 2 à 2,5 des quantités de fer ferrique sachant que les quantités de fer ferreux restent approximativement identiques à celles de la souche sauvage (Abdul-Tehrani et al., 1999). En phase exponentielle ou en conditions limitantes en fer, le contenu en fer est le même pour le mutant *ftnA* et la souche sauvage. Le mutant ferritine *cft* de *C. jejuni* est incapable de croître en présence d'un chélateur de fer en comparaison à la souche sauvage alors qu'il se comporte comme la souche sauvage en absence de chélateur du fer (Wai et al., 1996). De même, en absence d'hème ou de transferrine (source de fer), un mutant *ftn* de *P. gingivalis* croît moins rapidement que la souche sauvage alors qu'en présence d'hème ou transferrine il croît de manière comparable à la souche sauvage (Renayake et al., 2000). Ces données suggèrent que les réserves en fer des ferritines sont mobilisées et permettent ainsi à la bactérie de compenser ultérieurement l'absence de fer dans son environnement et de survivre. Par contre, un mutant *pfr* de *H. pylori* se comporte comme la souche sauvage en présence d'un chélateur du fer (carence en fer) (Bereswill et al., 2000).

Chez *C. jejuni*, l'absence de ferritine Cft augmente la sensibilité au stress oxydant généré par le paraquat et le peroxyde d'hydrogène (Wai et al., 1996). La sensibilité du mutant *cft* de *C. jejuni* à la carence en fer et au stress oxydant peut être supprimée par la présence d'un plasmide portant une copie sauvage du gène *cft*, suggérant que la ferritine de *C. jejuni* peut être une source de fer lorsque le fer devient limitant et que cette ferritine protège la bactérie contre le stress oxydant. A l'inverse, un mutant *ftnA* d'*E. coli* n'est pas plus sensible à un stress oxydant que la souche sauvage (Abdul-Tehrani et al., 1999). Par contre, un mutant *ftnA fur* d'*E. coli* montre une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène en comparaison au mutant *fur*. Ces résultats indiquent qu'en absence de la protéine Fur, la ferritine FtnA d'*E. coli*, en séquestrant le fer ferreux qui est toxique, va protéger la bactérie face à un stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène. En revanche, le double mutant *fur ftnA* n'est pas plus sensible aux générateurs de NO ou d'anions superoxyde (Abdul-Tehrani et al., 1999). Les ferritines Pfr de *H. pylori* et Ftn de *P. gingivalis* ne sont pas impliqués dans la résistance au stress oxydant. En effet, un mutant *pfr* d'*H. pylori* possède des propriétés de croissance

comparables à celles de la souche sauvage en présence de paraquat (Bereswill et *al.*, 2000) et un mutant *ftn* de *P. gingivalis* n'est pas plus sensible au peroxyde d'hydrogène ou à l'hydroperoxyde de Cumene que la souche sauvage (Retnayake et *al.*, 2000).

Très peu de travaux ont montré l'importance des ferritines dans le pouvoir pathogène de bactéries. Cependant Waidner et ses collègues ont montré qu'un mutant *pfr* de *H. pylori* est incapable de coloniser la muqueuse gastrique d'une gerbille infectée par voie orale. La ferritine Pfr semble donc importante pour la survie de la bactérie chez l'animal (Waidner et *al.*, 2002).

## B. Bactéioferritine Bfr

Le mutant *bfr* d'*E. coli* n'a pas de phénotype particulier. Il n'est pas affecté par une carence en fer ou un stress oxydant (Abdul-Tehrani et *al.*, 1999). De plus, moins de 1% du fer total cellulaire s'accumule dans la bactéioferritine, laissant supposer que la bactéioferritine n'est pas impliquée dans le stockage du fer et ne constitue pas une réserve de fer pour le métabolisme bactérien chez *E. coli* (Andrews et *al.*, 1995). Au contraire, chez la cyanobactérie *Synechocystis sp.* PCC 6803 environ 50% du fer intracellulaire est attribué à la bactéioferritine. Cependant, il faut souligner que ce microorganisme n'a pas d'autres types de ferritines. Des mutants *bfrA*<sup>-</sup>, *bfrB*<sup>-</sup> et *bfrA*<sup>-</sup> *bfrB*<sup>-</sup> de *Synechocystis sp.* PCC 6803 sont non seulement affectés pour leur croissance en conditions limitantes en fer, mais voient également leur contenu en fer baisser de manière dramatique résultant en une diminution du contenu cellulaire en photosystème PSI (Keren et *al.*, 2004). La fonction du groupement hème dans la capacité de la bactéioferritine à accumuler du fer a été étudiée chez *E. coli*. Des protéines mutagénéisées en position 52 Met→Ala dépourvues d'hème sont correctement assemblées et sont capables de stocker du fer *in vivo* et *in vitro* indiquant que l'hème n'est pas nécessaire à l'assemblage de la bactéioferritine, à l'oxydation du fer par la bactéioferritine ou à la distribution du fer par la bactéioferritine (Andrews et *al.*, 1995). Ces variants de bactéioferritines accumulent approximativement 4 fois plus de fer *in vivo* que la bactéioferritine sauvage : l'hème serait ainsi impliqué dans la libération du fer à partir de la bactéioferritine (Andrews et *al.*, 1995). La fonction de ce groupement hème reste néanmoins une énigme.

Tout comme chez *E. coli*, un mutant *bfr* de *B. melitensis* n'est pas plus sensible que la souche sauvage au paraquat ou au peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indiquant que la bactéioferritine ne participe pas à la protection des bactéries face au stress oxydant (Denoel



et *al.*, 1997). En revanche, le mutant *bfrB* de *N. gonorrhoeae* est plus sensible au peroxyde d'hydrogène et paraquat en comparaison à la souche sauvage. Par ailleurs, la croissance du mutant *bfrB* de *N. gonorrhoeae* est réduite de 35% en milieu carencé en fer (Chen and Morse, 1999). De même, le mutant *bfrA* de *P. aeruginosa* est plus sensible au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage suggérant un rôle de Bfr dans la résistance au stress oxydant ; néanmoins la sensibilité au peroxyde d'hydrogène est moins accrue en conditions limitantes en fer qu'en milieu riche en fer (Ma et *al.*, 1999). Cependant, l'inactivation du gène *bfrA* résulte en une baisse de 50% de l'activité de la catalase A consécutive à une diminution de la production de la protéine KatA. Or l'activité ferroxidase de BfrA est nécessaire à une pleine activité de la catalase KatA. La sensibilité accrue du mutant *bfrA* de *P. aeruginosa* serait donc due à la non utilisation de BfrA comme source de fer pour la synthèse des groupements hème incorporés dans la catalase codée par le gène *katA*, qui est situé en amont des gènes *bfrA* et *bfrB*. Un mutant *bfrB* de *P. aeruginosa* est autant sensible que la souche sauvage au peroxyde d'hydrogène et possède une activité catalase A comparable à celle de la souche sauvage, c'est pourquoi aucune fonction physiologique n'a pu être établie pour BfrB (Ma et *al.*, 1999). Par ailleurs, le contenu en fer total du mutant *bfrA* de *P. aeruginosa* est comparable à celui de la souche sauvage (Ma et *al.*, 1999). Un mutant *bfrA* de *P. putida*, contrairement à *P. aeruginosa*, présente des propriétés de croissance comparables à celle de la souche sauvage en présence ou en absence de fer et une activité catalase A normale (Miller et *al.*, 2000).

Les données de la littérature montrent que la bactéroferritine ne joue pas un rôle dans la pathogénicité des bactéries. En effet, un mutant *bfr* de *B. melitensis* n'est pas affecté dans la survie dans des macrophages humains (Denoel et *al.*, 1997) et un mutant *bfrA* de *P. putida* colonise les racines de haricot rouge aussi bien que la souche sauvage (Miller et *al.*, 2000).

### C. Protéines Dps

L'étude de mutants *dps* a mis en lumière le rôle de Dps dans la fixation du fer et la protection de l'ADN contre les dommages causés par les espèces actives de l'oxygène. Un mutant *fri* de *L. monocytogenes* est affecté pour ses propriétés de croissance lorsque les bactéries sont transférées d'un milieu riche à un milieu carencé en fer. Par ailleurs l'aptitude du mutant *fri* à former des colonies est drastiquement inhibée en présence d'un chélateur du fer (Olsen et *al.*, 2005). Un mutant *dpr* de *S. mutans* est affecté pour son aptitude à former des colonies sur milieu solide en présence d'oxygène, bien qu'il croît aussi bien que la souche sauvage en milieu liquide (Yamamoto et *al.*, 2000). Un mutant *dps* d'*E. coli* O157:H7 voit sa

survie réduite lorsqu'il est exposé au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou à un stress acide (Choi et al., 2000). Les mutants *dps* d'*E. coli*, de *P. gingivalis* et de *C. jejuni* sont plus sensibles au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage en phase stationnaire (Almiron et al., 1992; Ueshima et al., 2003; Ishikawa et al., 2003). L'addition d'un chélateur de fer comme le Desféral dans le milieu de culture restaure la résistance au peroxyde d'hydrogène du mutant *dps* de *C. jejuni* suggérant que la protéine Dps a la propriété de fixer le fer et de conférer une protection contre le peroxyde d'hydrogène (Ishikawa et al., 2003). Une exposition d'une souche sauvage de *S. mutans* à de l'oxygène induit l'expression de Dpr et réduit la concentration intracellulaire en fer libre de près de 90%. Cette baisse de la concentration intracellulaire en fer libre est liée à un changement de l'état du fer à l'intérieur de la bactérie et non pas à une modification du contenu global en fer. Dans les mêmes conditions, un mutant *dpr* maintient sa concentration intracellulaire en fer libre élevée (Yamamoto et al., 2004). La protéine Dpr de *S. mutans* est donc capable de fixer le fer (Yamamoto et al., 2000). L'incorporation du fer *in vivo* par Dpr contribue à abaisser la concentration intracellulaire en fer réactif et empêche ainsi la formation de radicaux hydroxyles (Yamamoto et al., 2004). La capture du fer par les protéines Dps empêcherait de cette façon la formation de radicaux libres par la réaction de Fenton. Néanmoins, cette stratégie de défense fondée sur la séquestration du fer ne peut pas justifier à elle seule de la protection de l'ADN durant une carence prolongée. Par conséquent, l'action de protection de l'ADN exercée par la protéine Dps face au stress oxydant a été attribuée à son association physique avec cette molécule. Des essais réalisés *in vivo* et *in vitro* ont révélé que Dps est capable de se lier à l'ADN et de former un complexe Dps-ADN empêchant la dégradation de l'ADN provoquée par le fer ferreux et le peroxyde d'hydrogène (Wolf et al., 1999 ; Martinez et al., 1997). Des observations au microscope électronique ont été réalisées *in vitro* à partir de protéines Dps purifiées auxquelles l'ADN a été ajouté et *in vivo* dans une souche d'*E. coli* surexprimant Dps (Wolf et al., 1999). Les résultats montrent que les dodécamères de Dps s'agglutinent autour de la molécule d'ADN et co-cristallisent formant des couches superposées successives où s'intercale l'ADN qui est séquestré et potentiellement protégé. Contrairement aux souches sauvage et surexprimant Dps, un mutant *dps* ne présente plus cette structure cristalline de l'ADN en conditions de carence nutritionnelle ou de stress. Il existe donc une relation entre la carence nutritionnelle et le processus de cristallisation de l'ADN. Des essais de dégradation de l'ADN réalisés *in vitro* ont révélé que l'ADN est dégradé en présence de FeSO<sub>4</sub> et d'oxygène; cependant l'ADN n'est pas dégradé en présence de la protéine Dps chez *E. coli* (Zhao et al. 2002). Les protéines Dps de *P. gingivalis* et *M. Smegmatis* et NapA de *H. pylori* sont également capables de se fixer à l'ADN (Ueshima et al.,

2003 ; Gupta et *al.*, 2002 ; Bijlsma et *al.*, 2000). Mais au regard de la taille de la molécule d'ADN, la fixation de Dps à l'ADN ne peut pas conférer à elle seule la protection du génome bactérien. Effectivement, la protéine Dps de *P. gingivalis* confère la résistance au peroxyde d'hydrogène et se fixe à l'ADN, néanmoins un mutant *dps* n'est pas plus sensible que la souche sauvage à des agents qui endommagent l'ADN (mitomycine C ou metronidazole). Ces observations suggèrent que la protéine Dps contribuerait à la résistance au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par un mécanisme n'impliquant pas sa fixation à la molécule d'ADN. L'hypothèse avancée est que la consommation du peroxyde d'hydrogène au niveau du centre ferroxidase de la protéine Dps lors de la réaction d'oxydation des ions ferreux interviendrait dans cette résistance (Ueshima et *al.*, 2003). De plus, tous les membres de la famille des Dps ne sont pas capables de se fixer à l'ADN telle la protéine Dps d'*A. tumefaciens* qui néanmoins conserve son aptitude à protéger l'ADN des dommages oxydatifs causés par du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ceci et *al.*, 2003). Les protéines Dps de *C. jejuni*, Fri de *L. innocua*, Dpr de *S. mutans*, Dpr de *S. suis*, Dlp-1 et Dlp-2 de *B. anthracis* sont également incapables de se fixer à l'ADN tout en conservant leur aptitude à protéger du peroxyde d'hydrogène, indiquant qu'elles protègent l'ADN grâce à leur propriété à fixer le fer et à consommer le peroxyde d'hydrogène (Ishikawa et *al.*, 2003 ; Bozzi et *al.*, 1997 ; Yamamoto et *al.*, 2002 ; Pulliainen et *al.*, 2003 ; Papinutto et *al.*, 2002). La résistance au peroxyde d'hydrogène conférée par Dpr dépend aussi de sa capacité à fixer du fer *in vivo*. Ainsi, l'ajout d'un chélateur du fer supprime l'hypersensibilité du mutant *dpr* au peroxyde d'hydrogène (Pulliainen et *al.*, 2003).

Plusieurs études ont souligné le rôle joué par les protéines Dps dans la pathogénicité des bactéries. La protéine Dps de *P. gingivalis* est importante pour la survie de cette espèce dans des cellules endothéliales humaines. En effet, un mutant *dps* voit baisser sa viabilité beaucoup plus rapidement que la souche sauvage bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans la capacité d'invasion des deux souches (Ueshima et *al.*, 2003). De même, Dps favorise la survie de *S. enterica typhimurium* dans les macrophages de souris et augmente ainsi sa virulence (Halsey et *al.*, 2004). Enfin, la protéine Fri de *L. monocytogenes* est essentielle à la virulence de cette espèce chez la souris (Dussurget et *al.*, 2005). En effet, une étude menée par Olsen et *al.* (2005) a révélé qu'un mutant *fri* est affecté pour sa prolifération dans les organes de souris infectée par voie péritonéale et pour sa multiplication intracellulaire dans des macrophages de souris.

#### IV- Régulation des ferritines

Chez *E. coli*, le gène *ftnA* est induit par la présence de fer et réprimé en carence en fer ou dans un mutant *fur* : Fur régulerait positivement l'expression du gène *ftnA* (Abdul-Tehrani et al., 1999). Quelques années plus tard, la découverte du petit ARN non-sens RyhB a permis d'expliquer cette régulation positive par Fur chez *E. coli* (Massé and Gottesman, 2002). Fur réprime la transcription du gène *ryhB* un petit ARN anti-sens, qui déstabilise le messenger *ftnA* et/ou empêche sa traduction. Le gène *ftnB* de *S. enterica* et le gène *pfr* de *H. pylori* sont également régulés positivement en présence de fortes concentrations en fer de manière dépendante à Fur (Bjarnason et al., 2003 ; Bereswill et al., 2000 ; Van Vliet et al., 2002). En effet, la synthèse de transcrits *pfr* chez *H. pylori* est réprimée en carence en fer et activée en présence de fer. Par ailleurs, dans un mutant *fur*, la transcription du gène *pfr* est constitutive quelle que soit la concentration en fer. Cependant le mécanisme mis en jeu est différent de celui précédemment décrit chez *E. coli*. Selon que la protéine Fur soit ferrée ou non, elle va présenter de l'affinité pour le promoteur du gène *pfr*. En effet, l'affinité de la protéine Fur va brutalement chuter en présence de fer et une levée de répression va s'en suivre (Delany et al., 2001). Le gène *ftnA* de *B. fragilis* est régulé positivement par le fer au niveau transcriptionnel, mais aussi par le stress oxydant. C'est l'action combinée du fer et de l'oxygène qui induit le gène *ftnA* de *B. fragilis*. Dans un mutant *oxyR*, l'induction du gène *ftnA* par l'oxygène est significativement réduite ; mais OxyR contrôle sans doute indirectement l'expression du gène *ftnA* car aucune boîte OxyR n'a été repérée dans la région promotrice du gène *ftnA* (Rocha et al., 2004). Chez *S. aureus*, le gène *ftnA* est induit par le fer et est réprimé par le manganèse de manière PerR dépendante (Horsburgh et al., 2001).

Chez *E. coli*, le gène *bfr* est induit par le fer de manière Fur dépendante bien qu'aucune interaction de Fur avec le gène *bfr* n'ait été mise en évidence (Harrison and Arosio, 1996). Cette régulation positive par Fur passe par l'ARN non-sens RyhB (Massé and Gottesman, 2002). Par ailleurs, le gène *bfr* est organisé en opéron avec le gène *bfd* chez *E. coli*, cependant les deux gènes semblent être régulés différemment. En effet, contrairement au gène *bfr* qui est réprimé par une carence en fer, le gène *bfd* est régulé positivement en conditions limitantes en fer et dans un mutant *fur* (Mc Hugh et al., 2003 ; Quail et al., 1996). Les mêmes observations ont été faites chez *S. enterica* (Bjarnason et al., 2003), alors que chez *V. cholerae*, les gènes *bfr* et *bfd* sont tout deux régulés positivement en conditions limitantes en fer et dans un mutant *fur* (Mey et al., 2005b). Mais, contrairement à ce qui se passe chez *E. coli*, RyhB n'a

aucun effet sur la quantité de transcrits *bfd-bfr* chez *V. cholerae* (Mey et al., 2005a). L'expression du gène *bfrA* de *P. aeruginosa* est fortement induite en présence à la fois de fer et de peroxyde d'hydrogène au cours de la phase exponentielle de croissance. Par ailleurs, l'expression du gène *bfrA* de *P. aeruginosa* est induite en phase stationnaire de croissance (Ma et al., 1999). Le gène *bfr* d'*E. coli* est aussi induit en phase stationnaire par le facteur  $\sigma^S$  ou RpoS (Lacour et al., 2004 ; Andrews et al., 1997).

La protéine Dps est une des protéines les plus abondantes en phase stationnaire avec plus de 180 000 molécules par cellule bactérienne d'*E. coli* (Almiron et al., 1992). Chez *E. coli*, l'expression du gène *dps* est contrôlée en phase stationnaire par les facteurs sigma S et IHF (Altuvia et al., 1994 ; Lacour et al., 2004). Jeong et al. (2006) ont montré que l'induction du gène *dps* en phase stationnaire de croissance fait intervenir les protéines RpoS et CRP (cAMP receptor protein). CRP réprimerait l'expression du gène *dps* en modulant les niveaux cellulaires de facteur sigma S. Les gènes *mrgA* de *B. subtilis*, *napA* de *H. pylori* et *fri* de *L. innocua* sont également induits par la phase stationnaire (Chen et al., 1993 ; Cooksley et al., 2003 ; Boonjakuakul et al., 2005 ; Polidoro et al., 2002); alors que les gènes *dps* de *C. jejuni* (Ishikawa et al., 2003), *dpr* de *S. suis* (Pulliainen et al., 2003), et *fri* de *L. monocytogenes* (Polidoro et al., 2002 ; Olsen et al., 2005) ne sont pas ou que très légèrement induits par l'entrée en phase stationnaire.

Par ailleurs, la protéine Dps est induite en phase exponentielle de croissance par un stress oxydant ou osmotique, ou encore une carence nutritionnelle. La protéine Dps d'*E. coli* est rapidement dégradée en phase exponentielle de croissance par la protéase ClpXP. La protéolyse de Dps par ClpXP est inhibée lors d'une carence en carbone ou d'un stress oxydant ( $H_2O_2$ ) (Stephani et al., 2003). De plus, la transcription du gène *dps* d'*E. coli* est induite par le peroxyde d'hydrogène de manière OxyR dépendante uniquement en phase exponentielle de croissance, bien que OxyR soit également présente en phase stationnaire de croissance (Altuvia et al., 1994). Chez *B. fragilis*, la quantité de transcrits *dps* est multiplié par un facteur 500 par un stress oxydant ( $H_2O_2$ ) de manière OxyR dépendante. Par ailleurs, le gène *dps* de *B. fragilis* est induit d'un facteur 4 par une exposition à de l'oxygène dans un mutant *oxyR* mais n'est plus induit par le peroxyde d'hydrogène, suggérant que ce gène est régulé par la présence d'oxygène de façon OxyR indépendante (Rocha et al., 2000). Au contraire, chez *P. gingivalis*, l'expression du gène *dps* est régulée positivement par une exposition à l'oxygène atmosphérique de manière OxyR dépendante et n'est pas contrôlée en réponse au  $H_2O_2$  : chez *P. gingivalis* OxyR ne fonctionnerait pas comme un senseur du peroxyde d'hydrogène comme

Protéine	Espèce	Propriétés	Signal d'induction	Régulateur
Dps	<i>E. coli</i>	Se fixe à l'ADN Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , phase stationnaire	OxyR, RpoS
Dps	<i>A. tumefaciens</i>	Ne se fixe pas à l'ADN Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
NapA	<i>H. pylori</i>	Se fixe à l'ADN Protège contre O <sub>2</sub>	phase stationnaire, présence de fer	Fur
Dps	<i>B. fragilis</i>	Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub>	OxyR
Dps	<i>C. jejuni</i>	Ne se fixe pas à l'ADN Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Indépendant du fer, de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou de phase stationnaire	Expression constitutive
Dps	<i>P. gingivalis</i>	Se fixe à l'ADN Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	OxyR
Dpr	<i>S. mutans</i>	Ne se fixe pas à l'ADN Protège contre O <sub>2</sub> et H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Dpr	<i>S. suis</i>	Ne se fixe pas à l'ADN Protège contre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
MrgA	<i>B. subtilis</i>		Phase stationnaire, Fer, Manganèse, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PerR
Fri	<i>L. innocua</i>	Ne se fixe pas à l'ADN	Phase stationnaire, carence en fer	

Tableau 1 : Fonction et régulation de différentes protéines Dps.

chez *E. coli* ou *B. fragilis* mais plutôt comme un senseur de l'oxygène (Ueshima et al., 2003). Chez d'autres micro-organismes qui ne possèdent pas OxyR, l'induction du gène *dps* en réponse au stress oxydant fait intervenir un autre régulateur transcriptionnel, PerR. Il en est ainsi de MrgA de *B. subtilis*, qui est induite par le peroxyde d'hydrogène selon un mécanisme dépendant du répresseur transcriptionnel PerR (Fuangthong et al., 2002 ; Herbig et al., 2001). Le gène *fri* de *L. monocytogenes* est régulé par le répresseur transcriptionnel PerR en présence ou absence de peroxyde d'hydrogène (Olsen et al., 2005). Une carence nutritionnelle comme une carence en fer réprime fortement l'expression de NapA de *H. pylori*. Il y a en partie levée de répression dans un mutant *fur*, suggérant une régulation du gène *napA* par Fur. Une boîte Fur a d'ailleurs été identifiée dans le promoteur du gène *napA* (Cooksley et al., 2003). Des travaux réalisés par Van Vliet et al. (2002) montrent au contraire que la transcription du gène *napA* de *H. pylori* n'est affectée ni par le fer ni par Fur. Contrairement aux autres gènes codant des ferritines, certains gènes *dps* sont régulés négativement par le fer. C'est le cas du gène *fri* de *L. innocua* qui est induit par une carence en fer en phase exponentielle (Polidoro et al., 2002). De même, le gène *mrgA* de *B. subtilis* est réprimé par le fer et le manganèse sous le contrôle de PerR mais indépendamment de Fur (Fuangthong et al., 2002). La quantité de transcrits *dpsA* de *Synechococcus* est faible en présence de fer alors qu'une induction est observée en carence en fer. Le gène *fri* de *L. monocytogenes* est aussi induit par le facteur sigma B en réponse à un choc thermique (Olsen et al., 2005). Enfin, l'expression du gène *dps* de *C. jejuni* n'est pas régulée en fonction de la disponibilité en fer ou par le peroxyde d'hydrogène (Ishikawa et al., 2003). La régulation de l'expression du gène *dps* varie donc énormément d'un microorganisme à un autre, c'est pourquoi nous faisons un bilan récapitulatif dans le tableau 1.

En guise de conclusion à cette partie de l'introduction nous proposons le schéma suivant qui illustre la coordination entre les régulateurs du stress oxydant et du stockage du fer (fig. 32).

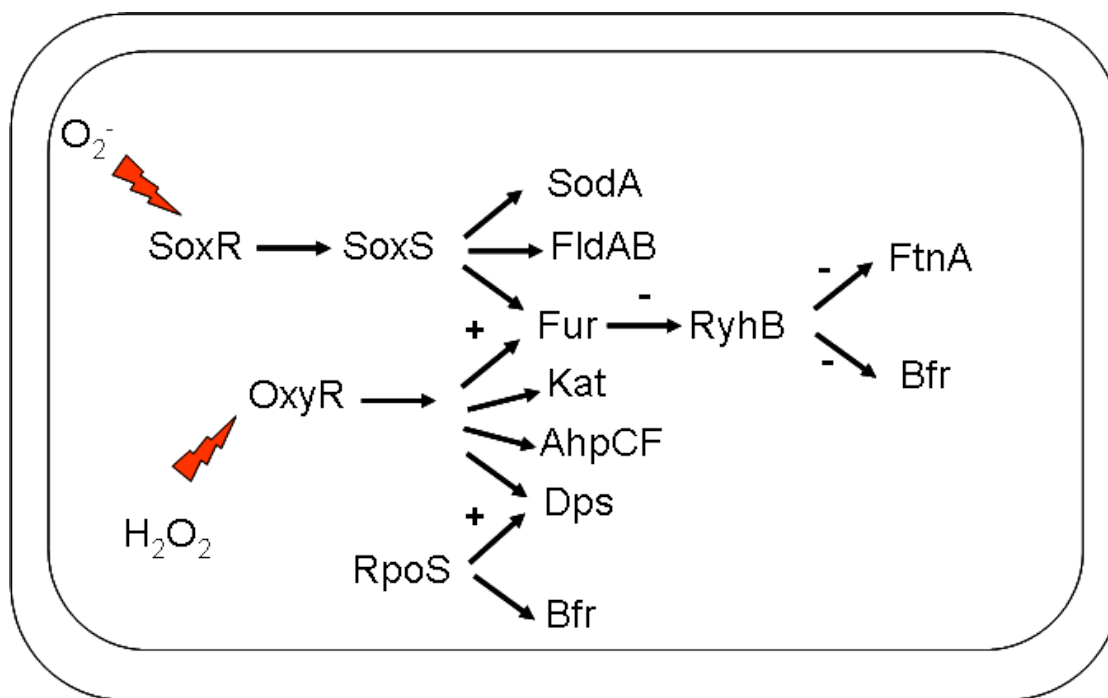


Figure 32 : Couplage du contrôle du stockage du fer et du stress oxydant chez *E. coli*.



# **Matériel et Méthodes**

Bactéries	Génotype	Phénotype	Source
<u><i>E. coli</i></u>			
DH5α	<i>supE44ΔlacUI169(Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>		Sambrook et al., 1989
<u><i>E. chrysanthemi</i></u>			
3937	sauvage		Collection du laboratoire
<i>ftnA</i> <sup>-</sup>	<i>ftnA ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Ftn <sup>-</sup>	Ce travail
<i>bfr</i> <sup>-</sup>	<i>bfr ::Ω Km<sup>R</sup></i>	Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>dpsI</i> <sup>-</sup>	<i>dpsI ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	DpsI <sup>-</sup>	Ce travail
<i>ftnA</i> <sup>-</sup> <i>bfr</i> <sup>-</sup>	<i>ftnA ::Ω Spec<sup>R</sup> bfr ::Ω Km<sup>R</sup></i>	Ftn <sup>-</sup> Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>bfd</i> <sup>-</sup>	<i>bfd ::apha3 Km<sup>R</sup></i>	Bfd <sup>-</sup>	Ce travail
$\Delta$ <i>ryhB</i>	$\Delta$ <i>ryhB ::Ω Spec<sup>R</sup></i>		Ce travail
<i>rpoS</i> <sup>-</sup>	<i>rpoS ::Ω Cm<sup>R</sup></i>	RpoS <sup>-</sup>	Reverchon S. (Lyon)
<i>ftnA ::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>ftnA ::uidA Km<sup>R</sup></i>	Ftn <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>bfr ::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i>	Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>rpoS bfr ::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>rpoS ::Ω Cm<sup>R</sup></i>	RpoS <sup>-</sup> Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>rpoS ftnA::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>ftnA ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>rpoS ::Ω Cm<sup>R</sup></i>	RpoS <sup>-</sup> FtnA <sup>-</sup>	Ce travail
<i>fur</i> <sup>-</sup>	fusion transcriptionnelle <i>ftnA ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>rpoS ::Ω Cm<sup>R</sup></i>	Fur <sup>-</sup>	Ce travail
<i>fur</i> <sup>-</sup> <i>ftnA ::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>ftnA ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>rpoS ::Ω Cm<sup>R</sup></i>	Fur <sup>-</sup> Ftn <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>fur</i> <sup>-</sup> <i>bfr ::uidA</i>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>fur ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Fur <sup>-</sup> Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>acs<sub>37</sub> fct</i>	fusion transcriptionnelle <i>ftnA ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>fur ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Acs <sup>-</sup> Fct <sup>-</sup>	Ce travail
<i>acs<sub>37</sub> cbs<sub>E</sub></i>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>fur ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Acs <sup>-</sup> Cbs <sup>-</sup>	Ce travail
<i>acs<sub>37</sub> fct ftnA</i> <sup>-</sup>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>fur ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Acs <sup>-</sup> Cbs <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>acs<sub>37</sub> cbs<sub>E</sub> bfr</i> <sup>-</sup>	fusion transcriptionnelle <i>bfr ::uidA Km<sup>R</sup></i> dans mutant <i>fur ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Ftn <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>fct ::lacZ</i>	<i>acs<sub>37</sub> Cm<sup>R</sup> fct<sub>34</sub> Km<sup>R</sup></i>	Acs <sup>-</sup> Cbs <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>acsA ::lacZ</i>	<i>acs<sub>37</sub> Cm<sup>R</sup> cbsE::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Bfr <sup>-</sup>	Ce travail
<i>ftnA</i> <sup>-</sup> <i>acsA::lacZ</i>	<i>acs<sub>37</sub> Cm<sup>R</sup> fct<sub>34</sub> Km<sup>R</sup> ftnA::Ω Spec<sup>R</sup></i>	Fct <sup>-</sup>	Ce travail
<i>ftnA</i> <sup>-</sup> <i>fct::lacZ</i>	<i>acs<sub>37</sub> Cm<sup>R</sup> cbsE::Ω spec<sup>R</sup> bfr::Ω Km<sup>R</sup></i>	Acs <sup>-</sup>	Ce travail
<i>expR</i> <sup>-</sup>	L <sub>2</sub> lac <sup>-</sup> , fusion transcriptionnelle <i>fct ::lacZ34</i>	Ftn <sup>-</sup> Acs <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<i>canR</i> <sup>-</sup>	L <sub>2</sub> lac <sup>-</sup> , fusion transcriptionnelle <i>acsA ::lacZ</i>	Ftn <sup>-</sup> Fct <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
	fusion transcriptionnelle <i>acsA ::lacZ</i> dans mutant <i>ftnA ::Ω Spec<sup>R</sup></i>	ExpR <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
<u>Phages</u>		CanR <sup>-</sup>	Collection du laboratoire
PhiEC2	fusion transcriptionnelle <i>fct ::lacZ</i> dans mutant <i>ftnA ::Ω Spec<sup>R</sup></i>		Ce travail
	<i>ftnA ::Ω Spec<sup>R</sup></i>		Ce travail
	<i>expR ::Ω Sm<sup>R</sup></i>		Collection du laboratoire
	<i>canR ::Ω Cm<sup>R</sup></i>		Collection du laboratoire
	Phage à transduction généralisée d' <i>E. chrysanthemi</i>		Collection du laboratoire

Résibois et al., 1984

Tableau 2 : Liste des souches bactériennes, des mutants et phage utilisés au cours de ce travail.

## I- Techniques de microbiologie

### A. Souches et milieux

Les différentes souches d'*E. chrysanthemi* et d'*E. coli* utilisés dans ce travail sont répertoriés dans le tableau 2. Les souches d'*E. chrysanthemi* sont cultivées à 30°C sous agitation en milieu riche L ou en milieu minimum Tris pauvre en fer et supplémenté en glucose à 0,2 % comme source de carbone. A partir d'une préculture en milieu L, les cultures des différentes souches sont réalisées par ensemencement d'un facteur 1/100 ou 1/50 dans du milieu L ou milieu minimum Tris respectivement. La composition des différents milieux de culture utilisés est donnée dans le tableau 3. Un antibiotique est ajouté dans le milieu de culture si nécessaire à une concentration finale de 20 µg/mL pour la kanamycine et la spectinomycine. Les souches d'*E. coli* sont cultivées à 37°C sous agitation en milieu L. En fonction des souches d'*E. coli*, un antibiotique est ajouté dans le milieu de culture afin d'exercer la pression de sélection nécessaire au maintien des plasmides. L'ampicilline est ajoutée à 100 µg/mL final pour les constructions plasmidiques pGEM<sup>®</sup>-T Easy, et le chloramphénicol à 40 µg/mL pour les constructions plasmidiques pBC-SK<sup>+</sup>. Pour leur conservation les souches d'*E. chrysanthemi* et *E. coli* sont cultivées pendant une nuit dans du milieu L à température appropriée puis la culture est diluée de moitié dans du glycérol 80% et congelée à -80°C.

### B. Préparation des bactéries compétentes

#### 1. Préparation des bactéries compétentes d'*E. coli* DH5α

Une culture d'*E. coli* DH5α est ensemencée au 1/100<sup>ième</sup> dans milieu L à partir d'une préculture de nuit et incubée à 37°C sous agitation. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,3, les cellules sont récoltées par centrifugation pendant 11 minutes à 5000 rpm à 4°C et remises en suspension dans ½ volume de CaCl<sub>2</sub> 0,1M froid. Après incubation 40 min dans la glace, les cellules sont de nouveau centrifugées puis suspendues dans 1/100<sup>ième</sup> de CaCl<sub>2</sub> 0,1M froid. Les cellules sont alors incubées au moins 15 min à 4°C puis elles sont directement utilisées pour la transformation.

Tableau 3 : Composition des différents milieux utilisés dans ce travail.

Milieu riche L

Bacto-tryptone	10 g/L
Bacto-yeast extract	5 g/L
NaCl	5 g/L

Milieu minimum Tris

Tris	12,1 g/L
NaCl	5,8 g/L
KCl	3,7 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g/L
MgCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,142 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,272 g/L

Milieu LA gélosé LA 15

Milieu L	1 L
Agar	15 g

Milieu LA gélosé LA 12

Milieu L	1 L
Agar	12 g

Milieu Low phosphate

Tris	12,1 g/L
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/L
Citrate de sodium	0,5 g/L
Tampon phosphate de potassium pH7	250 µM
Glycérol	0,1%
FeCl <sub>3</sub>	10 µM

Milieu TA7 gélosé

Bacto-tryptone	10 g/L
NaCl	2,5 g/L
Agar	5,6 g/L

## 2. Préparation des bactéries d'*E. chrysanthemi*

300  $\mu$ L d'une préculture bactérienne de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* sont ensemencés dans 30 mL de milieu L. Les bactéries sont cultivées à 30°C sous agitation jusqu'à  $DO_{600}$  comprise entre 0,3 et 0,4. Les cellules sont récoltées par une centrifugation de 12 min à 5000 rpm à 4°C (centrifugeuse Sorvall Instruments RC5C). Le culot cellulaire est lavé successivement trois fois dans le même volume d'eau à 4°C. Après une dernière centrifugation de 12 min à 5000 rpm, le culot est suspendu dans 200  $\mu$ L d'eau à 4°C. Les bactéries sont prêtes à être transformées.

### C. Transformation bactérienne

#### 1. Transformation des bactéries d'*E. coli* DH5 $\alpha$

Les cellules thermocompétentes sont incubées 20 min dans la glace avec l'ADN à transformer. Le volume maximal de mélange de ligature est de 1/20<sup>ième</sup>. Les cellules compétentes sont soumises à un choc thermique à 42°C pendant 1 min, puis à 4°C. 900  $\mu$ L de milieu L sont ajoutés aux cellules bactériennes. Après 1 h d'incubation à 37°C sous agitation pour permettre l'expression des cassettes de résistance aux antibiotiques, les cellules sont étalées sur milieu solide L agar X-gal (40 $\mu$ g/mL) + IPTG (250 $\mu$ g/mL) en présence de l'antibiotique approprié à la sélection de la construction plasmidique.

#### 2. Transformation des bactéries d'*E. chrysanthemi*

Les cellules d'*E. chrysanthemi* sont transformées par électroporation. Les cellules compétentes sont mises en présence de l'ADN à transformer. Le volume maximal de mélange de ligature ajouté ne doit pas dépasser 1/100<sup>ième</sup> du volume de bactéries compétentes. Si nécessaire une étape préalable de précipitation à l'éthanol et acétate de sodium a été réalisée pour concentrer l'ADN. Le mélange est incubé 10 min à 4°C puis transféré dans une cuve à électroporation préalablement refroidie. L'électroporation est effectuée avec un appareil de type Biorad Gene Pulser à 2,5 kV, 25  $\mu$ F et 200  $\Omega$ . La constante de temps doit être comprise entre 4 et 6 ms. Les cellules sont resuspendues avec 900  $\mu$ L de milieu L. Après 1h d'incubation à 30°C sous agitation, les cellules sont étalées sur milieu solide L agar additionné du ou des antibiotique(s) approprié(s) et incubées à 30°C.

#### D. Transduction bactérienne

Les différents mutants de ce travail sont obtenus par transduction généralisée grâce au phage  $\Phi$ EC2 (Résibois et *al.*, 1984, tableau 2). Un lysat de phages est préparé en déposant des gouttes de 15  $\mu$ L de suspension de phages sur milieu solide LA12 recouvert d'une couche de TA7ensemencée avec 0,1 mL d'une culture de nuit de la souche bactérienne « donneuse » permissive et en incubant au moins 8 h à 30°C. Une plage de lyse est collectée et suspendue dans 1 mL d'une culture de nuit de la souche bactérienne donneuse, puis 4 mL de milieu L ont été ajoutés à la suspension. Cinq parties aliquotes de 1 mL de ce mélange sont incorporées dans 3 mL de TA7 fondu et étalées sur boîte d'agar LA12 en utilisant la méthode de double couche. Après 15 heures d'incubation, la plage de lyse est collectée sur toute la surface de la boîte et du chloroforme est ajouté à raison de 0,5 % final. Après deux centrifugations successives à 9000 rpm pendant 35 min (centrifugeuse Sorvall Instruments RC5C), le surnageant est récupéré et utilisé comme lysat de transduction. Pour la transduction, 200  $\mu$ L de différentes dilutions du lysat sont mélangés avec 200  $\mu$ L d'une culture de nuit de la souche réceptrice mutante d'*E. chrysanthemi*. Le mélange est ensuite incorporé dans 3 mL de milieu TA7 fondu et coulé sur boîte de milieu LA12 additionné de l'antibiotique approprié (marqueur de sélection de la mutation à transduire). Les boîtes sont incubées à 30°C et les transductants sont sélectionnés, purifiés et leurs phénotypes sont vérifiés.

#### E. Dénombrement bactérien

Les numérations bactériennes ont été effectuées sur milieu LA gélosé avec l'antibiotique approprié. Des dilutions de la suspension cellulaire sont faites dans du NaCl 9 ‰ de dix en dix jusqu'à  $10^{-7}$ . Les dilutions adéquates sont étalées avec des billes en verre sur des boîtes de milieu LA qui sont placées à 30°C. Les dénombrements sont réalisés manuellement.

## F. Caractérisation physiologique des souches

Pour chaque type d'expérience, les manipulations ont été répétées au moins trois fois indépendamment, mais seule une manipulation représentative est présentée dans la partie « Résultats ».

### 1. Sensibilité au stress oxydant

La sensibilité des différentes souches au stress oxydant est testée pour la paraquat qui génère des anions superoxyde, pour la streptonigrine qui produit des radicaux hydroxyles, pour le peroxyde d'hydrogène et pour la spermine NONOate qui produit du monoxyde d'azote NO. A partir d'une préculture de la souche bactérienne en milieu L, 200  $\mu$ L sontensemencés dans 20 mL de milieu L. Les souches d'*E. chrysanthemi* 3937 sont ainsi cultivées à 30°C sous agitation. 1,5  $\mu$ g/mL de streptonigrine (Fluka), 0,3 mM de peroxyde d'hydrogène (Acros) ou 70  $\mu$ M de spermine NONOate (Sigma) est ajouté à la culture bactérienne dès le début de l'expérience. Le paraquat (Sigma) est apporté à la culture bactérienne 1 h après le début de l'expérience à une concentration finale de 6  $\mu$ M. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) toutes les 60 min avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5. Au-delà d'une valeur de  $DO_{600}$  de 0,8, une dilution est réalisée dans du milieu de culture stérile avant de mesurer la densité optique.

### 2. Sensibilité à la carence en fer

La sensibilité des différentes souches à la carence en fer est évaluée par ajout de 2,2'-dipyridyl ou EDDHA dans la culture bactérienne. Le 2,2'-dipyridyl chélate le fer ferreux intracellulaire alors que l'EDDHA chélate le fer ferrique extracellulaire. A partir d'une préculture de la souche bactérienne en milieu L, 200 ou 400  $\mu$ L sontensemencés dans 20 mL de milieu L ou Tris respectivement. Le 2,2'-dipyridyl (Sigma) est ajouté à raison de 200  $\mu$ M final dans la culture bactérienne en milieu L et 100  $\mu$ M dans la culture en milieu Tris. 100  $\mu$ M et 37  $\mu$ M d'EDDHA (Sigma) sont ajoutés à la culture bactérienne en milieu L et Tris respectivement. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la  $DO_{600}$  toutes les 60 min avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5. Au-delà d'une valeur de  $DO_{600}$  de 0,8, une dilution est réalisée dans du milieu de culture stérile avant de mesurer la densité optique.

### 3. Complémentation nutritionnelle

Des essais de complémentation nutritionnelle ont été réalisés sur boîtes comportant 10  $\mu\text{L}$  d'une culture de nuit des mutants *acs<sub>37</sub> fct fnA* et *acs<sub>37</sub> cbsE bfr* ne produisant plus les sidérophores achromobactine et chrysobactine et des souches référencesensemencées dans 20 mL de milieu L agar additionné de 100  $\mu\text{M}$  EDDHA ou 200  $\mu\text{M}$  de 2,2'-dipyridyl. Des disques d'environ 6 mm de diamètre sur lesquels ont été déposés 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hème 1 mM, d'achromobactine ferrée 100  $\mu\text{M}$  et de  $\text{FeCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  ont été placés sur la surface de l'agar. Le diamètre des halos de croissance a été mesuré après 24 h d'incubation à 30°C.

### 4. Test du pouvoir pathogène

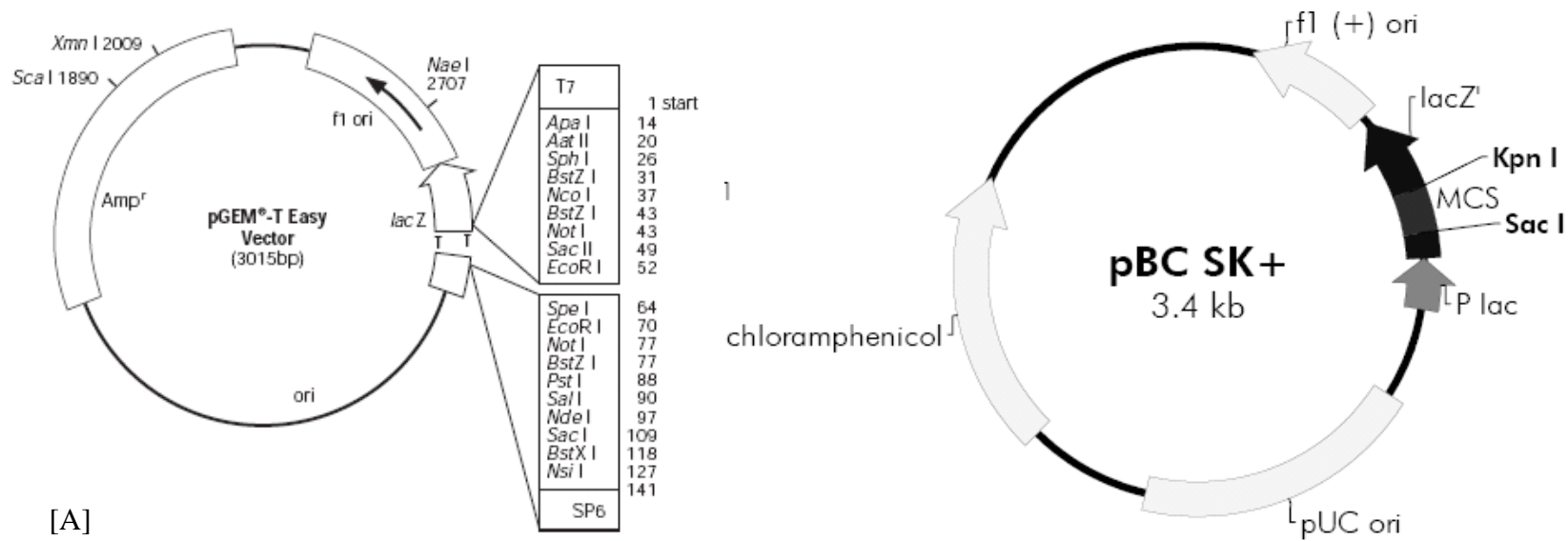
#### - sur endive

Le test de virulence sur feuilles d'endives a été réalisé à partir de bactéries cultivées sur milieu solide LA15 à 30°C pendant 24 h. Les cellules bactériennes sont suspendues dans une solution de NaCl à 9 g/L afin d'obtenir une  $\text{DO}_{600}$  finale de 0,4. Une feuille d'endive est inoculée par 4  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne précédemment préparée avec un pipetman. Les feuilles d'endives sont réparties sur des plateaux et conservées en chambre tropicale avec 60% d'humidité et des cycles jour 16 h à 29°C/nuit 8 h à 27°C. La progression des symptômes est observée quotidiennement pendant trois jours.

#### - sur saintpaulia

Les différentes souches bactériennes sont cultivées sur milieu L solide à 30°C pendant 24 h. Les cellules bactériennes sont suspendues dans une solution de NaCl à 9 g/L afin d'obtenir une  $\text{DO}_{600}$  finale de 0,4. Une feuille par plante a été inoculée par infiltration avec 100  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne résultante à l'aide d'une seringue. Les plantes de saintpaulia sont gardées en chambre de culture dans des conditions tropicales humides. Le taux d'humidité y est de 60% avec un cycle jour 16 h à 29°C et nuit 8 h à 27°C. Les symptômes sont suivis quotidiennement pendant au moins une semaine.





**pBC SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
(sequence shown 598-826)

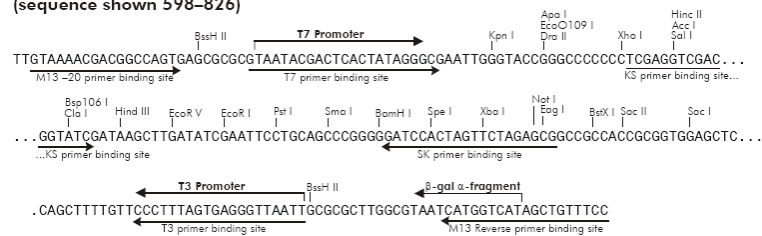


Figure 33 : Carte génétique des plasmides pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) [A] et pBC-SK<sup>+</sup> (Stratagene) [B] utilisés dans ce travail.

## II- Techniques de biologie moléculaire

### A. Plasmides

La totalité des plasmides utilisés au cours de ce travail est mentionnée dans le tableau ci-dessous.

Plasmide	Taille	Caractéristiques	Source
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	3 kb	Amp <sup>R</sup> , clonage des produits PCR	Promega
pBC-SK <sup>+</sup>	3,4 kb	Cm <sup>R</sup>	Stratagene
pUIDK1	6,4 kb	Cassette <i>uidA</i> Km <sup>R</sup>	Bardonnnet et Blanco, 1992
pHP45Ω	4,3 kb	Interposon ΩSpec <sup>R</sup> ou Km <sup>R</sup>	Fellay et al., 1987
pUC18K	3,5 kb	Amp <sup>R</sup> , gène <i>aphA3</i> Km <sup>R</sup> , mutation non polaire	Ménard et al., 1993

Tableau 4 : Liste des plasmides utilisés au cours de ce travail.

#### 1. Plasmide pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Le plasmide pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), présenté sur la figure 33 [A], a été utilisé pour le clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR avec la Taq polymérase (Invitrogen) qui génère des extrémités A débordantes du côté 3'. La forme commerciale de ce plasmide est linéaire et possède des extrémités 5' T débordantes au niveau du site d'insertion. Il se réplique à un haut nombre de copies chez *E. coli* (50 copies par cellule). Il possède deux origines de réplication : celle du phage f1 et celle d'*E. coli*. Il porte une cassette multisite de clonage située en amont d'une portion du gène *lacZ* codant la β-galactosidase. Le fragment du gène *lacZ* porté par le plasmide complémente la délétion du gène *lacZ* appelée M15. Cette mutation M15 élimine les acides aminés 14 à 44 de la β-galactosidase, ce qui l'inactive. Ainsi, si le plasmide est introduit dans une souche de génotype *lacZΔM15* synthétisant une β-galactosidase inactive, il rétablit la synthèse d'une enzyme active par α-complémentation. En présence du substrat chromogène de la β-galactosidase, l'X-gal et d'un inducteur de l'opéron lactose, l'IPTG, les colonies possédant le vecteur sans insert apparaissent bleues alors que les clones avec insert resteront blancs, la complémentation n'étant plus possible. Ce plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline qui a été utilisé comme marqueur de sélection.

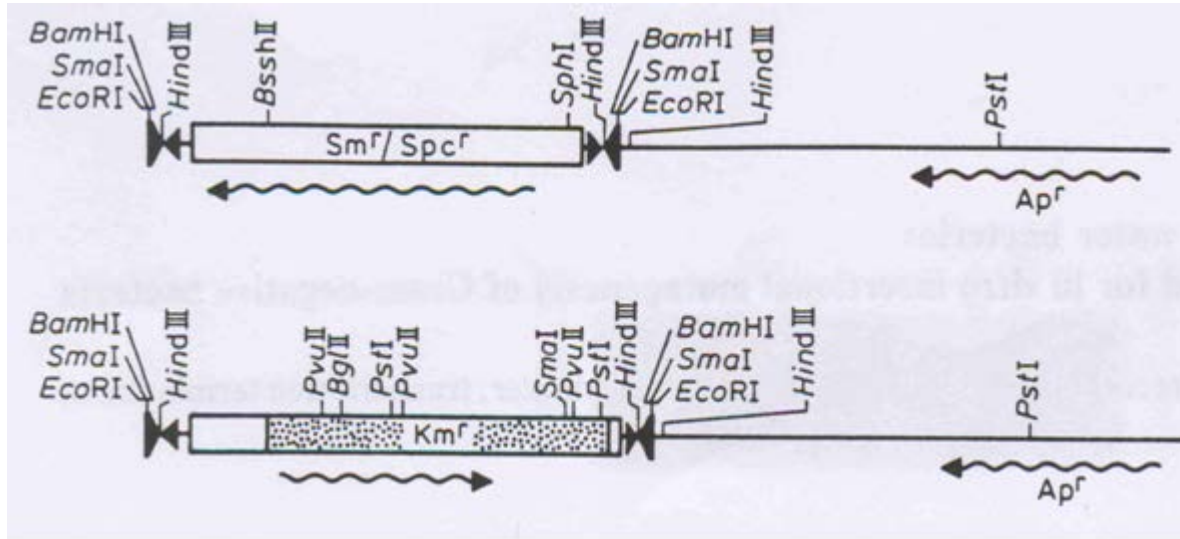


Figure 34 : Carte de restriction des plasmides pHP45 Ω Spec<sup>R</sup> et pHP45 Ω Km<sup>R</sup> (Fellay et al., 1987).

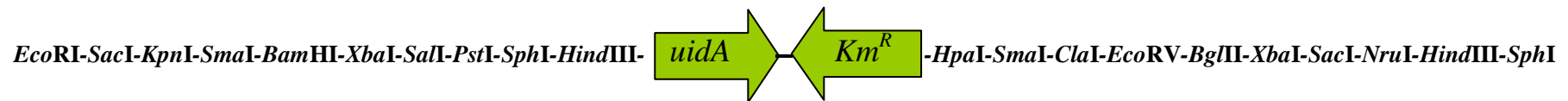


Figure 35 : Carte de restriction de la cassette *uidA* provenant du plasmide pUIDKI (Amp<sup>R</sup>) (Bardonnet et Blanco, 1992).

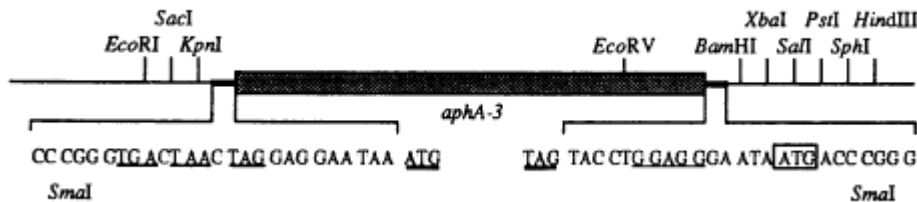


Figure 36 : Carte de la cassette *aphA3* conférant la résistance à la kanamycine et permettant la construction de mutations non polaires présent sur le plasmide pUC18K (Ménard et al., 1993).

## 2. Plasmide pBluescript-SK<sup>+</sup>

Le plasmide commercial pBC-SK<sup>+</sup> (Stratagene) est présenté sur la figure 33 [B]. Ce vecteur a été utilisé pour faire les constructions plasmidiques afin d'interrompre les gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1*. Il possède deux origines de réplication : celle du bactériophage f1 et celle d'*E. coli*. Il possède un fragment du gène codant la β-galactosidase complétant la délétion du gène *lacZ* de la souche *lacZΔM15* d'*E. coli*. Il est ainsi possible de faire un criblage blanc-bleu pour sélectionner les clones blancs présentant un insert. Ce vecteur contient le gène de résistance au chloramphénicol qui a été utilisé comme marqueur de sélection.

## 3. Plasmides pHP45ΩSpec<sup>R</sup> et pHP45ΩKm<sup>R</sup>

Les plasmides pHP45ΩSpec<sup>R</sup> et pHP45ΩKm<sup>R</sup> font respectivement 4,3 et 4,5 kb (figure 34) et comportent le gène de résistance à l'ampicilline. Ils contiennent un interposon Ω (Prentki and Krisch, 1984) avec le gène de résistance à la spectinomycine ou la kanamycine pour les plasmides pHP45ΩSpec<sup>R</sup> et pHP45ΩKm<sup>R</sup> respectivement. Ils ont été utilisés pour interrompre les différents gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1* car ils comportent également des signaux d'arrêt de traduction et d'arrêt de transcription.

## 4. Plasmide pUIDKI

Le plasmide pUIDKI, présenté sur la figure 35, a été utilisé pour construire des fusions transcriptionnelles *ftnA::uidA* et *bfr::uidA*. Il comporte le gène de résistance à la kanamycine.

## 5. Plasmide pUC18K

Le plasmide pUC18K a été utilisé pour faire une mutation non polaire dans le gène *bfd*. Il contient le gène *aphA3* conférant la résistance à la kanamycine qui est précédé par des codons d'arrêt de la traduction dans les trois phases de lecture et est suivi d'un site RBS et d'un codon d'initiation de la traduction (figure 36).

Amorces	Séquence 5'-3'	Site de restriction	Tm	Description
ftnA1s	5'-gctgcgtatggttattttctg-3'		60°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>ftnA</i> (1,3kb) avec son promoteur
ftnA1r	5'-gaaataatcggcgtgtatcc-3'		58°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>ftnA</i> (1,3 kb) avec son promoteur
ftnA2s	5'-ccatcagtcacctgccagtaa-3'		64°C	amplification du gène <i>ftnA</i> pour une sonde pour Northern-blot
ftnA2r	5'-ggataatcagccgccagcaa-3'		66°C	amplification du gène <i>ftnA</i> pour une sonde pour Northern-blot
ftnAel	5'-caggtataaattggcggagt-3'		58°C	extension d'amorce
bfr1s	5'-ggtcgtgtagagcgcggca-3'		64°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>bfr</i> (1,5 kb) avec son promoteur
bfr1r	5'-cagtacataacccccatat-3'		54°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>bfr</i> (1,5 kb) avec son promoteur
bfr2s	5'-aaatgagttatcccatatgt-3'		56°C	amplification du gène <i>bfr</i> pour une sonde pour Northern-blot
bfr2r	5'-cgcagcgaatgacgggtgaaa-3'		66°C	amplification du gène <i>bfr</i> pour une sonde pour Northern-blot
bfre1	5'-gtgctgacgaacgacctgctg-3'		68°C	extension d'amorce
dps1s	5'-attatgcctcgtctgggca-3'		60°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>dps1</i> (1,5kb) avec son promoteur
dps1r	5'-catcaaaacgctctctc-3'		56°C	amplification d'un fragment contenant le gène <i>dps1</i> (1,5kb) avec son promoteur
dps2s	5'-agaaataaaggataataact-3'		52°C	amplification du gène <i>dps1</i> pour une sonde pour Northern-blot
dps2r	5'-ccgccggtcatcattgatgaa-3'		64°C	amplification du gène <i>dps1</i> pour une sonde pour Northern-blot
dpsel1	5'-ctgttttaccagtttggc-3'		50°C	extension d'amorce
dpsel2	5'-gaaaataagatcagcggagc-3'		60°C	extension d'amorce
ryhB1s	5'-gtggaccgctatacgt-3'		58°C	amplification du fragment ryhB1 situé en 5' du gène <i>ryhB</i>
ryhB1r	5'-cgcggatccgatgagtcacaaggatg-3'	<i>Bam</i> HI	58°C	amplification du fragment ryhB1 situé en 5' du gène <i>ryhB</i>
ryhB2s	5'-agcggatcctggttcctattgttg-3'	<i>Bam</i> HI	52°C	amplification du fragment ryhB2 situé en 3' du gène <i>ryhB</i>
ryhB2r	5'-tccaaaaccctgtccgcc-3'		58°C	amplification du fragment ryhB2 situé en 3' du gène <i>ryhB</i>
rpoS1s	5'-atcacggtaggagccactta-3'		64°C	amplification du gène <i>rpoS</i> pour une sonde pour Northern-blot
rpoS1r	5'-ttattgctgagttattcgcg-3'		60°C	amplification du gène <i>rpoS</i> pour une sonde pour Northern-blot

Tableau 5 : Liste des amorces oligonucléotidiques utilisées au cours de ce travail. Les amorces oligonucléotidiques sont données dans le sens 5'→3'. L'annotation s ou r désigne l'orientation des amorces directe ou inverse respectivement. Les sites de restriction ajoutés dans les amorces sont soulignés.

## B. PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne sont réalisées avec un thermocycleur Hybaid PCR Express. Le mélange réactionnel est constitué de 1 à 1,5 ng d'ADN chromosomique matrice,

de 0,25  $\mu\text{M}$  de chacun des deux oligonucléotides, de 5  $\mu\text{L}$  de tampon 10X, de 200  $\mu\text{M}$  de dNTP et de 1,25 unités de Taq polymérase (5U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen) dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$ .

La liste des amorces nucléotidiques utilisées lors de ce travail est présentée dans le tableau 5. Les amorces nucléotidiques sont fournies par la société Invitrogen. Les températures d'hybridation ( $T_m$ ) sont calculées selon la formule théorique suivante  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$  où A, T, C et G représentent le nombre de chacune des bases dans l'amorce considérée.

Le programme d'amplification utilisé est adapté à chaque PCR, toutefois, il comprend une partie commune de dénaturation de la matrice à 94°C pendant 3 min. Une dénaturation de 1 min à 94°C précède la phase d'hybridation des amorces à l'ADN matrice. La température d'hybridation est déterminée en fonction du  $T_m$  des deux amorces, en général deux degrés inférieurs au  $T_m$  le plus bas. L'étape d'amplification de l'ADN est ensuite effectuée à 72°C et le temps d'amplification est choisi en fonction de la longueur du fragment à amplifier à raison de 1 min d'élongation par kilobase à synthétiser. Les phases de dénaturation, d'hybridation et d'amplification de l'ADN sont répétées 30 fois. Le programme se termine par une dernière phase d'élongation à 72°C pendant 10 min avant un refroidissement à 4°C.

## C. Purification de fragments d'ADN amplifiés par PCR

Lorsque la PCR a amplifié uniquement le fragment d'ADN désiré, il est possible de le purifier directement à partir du mélange réactionnel. Pour cela, nous avons utilisé le kit de purification de produits de PCR (Wizard PCR Preps, Promega) en suivant les instructions du fournisseur. Le principe est une purification sur résine échangeuse de cations avec une élution à l'aide du tampon d'élution TE. En cas d'une amplification aspécifique, la purification a été réalisée par élution des fragments d'ADN purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose grâce au kit Qiaquick Gel Extraction selon le protocole conseillé. Les produits amplifiés par PCR et purifiés sont prêts à être clonés directement dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

## D. Ligature d'un fragment d'ADN dans un vecteur

Les vecteurs plasmidiques ont été préalablement digérés par des endonucléases de restriction fournies par la société Invitrogen en vue de cloner un fragment d'ADN. Toutes les enzymes ont été utilisées selon les instructions préconisées par le fournisseur. Les digestions ont généralement été effectuées pendant 2 h en utilisant 1 unité d'enzyme pour 100 ng d'ADN. La digestion de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose par comparaison de l'ADN digéré et non digéré. La taille et la quantité d'ADN ont été estimées grâce à un marqueur de taille, 1 kb Ladder (Gibco) pour les molécules d'ADN linéaires.

Parfois, les extrémités 3' débordantes générées suite à la digestion par des enzymes de restriction ont été rendues franches par la T4 DNA polymérase (MBI Fermentas) et le fragment de Klenow (MBI Fermentas) a été utilisé pour combler les extrémités débordantes en 5' selon le protocole conseillé par le fournisseur. Une extraction au phénol-chloroforme est finalement réalisée, et suivie d'une précipitation à l'éthanol.

La réaction de ligature d'un fragment dans un vecteur est effectuée en excès d'insert (3 fois en concentration molaire) par rapport au vecteur. La ligature est assurée par l'ADN ligase du bactériophage T4 (MBI, Fermentas). Le mélange réactionnel est composé des ADN à ligaturer, de 2 µL de tampon 10X, d'1 µL de l'enzyme (5U) et d'eau pour un volume final de 20 µL. Le mélange réactionnel est incubé 4 h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

## E. Extraction d'acides nucléiques

### 1. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique d'*E. coli* a été purifié à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Courtaboeuf, France) à partir de 5 ml d'une culture de nuit. Brièvement, le principe consiste à effectuer une lyse alcaline des cellules, à adsorber l'ADN sur une membrane constituée par un gel de silice, à éliminer les protéines avec des tampons de lavage, et à éluer l'ADN de la colonne avec un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5. La purification est réalisée selon les instructions du fournisseur et permet la préparation rapide de petites quantités d'ADN plasmidique jusqu'à 20 µg. La première étape est une lyse alcaline des cellules bactériennes par du SDS 1% et du NaOH 0,2 M présents dans un tampon contenant par ailleurs du Tris-HCl 50 mM, pH 8, de l'EDTA 10 mM et de la RNase A 100 µg/mL. Le lysat ainsi obtenu est neutralisé par addition d'acétate de potassium 3 M, pH 5,5. Une concentration saline élevée permet la précipitation du SDS, des protéines dénaturées et de l'ADN chromosomique. Elle permet aussi la formation de complexes sels-détergent emprisonnant les débris cellulaires.

L'ADN plasmidique plus petit et de structure fermée peut se renaturer dans ces conditions et reste soluble. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min à température ambiante. La purification de l'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est effectuée par chromatographie d'échange d'anions dans des conditions appropriées de pH et de force ionique. Elle est basée sur les interactions établies entre les groupements phosphate de l'ADN chargés négativement et les groupements portés par la colonne chargés positivement. Le surnageant est appliqué sur la colonne de purification et centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 min, à température ambiante. Après un premier lavage de la colonne avec le tampon PB pour éliminer les endonucléases résiduelles puis un deuxième lavage avec le tampon PE pour se débarrasser des sels, l'ADN plasmidique est élué dans un tampon d'éluion Tris 10 mM pH 8,5.

## 2. Extraction de l'ADN chromosomique

L'ADN total des souches d'*E. chrysanthemi* a été extrait par une méthode simplifiée. Les souches ont été cultivées dans 5 mL de milieu L pendant une nuit à 30°C. Le lendemain, la culture a été centrifugée à 6000 rpm pendant 3 min et le culot cellulaire a été suspendu dans 400 µL de tampon TGE [25 mM Tris HCl, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA pH 8] et incubé 5 min à température ambiante. Du lysozyme a été ajouté à la suspension cellulaire (0,2 mg/ml final) qui a été incubée 10 min à 37°C. Du SDS a été ajouté à une concentration finale de 0,1 % pour provoquer la lyse des protoplastes. Les protéines et débris cellulaires ont été extraits trois fois après ajout d'un volume de phénol/chloroforme et agitation modérée. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min à température ambiante, la phase aqueuse (supérieure) contenant l'ADN a été prélevée, et l'ADN a ensuite été précipité par 2,5 volumes d'éthanol 100% et 1/10<sup>ième</sup> de volume d'acétate de sodium 3M pendant au moins 2 h à -20°C. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 35 min à 4°C, le culot contenant l'ADN a été lavé avec de l'éthanol 70 % (prérefroidi à -20°C), séché, puis suspendu dans du tampon TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; EDTA 1 mM).



### 3. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux d'*E. chrysanthemi* sont extraits par la méthode dite du phénol chaud basée sur la précipitation différentielle de l'ARN et de l'ADN. A partir d'une préculture en milieu L, une culture bactérienne est ensemencée au 1/50 ou 1/100 respectivement en milieu Tris ou L et cultivée sous agitation à 30°C jusqu'à une densité optique à 600 nm désirée. Un volume correspondant à 4 unités de DO<sub>600</sub> est prélevé et centrifugé 10 min à 8000 rpm à 4°C. Le culot de cellules est resuspendu dans 600 µL de tampon A (20 mM acétate de sodium, pH 5,5, 1 mM EDTA) à 4°C. Après ajout de 33 µL SDS 10% et 600 µL de phénol chaud (65°C) équilibré avec du tampon A, l'échantillon est vigoureusement mélangé pendant 30 sec et incubé à 65°C pendant 10 min. La phase aqueuse contenant les ARNs est ré-extraite successivement deux fois avec un mélange de phénol/ chloroforme (1 :1) équilibré avec du tampon Tris 10 mM pH 7,5. Les ARNs sont précipités à -20°C pendant une nuit avec 1/10<sup>ième</sup> de volume d'acétate de sodium 3M et 2,5 volumes d'éthanol. Après centrifugation à 13000 rpm 30 min à 4°C, le culot d'ARN est lavé avec de l'éthanol 70% et resuspendu dans 45 µL d'eau traitée avec du DEPC. La qualité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et la quantité d'ARN est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

### F. Extension d'amorce

Les sites d'initiation de la transcription des différents gènes étudiés ont été identifiés par des expériences d'extension d'amorce. Les amorces utilisées dans ce travail sont répertoriées dans le tableau 5. La première étape est le marquage radioactif de l'amorce avec du [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>] grâce à l'enzyme T4 polynucléotide kinase (MBI Fermentas). Le mélange réactionnel comporte 10 pmoles d'amorce, 1µL de tampon kinase 10X, 5U de T4 polynucléotide kinase et 10 pmoles de [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]. La réaction est menée 30 min à 37°C. L'enzyme est ensuite inactivée par chauffage à 70°C pendant 10 min. Une précipitation à l'éthanol est réalisée et le culot est suspendu dans 40 µL d'eau. L'élongation est réalisée à partir d'un mélange de 5 µg d'ARN totaux avec 0,1 à 0,2 pmoles d'amorce marquée repris dans un volume final de 12 µL avec de l'eau. Le mélange est dénaturé par incubation à 70°C pendant 5 min et refroidi dans la glace. La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée à l'aide du kit RevertAid H minus First Strand cDNA synthesis (MBI Fermentas) selon les instructions du fournisseur. Les échantillons sont déshydratés au Speed-Vac pendant environ 10 min et le culot est repris dans 4 µL d'eau traité au DEPC et 6 µL de tampon stop de dépôt. Les produits d'extension sont déposés et séparés sur un gel de séquence d'ADN à 5 % d'acrylamide-

bisacrylamide 19:1. Un marqueur de taille est obtenu en séquençant le plasmide pUC19 avec l'amorce M13 - 46 (22 mer forward). La révélation se fait par la méthode classique d'autoradiographie.

## G. Electrophorèse en gel d'agarose

### 1. Electrophorèse d'ADN

Les électrophorèses d'ADN ont été réalisées en gel d'agarose (Sigma) à une concentration de 0,8% pour les fragments de plus de 1 kb, préparé dans du tampon Tris Borate EDTA (Euromedex) [Tris 89 mM, EDTA 2 mM, acide borique 89 mM, pH 8,3]. Du tampon de dépôt composé de Bleu de bromophénol (0,1 %), de glycérol (40 %) et de xylène cyanol (0,1 %) dans du tampon TBE et concentré 5 fois est ajouté à l'échantillon à raison de 1 volume de tampon de dépôt pour 5 volumes d'échantillon. Après dépôt des échantillons dans les puits, la migration de l'ADN est effectuée en tampon TBE 1X à 80 V pendant 1h à 2h. L'ADN est visualisé, grâce à du BET (10 mg/ml ; ROTH) agent intercalant de l'ADN. Le gel d'agarose est coloré dans un bain de BET à une concentration finale de 1 µg/mL et est finalement observé sous rayonnements ultraviolets. La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison de leur migration électrophorétique à celle d'un standard de molécules d'ADN linéaire de taille connue. Le marqueur de taille Ladder 1kb Gibco est utilisé. Il contient 22 fragments de taille comprise entre 75 et 12 000 pb.

### 2. Electrophorèse d'ARN

Les électrophorèses d'ARN ont été réalisées en conditions dénaturantes pour éliminer les structures secondaires éventuelles (Sambrook et *al.*, 1989). Les échantillons d'ARN à raison de 3 µg sont dilués dans un volume final de 14 µL et dénaturés par incubation pendant 10 min à 65°C en présence de 4% formaldéhyde, 45% formamide, 0,02 mg/mL BET et 1X MOPS puis ils sont refroidis dans la glace. La solution mère de MOPS est concentrée 10 fois et est préparée avec 200 mM MOPS, 50 mM acétate de sodium, 10mM EDTA et 10 mM EGTA. Les échantillons sont repris avec 6 µl de tampon de charge [1mM EDTA, glycérol 50 %, bleu de bromophénol 0,6 %, cyanol de xylene 0,6%] et déposés sur un gel d'agarose à 1% (Sigma) contenant 7,2 % de formaldéhyde [1X MOPS, 7,2% formaldéhyde]. La migration s'effectue dans du tampon MOPS 1X à 100 V pendant 3 h. Pour évaluer la taille des ARN, nous avons utilisé le marqueur à RNA RiboRuler RNA Ladder High Range 200 – 6000 bases (MBI

Fermentas). L'utilisation de 4  $\mu$ l de RNA Ladder par gel équivaut à une quantité de 120 ng de chaque ARN. Avant le dépôt sur gel, le marqueur de taille subit, tout comme les échantillons, l'étape de dénaturation décrite ci-dessus.

### 3. Dosage de l'ADN et ARN

Lorsque les concentrations en acides nucléiques sont faibles, la concentration en ADN est estimée par électrophorèse en gel d'agarose par comparaison de l'intensité de la bande correspondante avec celle d'un marqueur de taille de concentration connue. Pour quantifier de l'ADN plasmidique, une linéarisation par une enzyme de restriction, qui ne présente qu'un site de coupure dans le vecteur, est préalablement réalisée.

Lorsque la concentration en acides nucléiques (ADN ou ARN totaux) est élevée, la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm (spectrophotomètre Beckman DU640B). Une absorbance de 1 à 260 nm correspond à une concentration d'environ 50  $\mu$ g/mL d'ADN double brin ou 40  $\mu$ g/mL d'ARN. Une lecture à 280 nm est également effectuée pour estimer la contamination en protéines de la solution d'acides nucléiques. Le rapport  $A_{260}/A_{280}$  permet d'estimer la pureté des acides nucléiques. Un extrait est considéré pur si ce rapport est compris entre 1,8 et 2. Si ce rapport est inférieur à 1,8, la solution d'acides nucléiques est contaminée par des protéines.

## H. Transfert de Northern et hybridation

### 1. Transfert à proprement dit

3  $\mu$ g d'ARN sont déposés sur un gel d'agarose 1% contenant 7,2 % de formaldéhyde et séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Après migration, les ARN sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech) en utilisant du SSC 10X comme tampon de transfert. La solution mère de SSC est concentrée 20 fois et est composée de 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de sodium pour 1L de solution. Après une nuit de transfert, la membrane est rincée avec du SSC 2X et séchée à température ambiante. Les ARN sont ensuite fixés de manière irréversible à la membrane par exposition aux UV pendant 5 min. La membrane est conservée à 4°C en attendant d'être hybridée par la sonde radiomarquée.

## 2. Préparation d'une sonde radioactive

L'hybridation a été réalisée avec une sonde correspondant à la phase codante du gène étudié amplifié par PCR et purifié à l'aide du kit Wizard PCR Preps (Promega). La sonde est marquée avec du [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP selon le protocole du kit Prime-a-gene labeling system (Promega). 50 ng de fragment amplifié par PCR sont dilués dans un volume final de 30  $\mu$ L, dénaturés 3 min à 95°C et conservés dans la glace quelques minutes. Pour le marquage, l'ADN dénaturé est incubé avec 2  $\mu$ L d'un mélange de dCTP, dGTP, dTTP (1 nmole de chacune, en proportion 1 : 1 : 1), 2  $\mu$ L de BSA, 5  $\mu$ L soit 50  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP et 1  $\mu$ L de l'ADN polymérase I. La source de [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP est conditionnée à raison de 3000 Ci/mmole par Perkin Elmer. Le mélange réactionnel est incubé environ 1H à température ambiante pour permettre la réaction de synthèse. La réaction est stoppée par ajout de 4  $\mu$ L EDTA 0,5 M, puis la sonde est purifiée sur colonne à l'aide du kit Nick columns Sephadex G-50 DNA Grade (Amersham) pour éliminer les nucléotides radiomarqués non incorporés. Pour finir, la sonde est dénaturée 4 min à 95°C et conservée dans la glace jusqu'à son incorporation dans le tampon d'hybridation.

## 3. Hybridation et révélation

Après la fixation des ARNs sur la membrane, cette dernière est incubée à 65°C avec 15 mL de tampon d'hybridation [SSPE 5X, SDS 0,2%, ADN de sperme de hareng 250  $\mu$ g/mL et solution de Denhardt's 5X]. La solution mère de Denhardt est concentrée 50 fois et comprend 5 g de Ficoll, 5 g de polyvinylpyrrolidone, 5g de BSA pour 500 mL de solution. Quant à la solution mère de SSPE, elle est concentrée 20 fois et est composée de 175,3 g de NaCl, 31,2 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O et 7,4 g de EDTA pour 1L de solution. Après 5 heures de préhybridation, on procède à l'hybridation proprement dite par ajout de 50 ng de sonde marquée dans 15 mL de tampon d'hybridation. L'hybridation se déroule sur la nuit à 65°C. Afin d'enlever la sonde fixée de façon non spécifique, la membrane est lavée, le lendemain, deux fois successivement pendant 20 minutes dans du SSC 5X, SDS 0,5% à 65°C. Elle subit deux lavages additionnels dans du SSC 1X, SDS 0,5%. La membrane est ensuite séchée sur du papier Whatman et recouverte de film Saran. La révélation est effectuée par autoradiographie. La membrane est exposée sur un film BioMax XAR (Kodak) dans une cassette d'autoradiographie.

#### 4. Déshybridation et réhybridation de membranes

Si nécessaire, les membranes ont été réutilisées pour une nouvelle hybridation. Pour cela, l'ancienne sonde est déshybridée par deux lavages successifs de 10 minutes avec une solution de SDS 0,1% préchauffée à 80°C sous agitation. L'efficacité des lavages est contrôlée par vérification de l'absence de signal résiduel avec un compteur de radioactivité. La réhybridation par une nouvelle sonde se fait selon le protocole précédent.

#### G. Construction des différents mutants

##### 1. Constructions plasmidiques pBC-*ftnA* :: $\Omega$ , pBC-*bfr* :: $\Omega$ et pBC-*dps1* :: $\Omega$

Une PCR a permis d'amplifier des fragments d'ADN de 1500 pb environ contenant le gène d'intérêt avec son propre promoteur, avec les amorces *ftnA1s* et *ftnA2r* pour le gène *ftnA*, avec les amorces *bfr1s* et *bfr2r* pour le gène *bfr*, et avec les amorces *dps1s* et *dps2r* pour le gène *dps1*. Ces fragments ont été purifiés et clonés dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy générant les plasmides pG-*ftnA*, pG-*bfr* et pG-*dps1*. Le plasmide pG-*ftnA* a été digéré par l'enzyme *EcoRI* et le fragment résultant a été cloné dans le vecteur multicopie pBC-SK<sup>+</sup>, plasmide efficace pour recombiner chez *E. chrysanthemi* préalablement linéarisé par *EcoRI*. Le plasmide obtenu est noté pBC-*ftnA*. La copie du gène *ftnA* a ensuite été interrompue par un interposon  $\Omega$  comportant un gène qui confère la résistance à la spectinomycine. L'interposon  $\Omega$  a été récupéré par digestion du plasmide pHP45- $\Omega$ spec<sup>R</sup> par *EcoRI* et introduit dans le fragment *ftnA* au site unique de restriction *MunI* générant le plasmide pBC-*ftnA* :: $\Omega$ . Les fragments d'ADN contenant les gènes *bfr* et *dps1* ont été libérés par digestion des plasmides pG-*bfr* et pG-*dps1* par les enzymes *ApaI* et *SpeI* et cloné dans le vecteur pBC-SK<sup>+</sup> préalablement linéarisé par les mêmes enzymes. Parallèlement, les interposons  $\Omega$  portant le gène qui confère la résistance à la kanamycine ou la spectinomycine ont été récupérés par digestion des plasmides pHP45- $\Omega$  *km*<sup>R</sup> et *spec*<sup>R</sup> par *SmaI* et introduits dans les gènes *bfr* ou *dps1* respectivement aux sites *PstI* rempli par l'ADN polymérase T4 et *EcoRV* respectivement générant ainsi les constructions pBC-*bfr* :: $\Omega$  et pBC-*dps1* :: $\Omega$ .

## 2. Construction plasmidique pBC-*bfd* ::*aphA3*

Nous avons inséré une cassette *aphA3* à l'intérieur du gène *bfd* au site *NsiI*. Le vecteur pUC18K est digéré par l'enzyme *SmaI* pour libérer le gène *aphA3*, conférant la résistance à la kanamycine, qui est introduit à l'intérieur du gène *bfd* porté par la construction plasmidique pBC-*bfr* préalablement linéarisée par l'enzyme *NsiI* et rendue franche par l'ADN polymérase T4. Le gène *aphA3* est précédé par des codons d'arrêt de la traduction dans les trois phases de lecture et est suivi d'un site RBS et d'un codon d'initiation de la traduction, ce qui permet de générer une mutation non polaire.

## 3. Construction plasmidique pBC- $\Delta$ *ryhB* $\Omega$ *spec*<sup>R</sup>

Les régions en amont 5' et en aval 3' du gène *ryhB* ont été amplifiées avec les couples d'amorces RyhB1s/RyhB1r et RyhB2s/RyhB2r par PCR. Les amorces RyhB1r et RyhB2s comportent un site de restriction *BamHI* en 5' en prévision du « rabouillage » des fragments. Ces fragments ont été purifiés et clonés dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy générant les constructions pG-*ryhB1* et pG-*ryhB2*. Ces constructions plasmidiques ont été préalablement séquencées, puis digérées par les couples d'enzymes de restriction *EcoRI/BamHI* et *SpeI/BamHI* respectivement. Les deux fragments RyhB1 et RyhB2 sont recollés ensemble et clonés dans le vecteur pBC-SK<sup>+</sup> digéré par *EcoRI/SpeI* générant la construction plasmidique pBC- $\Delta$ *ryhB*. La cassette  $\Omega$ *spec*<sup>R</sup> est récupérée par digestion du plasmide pHP45 par *BamHI* et insérée à l'intérieur du fragment  $\Delta$ *ryhB* au niveau du site unique *BamHI* générant la construction plasmidique pBC- $\Delta$ *ryhB*  $\Omega$ *spec*<sup>R</sup>.

## 4. Construction des fusions transcriptionnelles *ftnA* :: *uidA* et *bfr* :: *uidA*

Les plasmides pBC-*ftnA* et pBC-*bfr* ont été digérés par *MunI* et *PstI* respectivement. Le site *PstI* a été comblé par l'ADN polymérase T4 respectivement pour obtenir des extrémités franches. La cassette *uidA* contient le gène *uidA* codant la  $\beta$ -glucuronidase sans son promoteur mais avec sa séquence de Shine-Dalgarno et le gène qui confère la résistance à la kanamycine. Cette cassette a été récupérée par digestion du plasmide pUIDK1 par *EcoRI* ou *SmaI* et insérée respectivement au niveau des sites uniques *MunI* et *PstI* modifiés. Ainsi les constructions plasmidiques pBC-*ftnA* ::*uidA* et pBC-*bfr* ::*uidA* ont été obtenues. L'orientation de la cassette est préalablement vérifiée pour s'assurer que la fusion transcriptionnelle est fonctionnelle.

Plasmide	Plasmide d'origine	Insert
pG- <i>ftnA</i>	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Fragment comportant le gène <i>ftnA</i> avec son promoteur (1,3 kb) obtenu par PCR
pG- <i>bfr</i>	pGEM <sup>®</sup> -T	Fragment comportant l'opéron <i>bfd-bfr</i> avec son promoteur (1,5 kb) obtenu par PCR
pG- <i>dps</i>	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Fragment comportant le gène <i>dpsI</i> avec son promoteur (1,5 kb) obtenu par PCR
pG- <i>ryhB1</i>	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Fragment <i>ryhB1</i> situé en amont du gène <i>ryhB</i> avec son promoteur obtenu par PCR
pG- <i>ryhB2</i>	pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Fragment <i>ryhB2</i> situé en aval du gène <i>ryhB</i> obtenu par PCR
pB- <i>ftnA</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>ftnA</i> (1,3 kb) cloné au site <i>EcoRI</i> du vecteur pBC-SK <sup>+</sup>
pB- <i>bfr</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>bfr</i> (1,3 kb) cloné au site <i>EcoRI</i> du vecteur pBC-SK <sup>+</sup>
pB- <i>dps</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant l'opéron <i>bfd-bfr</i> (1,5 kb) cloné aux sites <i>ApaI</i> et <i>SpeI</i> du vecteur pBC-SK <sup>+</sup>
pB- <i>ftnA</i> :: $\Omega$	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>ftnA</i> interrompu par l'interposon $\Omega$ spec <sup>R</sup> inséré au site unique <i>MunI</i>
pB- <i>bfr</i> :: $\Omega$	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>bfr</i> interrompu par l'interposon $\Omega$ spec <sup>R</sup> inséré au site unique <i>MunI</i>
pB- <i>dps</i> :: $\Omega$	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>dpsI</i> interrompu par l'interposon $\Omega$ spec <sup>R</sup> inséré au site unique <i>MunI</i>
pB- <i>bfd</i> :: <i>aphA3</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant l'opéron <i>bfd-bfr</i> avec gène <i>bfr</i> interrompu par l'interposon $\Omega$ spec <sup>R</sup> inséré au site <i>PstI</i>
pB- <i>ftnA</i> :: <i>uidA</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>ftnA</i> interrompu par la cassette <i>uidAKm</i> <sup>R</sup> inséré au site <i>MunI</i>
pB- <i>bfr</i> :: <i>uidA</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment comportant le gène <i>bfr</i> interrompu par la cassette <i>uidAKm</i> <sup>R</sup> inséré au site <i>PstI</i> rendu franc
pBC- $\Delta$ <i>ryhB</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment avec le locus <i>ryhB</i> délété dans 120 nucléotides codant l'ARN RyhB
pBC- $\Delta$ <i>ryhB\Omega</i>	pBC-SK <sup>+</sup>	Fragment avec le gène <i>ryhB</i> délété dans 120 nucléotides et interrompu au site <i>nHI</i> par l'interposon $\Omega$ spec <sup>R</sup>

Tableau 6 : Liste des constructions plasmidiques réalisées au cours de ce travail.

## 5. Construction des mutants

L'ensemble des constructions plasmidiques réalisées est consigné dans le tableau récapitulatif 6. Ces constructions plasmidiques ont été utilisées pour inactiver les gènes correspondants dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* où elles ont été introduites par électroporation. L'intégration de la construction plasmidique à l'intérieur du gène parental chromosomique a lieu par un double événement de recombinaison homologue qui est favorisé par des passages successifs en milieu pauvre en phosphate. La pression de sélection exercée par des passages successifs en milieu pauvre en phosphate auquel on ajoute 250  $\mu\text{M}$  de tampon de phosphate de potassium pH 7, 0,1% glycérol, 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  en présence de l'antibiotique approprié a pour objectif de sélectionner les cellules d'*E. chrysanthemi* ayant intégré l'interposon  $\Omega$  dans leur chromosome au niveau du gène cible. En effet, les passages successifs en milieu pauvre en phosphate ont pour conséquence de déstabiliser le plasmide pBC-SK<sup>+</sup> en limitant sa réplication. Les double voir triple mutants ont été construits par transduction d'une mutation dans une souche mutante. Le remplacement du gène sauvage par le gène interrompu par les cassettes  $\Omega$ , *uidA* ou *aphA3* a été vérifié par PCR pour l'ensemble des mutants.

### III- Techniques de chimie et biochimie

#### A. Dosage de l'activité $\beta$ -glucuronidase et $\beta$ -galactosidase

Nous avons étudié l'expression des gènes *ftnA* et *bfr* à l'aide de fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur codant la  $\beta$ -glucuronidase. Cette méthode permet d'étudier l'expression d'un gène d'intérêt *in vivo*, à partir de souches cultivées dans différentes conditions. La  $\beta$ -glucuronidase catalyse la conversion du para-nitrophényle- $\beta$ -D-glucoside (pnpG) incolore en paranitrophénol (pnp) de couleur jaune. Les souches sont cultivées sur la nuit en milieu L. 20 mL de milieu Tris ou de milieu L sontensemencés respectivement au 1/50 et au 1/100 avec la préculture en présence ou non de fer. Des quantités aliquotes sont prélevées à différentes densités optiques au cours de la croissance bactérienne et congelés immédiatement à  $-20^\circ\text{C}$ . La congélation/décongélation permet de lyser les cellules d'*E. chrysanthemi*. 100  $\mu\text{L}$  d'extrait cellulaire sont mélangés avec 900  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction (50 mM tampon phosphate pH 7, 10 mM  $\beta$ - mercaptoéthanol, 0,1% Triton X-100, 1 mM para-nitrophényle- $\beta$ -D-glucoside). Le mélange est incubé à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à coloration. La réaction est arrêtée par ajout de 400  $\mu\text{L}$  de 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol 2,5M.



L'absorbance est mesurée à 415 nm et l'activité  $\beta$ -glucuronidase est déterminée par la relation suivante :

$$\frac{DO_{415} \times 100}{(t \times DO_{600})}$$

L'activité est exprimée en nM de paranitrophénol formé par min et par unité de densité optique à 600 nm.

Nous avons étudié l'expression des gènes *acsA* et *fct* impliqués dans la biosynthèse de l'achromobactine et le transport de la chrysobactine respectivement à l'aide d'un système de gène rapporteur codant la  $\beta$ -galactosidase. La  $\beta$ -galactosidase hydrolyse le O-nitrophenyl-  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) en O-nitrophénol (ONP) de couleur jaune. Les souches sont cultivées sur la nuit en milieu L. 20 mL de milieu minimum Tris sont ensemencés respectivement au 1/50 avec la préculture en présence ou non de 30  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> et de l'antibiotique approprié. Des quantités aliquotes sont prélevées à différentes densités optiques au cours de la croissance bactérienne et congelés immédiatement à -20°C. La congélation/décongélation permet de lyser les cellules d'*E. chrysanthemi*. 100  $\mu$ L d'extrait cellulaire sont mélangés avec 900  $\mu$ L de tampon Z (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, pH 7) et 35  $\mu$ L de SDS 0,1 % et de chloroforme. Le mélange est incubé pendant 5 min à 28°C au bain-marie. La réaction est commencée par ajout de 200  $\mu$ L de ONPG 4 mg/mL et arrêtée par ajout de 500  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. L'absorbance est mesurée à 420 nm et 550 nm et l'activité  $\beta$ -galactosidase est déterminée par la relation suivante :

$$\frac{(DO_{420} - 1,75 \times DO_{550}) \times 1000}{(\text{temps en min} \times DO_{600} \times \text{volume extrait en mL})}$$

L'activité est exprimée en unité Miller.

## B. Dosage colorimétrique de la production de sidérophores

### 1. Essai CAS en milieu liquide

La production de sidérophores est évaluée par la méthode de Schwyn et Neilands (1987). Le Chrome Azurol S CAS est un chélateur faible du fer. La capture du fer lié au CAS par le sidérophore se traduit par un changement de coloration du milieu du bleu vers l'orange quantifiable par mesure de l'absorbance à 630 nm.

Pour préparer le milieu CAS, 1,5 mL d'une solution de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1mM, HCl 10 mM sont ajoutés à 7,5 mL d'une solution CAS 2 mM. Ce mélange, de couleur violette foncée, est ajouté très lentement avec agitation constante, à 6 mL de HDTMA (Hexaméthylammonium bromide) 10 mM préalablement dilués dans 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . 4,3 g de piperazine anhydre sont dissous dans 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  et 6,25 mL de HCl 12 M puis ajoutés au mélange précédent. Le volume de la solution CAS est ajusté à 100 mL avec de l'eau. 500  $\mu\text{L}$  d'acide 5-sulfosalicylique 800 mM sont mélangés aux 100 mL de solution CAS. Le complexe CAS/Fe(III)/HDTMA absorbe à 630 nm et a une couleur bleue. La coloration vire à l'orange lorsque le fer est capturé par un chélateur fort, reflétant la production de sidérophore. Pour déterminer l'activité de l'achromobactine, un mutant *fct* incapable de synthétiser et d'importer la chrysobactine est utilisé. L'activité alors mesurée est attribuée à l'achromobactine. Une gamme étalon est réalisée pour différentes concentrations de Desféral (Novartis) allant de 5  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$ . Par ailleurs, le Desféral a été utilisé comme témoin positif. Des cultures des différentes souches à tester sont réalisées en milieu minimum Tris pauvre en fer. 800  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne sont prélevées au cours de la croissance bactérienne après 4h30, 6h et 7h30. Le surnageant de culture est récolté par centrifugation à 13 000 rpm pendant 3 min. 500  $\mu\text{L}$  de surnageant sont incubés avec un volume égal de solution CAS pendant 30 min à température ambiante. La densité optique est mesurée à 630 nm. La concentration est déterminée grâce à la gamme étalon et donnée en  $\mu\text{M}$  de Desféral par unité de  $\text{D}_{0600}$ .

## 2. Test de Arnow

Le test de Arnow (1937) est une méthode colorimétrique permettant de détecter les fonctions catéchol présentes dans la chrysobactine. Des cultures des différentes souches à tester sont réalisées en milieu Tris (carencé en fer) en présence de glucose à 30°C sous agitation. 800 µL de suspension bactérienne sont prélevées au cours de la croissance bactérienne après 6h, 8h, 10h et 24h et centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min. Aux 400 µL de surnageant de culture bactérienne sont ajoutés 400 µL de HCl 0,5N, 400 µL de réactif de Arnow (nitrite molybdate : NaMo<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 10%, NaNO<sub>2</sub> 10%) et 400 µL de NaOH 1N. Une coloration rose apparaît en présence de catéchol. La mesure de la densité optique à 515 nm permet d'évaluer la quantité de catéchol présente dans l'échantillon. Un témoin positif est réalisé avec 400 µL d'une solution de DHBA à 0,1 mM. La densité optique à 515 nm du témoin positif avoisine 0,25. Le rapport DO<sub>515</sub>/DO<sub>600</sub> est calculé, on en déduit la quantité de catéchols, exprimée en mEquivalent de DHBA par unité DO<sub>600</sub>.

Elle est déterminée selon la formule suivante :

$$\frac{[\text{DO}_{515}/\text{DO}_{600}]}{\text{DO}_{515} \text{ témoin positif}} \times 10$$

## C. Spectrométrie Mössbauer

La distribution intracellulaire du fer a été analysée *in vivo* par spectrométrie Mössbauer pour chacun des mutants *ftnA*, *bfr* et *ftnA bfr* en comparaison à la souche sauvage dans le cadre d'un projet européen de collaboration PROCOPE avec l'équipe du Pr Berthold Matzanke (Isotope Laboratory, Université de Lübeck, Allemagne).

Chaque échantillon Mössbauer est préparé à partir d'une culture bactérienne de 1L. Pour cela, 20 mL d'une préculture bactérienne sontensemencés dans 1L de milieu Tris supplémenté en glucose. 1L de culture bactérienne sont utilisés pour obtenir une biomasse suffisante à la mesure. La culture bactérienne est réalisée à 30°C sous agitation pendant 15 h. Les volumes des cultures bactériennes sont importants et nécessitent beaucoup de sidérophores purifiés, c'est pourquoi nous avons utilisé du DHBA. 5 mL d'un mélange de DHBA 20 mM-Fe<sup>57</sup> 1mM sont ajoutés à 1L de culture bactérienne. La concentration finale est de 5 µM de Fe<sup>57</sup> pour 100 µM de DHBA. La culture bactérienne est placée à nouveau à 30°C sous agitation. Une première expérience a été effectuée sur un temps de marquage long environ 15 heures; une autre expérience sur un temps court 2 heures lors de la phase stationnaire. La culture est centrifugée pendant 20 min à 10 000g et le culot est lavé

successivement deux fois dans du NaCl 0,9%. Le culot est finalement suspendu dans 10 mL NaCl 0,9%. Les 10 mL sont mis dans un tube pour Mössbauer qui comprend une coupelle et centrifugés pendant 20 min à 10 000g. Le culot fait à peu près 0,8 cm<sup>3</sup> et est récupéré dans la coupelle et congelé et conservé dans l'azote liquide en attendant d'être passé en spectrométrie Mössbauer.

Le principe de la spectrométrie Mössbauer est basé sur le bombardement d'un échantillon par le rayonnement  $\gamma$  d'une source de Cobalt 57 dont on fait varier l'énergie par effet Doppler en déplaçant la source par oscillations avec une accélération constante. L'énergie apportée par la source est absorbée par l'échantillon dont le noyau de Fe<sup>57</sup> présent passe de l'état fondamental à un état excité. Un détecteur se trouve derrière l'échantillon pour collecter l'énergie transmise. Le signal est amplifié et analysé par un analyseur à 512 canaux en temps réel. Le spectrophotomètre est calibré contre une feuille de fer. Le cryostat du Mössbauer est un bain d'azote liquide ou d'hélium. Le spectre est enregistré comme un pourcentage de la transmission relative de l'énergie du rayonnement  $\gamma$  en fonction de la vitesse de la source.

#### D. Analyse du contenu intracellulaire en fer par ICP-AES

A partir d'une préculture des différentes souches, 1 mL de suspension bactérienne sontensemencés dans 100 mL de milieu Tris avec l'antibiotique approprié. La culture est réalisée à 30°C sous agitation pendant 13 heures de croissance. Les 100 mL de culture bactérienne sont centrifugés pendant 15 min à 8000 rpm à 4°C. Le culot cellulaire est lavé successivement deux fois avec 20 mL de tampon Tris 50 mM, EDTA 2mM. Enfin le culot est suspendu dans 2 mL de tampon Tris 50 mM. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 13 000 rpm et le culot est séché au Speed-Vac. Le dosage en fer total des extraits bactériens a été réalisé par la méthode de spectrométrie à émission atomique ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy) au bureau des analyses du Centre National de la Recherche Scientifique (Vernaison, France) sur des cellules suspendues dans de l'acide nitrique 0,1N. L'échantillon est introduit dans l'ICP-AES sous la forme d'une solution et convertit en fines gouttelettes qui sont injectées dans le plasma. Le principe consiste à exciter les atomes de fer qui émettent alors un rayonnement à une longueur d'onde caractéristique de l'élément. Le nombre de cellules utilisé pour le dosage est équivalent entre les différentes souches et est de l'ordre de 10<sup>10</sup> cellules. La quantité de fer est donnée en  $\mu\text{g}$  par gramme de biomasse (ou ppm). La méthode de dosage est très fine. La manipulation n'a été effectuée qu'une seule fois.

## E. Marquage au fer Fe<sup>59</sup> des protéines

### 1. Préparation des extraits protéiques

Une préculture de nuit en milieu L des différentes souches est diluée au 1/100<sup>ième</sup> en milieu L et cultivée à 30°C sous agitation jusqu'à une densité optique DO<sub>600</sub> de 0,3. 1 µM de Fe<sup>59</sup>Cl<sub>3</sub> a alors été ajouté à la culture et des prélèvements sont effectués après 45 min et 2 heures. 1 à 1,5 mL de culture bactérienne est centrifugé 10 min à 6000 rpm. Le culot est suspendu dans 500 µL de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,8 et à nouveau centrifugé 10 min à 6000 rpm. Le culot bactérien est suspendu dans 40 à 50 µL de tampon phosphate de potassium 50 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. 100 µg/mL de DNaseI et 0,2 mg/mL de lysozyme y sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 min à 4°C et soumis à 6 cycles de congélation à l'azote liquide et décongélation au bain-marie à 42°C constituant l'extrait cellulaire total, qui est conservé à -20°C.

### 2. Electrophorèse PAGE en conditions non dénaturantes

Un gel à 8,5 % d'acrylamide est préparé à partir d'une solution d'acrylamide contenant 30 % d'acrylamide et 0,8 % de bisacrylamide. La migration s'effectue dans un tampon Tris-Glycine [3,6 g/L Tris ; 14,4 g/L Glycine] à pH 8,3 à 150 V. Avant de déposer les échantillons à analyser sur le gel, 12 µL d'extrait cellulaire total sont repris dans 3 µL de tampon de charge 5X [0,3 M Tris, 0,05% Bleu de Bromophénol, 50% glycérol]. La séparation des protéines s'effectue par électrophorèse pendant 5 h à 150 V à 4°C. Le gel est séché et exposé avec un film autoradiographique (Kodak).

### G. Dosage de l'activité totale pectate lyase

A partir d'une préculture des différentes souches en milieu L, 400  $\mu$ L de suspension bactérienne sontensemencés dans 20 mL de milieu Tris supplémenté avec 2 g/L de glycérol et 1 g/L d'acide polygalacturonique et avec l'antibiotique approprié. La culture est réalisée à 30°C sous agitation et des prélèvements sont effectués après 7 h de croissance à une densité optique  $DO_{600}$  d'approximativement 0,7. Les différents échantillons collectés sont congelés à -20°C. L'activité pectate lyase totale est déterminée en mesurant l'apparition de produits insaturés du substrat polygalacturonate absorbant à 235 nm. 100  $\mu$ L de surnageant sont mélangés avec 2,9 mL de mélange réactionnel comportant 1,5 mL de tampon Tris [Tris 0,1 M pH 8,6 ;  $CaCl_2$  0,5 mM], 1,1 mL d'eau et 0,3 mL d'acide polygalacturonique 1% pH 7 et préalablement incubé à 37°C au bain-marie.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$\frac{(0,412 \times \text{pente} \times \text{facteur dilution surnageant})}{DO_{600}} \text{ en } \mu\text{moles/min/mg de poids sec bactérien.}$$

# Objectif

Le principal objectif de cette thèse est de caractériser les fonctions impliquées dans l'homéostasie du fer, notamment le stockage intracellulaire du fer chez *E. chrysanthemi* 3937 et son implication dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Dans un premier chapitre, nous avons réalisé un inventaire de l'ensemble des ferritines présentes chez *E. chrysanthemi* 3937. La suite s'articulera en trois chapitres dédiés à l'étude de chacune des ferritines. L'approche adoptée a été de construire des mutants de ferritines candidates et de les caractériser afin de comprendre leur fonction physiologique, c'est-à-dire leur contribution au stockage intracellulaire du fer et leur implication dans la virulence d'*E. chrysanthemi* 3937. Nous avons également étudié la régulation de l'expression de chacune des ferritines.

# Résultats



# Chapitre I

Inventaire des ferritines d'*Erwinia chrysanthemi* 3937

Nous avons recherché dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 à l'aide des programmes Fasta et Blast des gènes codant des ferritines bactériennes. Le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 a récemment été entièrement séquencé et annoté par de nombreuses équipes en collaboration. Il est actuellement disponible sur la base de données ASAP (Glasner et al., 2003 ; <https://asap.ahabs.wisc.edu/annotation/php/logon.php>). Il fait une taille de 4 922 802 paires de bases et renferme 4638 phases ouvertes de lecture dont une centaine est dédiée au transport et au métabolisme du fer (soit 2% du génome). Dans le chapitre qui suit, je décrirai l'ensemble des ferritines d'*E. chrysanthemi* 3937 que nous avons identifiées. L'analyse de la séquence de son génome a permis de mettre en évidence plusieurs ferritines potentielles homologues aux trois classes de ferritines décrites chez les bactéries, une ferritine de type eucaryote, une bactérioferritine et deux protéines Dps. Nous allons décrire à présent l'environnement des différents gènes codant les ferritines potentielles d'*E. chrysanthemi* 3937 et détailler l'analyse des séquences des protéines déduites. Nous avons utilisé la panoplie de logiciels **EMBOSS** (**E**uropean **M**olecular **B**iology **O**pen **S**oftware **S**uite) pour mettre en forme les séquences nucléiques et protéiques.

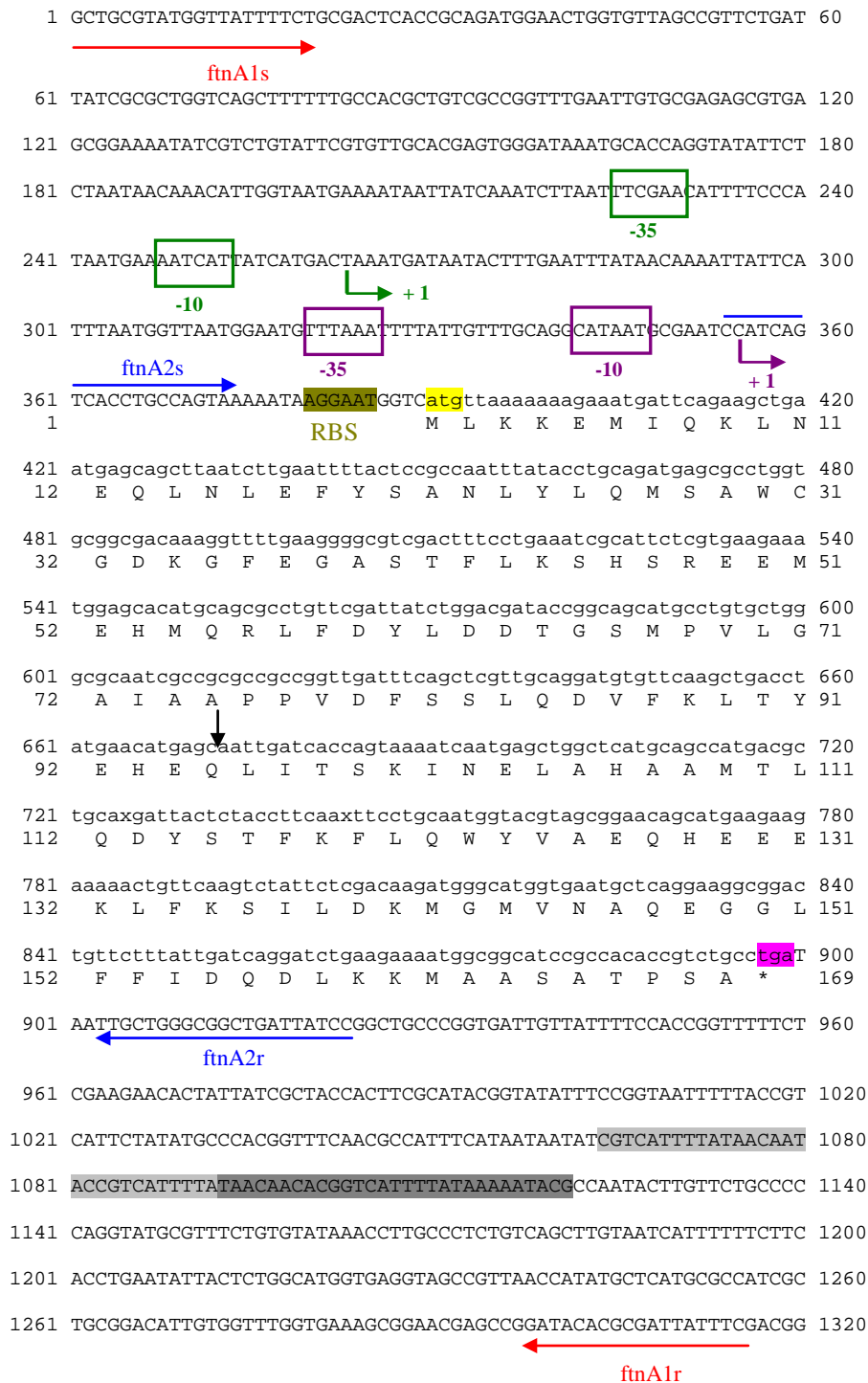


Figure 38 : Séquences nucléique et protéique de la ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937.

Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les deux sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par une expérience d'extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TGA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). La flèche verticale désigne le site de restriction *MunI* où l'interposon  $\Omega$  a été inséré pour construire un mutant *ftnA $\Omega$* .

## I- La ferritine FtnA

L'environnement du gène *ftnA* est présenté sur la figure 37. Le gène *ftnA*, constitué de 510 pb, est localisé en position 2293752 dans le génome d'*E. chrysanthemi* entre l'ORF 14650 correspondant à une protéine de fonction inconnue et l'ORF 14654 correspondant à une endonucléase potentielle (fig. 37). Grâce au programme « Neural Network Promoter Prediction », sept promoteurs potentiels ont été prédits avec des scores de plus de 0,8. Une expérience d'extension d'amorce a permis d'identifier clairement deux sites d'initiation de la transcription au niveau des nucléotides C et T situés 35 et 127 nucléotides en amont du codon d'initiation de la traduction ATG. Les promoteurs identifiés correspondent à deux des promoteurs prédits par le programme et sont indiqués sur la figure 38. Le gène *ftnA* est suivi par des séquences répétées inversées formant un terminateur de transcription en épingle à cheveux Rho-indépendant. Un site de fixation du ribosome potentiel RBS correspondant plus ou moins à la séquence consensus AGGAGG définie précède le gène *ftnA* suggérant que ce dernier peut être traduit (fig. 38).

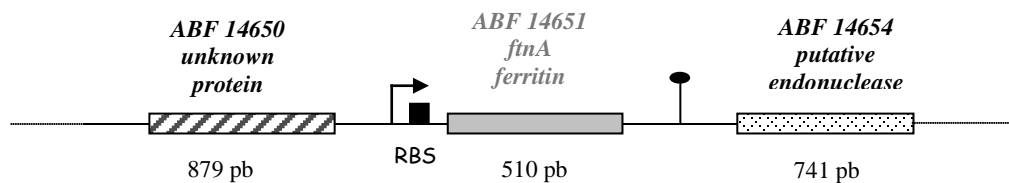


Figure 37 : Représentation schématique de l'environnement du gène *ftnA* codant la ferritine de type eucaryote d'*E. chrysanthemi* 3937.

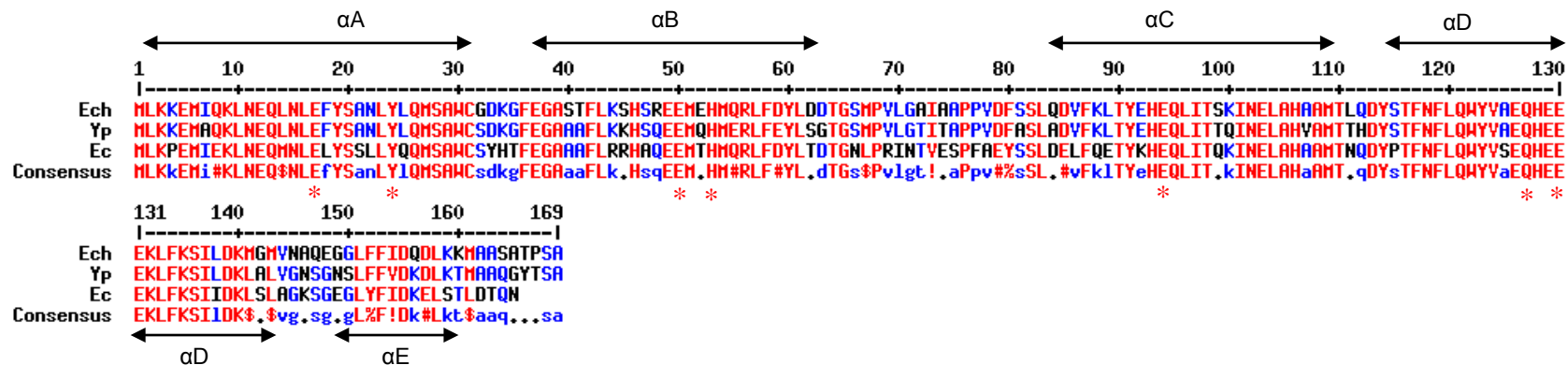


Figure 39 : Alignement des séquences des ferritines Ftn d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). Les lettres A, B, C et D désignent les régions formant les 4 hélices  $\alpha$  et E une courte hélice. Les acides aminés potentiellement impliqués dans la fixation du fer et l'activité ferroxidase sont indiqués par un astérisque \*. Le programme utilisé pour faire l'alignement est « MultAlin » (Multiple sequence alignment by Florence Corpet, 1988).

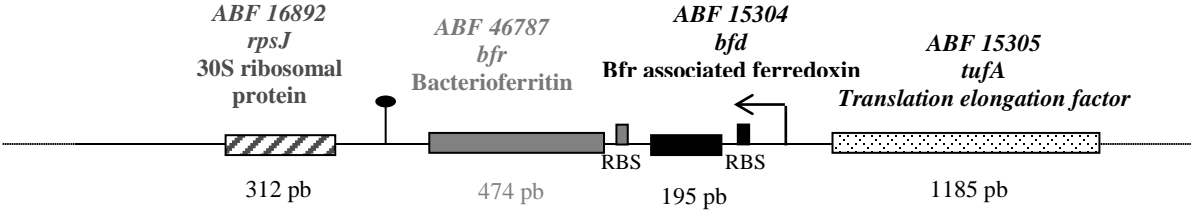


Figure 40 : Représentation schématique de l'environnement du gène *bfr* codant la bactérioferritine d'*E. chrysanthemi* 3937.

Le gène *ftnA* code un polypeptide de 169 acides aminés, de masse moléculaire attendue de 19,3 kDa avec un point isoélectrique de 4,53. Ce polypeptide possède un domaine définissant la famille de ferritines de type eucaryote (PROSITE [PS50905](#)). Nous avons comparé la séquence du polypeptide FtnA d'*E. chrysanthemi* avec celles de *Y. pestis* CO92 et *E. coli* K12 grâce au programme « MultAlin » (F. Corpet, 1988). Comme en témoigne l'alignement des séquences peptidiques sur la figure 39, la séquence du polypeptide FtnA d'*E. chrysanthemi* est relativement bien conservée avec celles de *Y. pestis* CO92 et *E. coli* K12 avec respectivement 78% et 64% d'identité de séquence. La séquence de FtnA présente 4 hélices  $\alpha$  A, B, C et D et une courte hélice E à l'extrémité C-terminale. La ferritine FtnA d'*E. coli* est composée de 24 sous-unités et fait environ 500 kDa (Hudson et al., 1993). La masse moléculaire théorique de la ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* serait de 463,2 kDa. Chaque sous-unité présente deux sites de fixation du fer A et B formant le centre ferroxidase. Les résidus impliqués dans la fixation du fer au niveau du site ferroxidase de la ferritine FtnA sont conservés parmi les ferritines Ftn. Il s'agit des résidus E18, Y24, E50, H53, E94, Q127 et E130 (fig. 39). Le polypeptide FtnA d'*E. chrysanthemi* ne possède pas de peptide signal d'après l'analyse de sa séquence par le programme SignalP 3.0 suggérant que la protéine n'est pas sécrétée et est prédite comme étant cytoplasmique d'après une analyse avec le programme PSORTb.

## II- La bactérioferritine Bfr

Le gène *bfr* codant une sous-unité individuelle de la bactérioferritine est situé en aval du gène *bfd* codant une ferredoxine à centre [2Fe-2S] (fig. 40). Les deux gènes *bfd* et *bfr* sont séparés par seulement 74 nucléotides, distance entre le codon stop du gène *bfd* et le codon ATG du gène *bfr*. De plus, aucun terminateur Rho-indépendant n'a été identifié entre les deux gènes alors qu'un terminateur Rho-indépendant est présent en aval du gène *bfr*. L'analyse de ce locus révèle vraisemblablement une organisation en opéron. Cette organisation est d'ailleurs conservée chez l'ensemble des micro-organismes étudiés et notamment *E. coli* K12, *Y. pestis* CO92 ou *V. cholerae*. Chez *E. chrysanthemi* 3937, l'opéron *bfd-bfr* est précédé du gène *tufA* (ORF 15305) codant un facteur d'élongation de la traduction et est suivi du gène *rpsJ* codant la protéine ribosomale 30S (fig. 40).

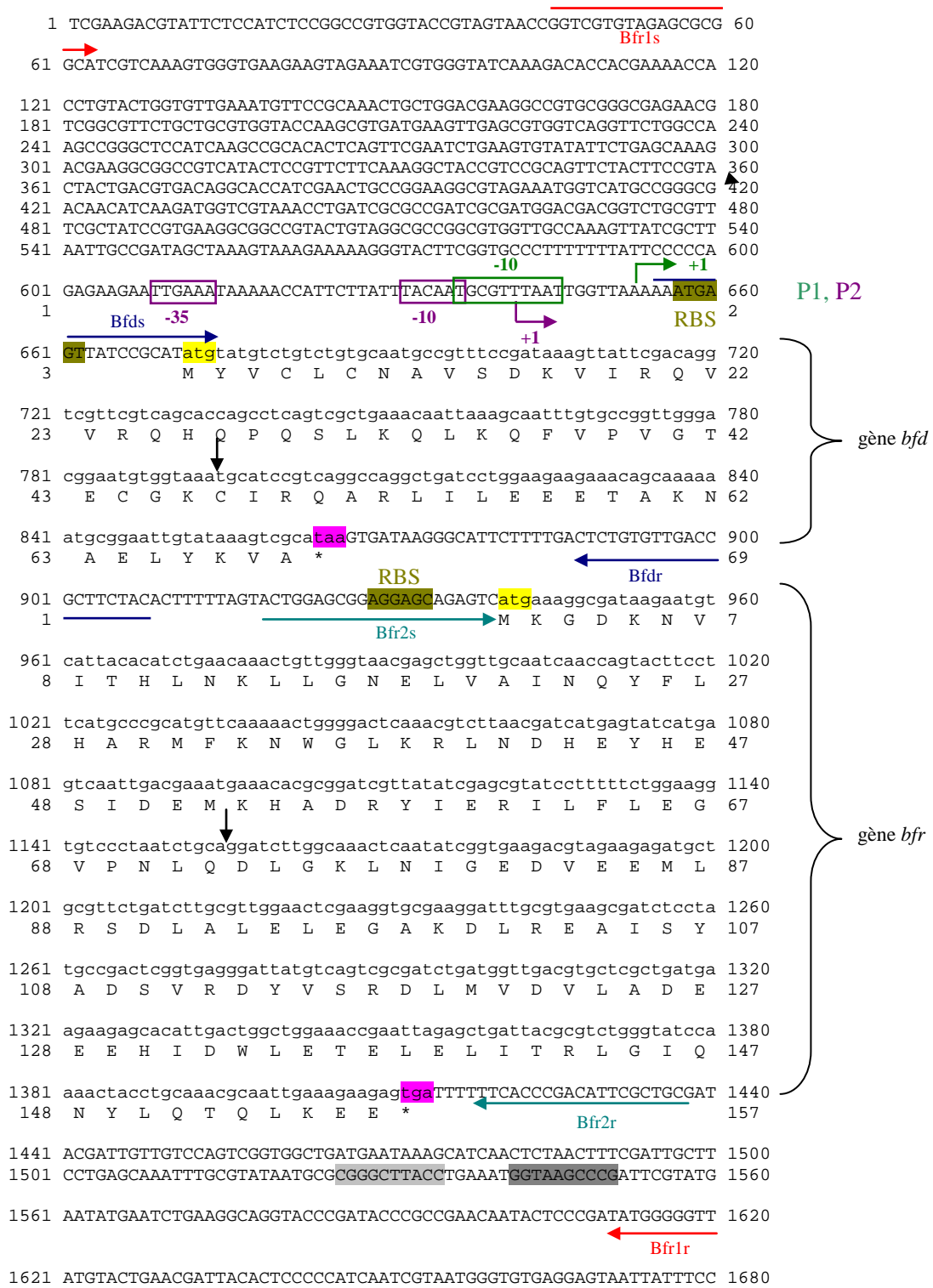


Figure 41 : Séquences nucléique et protéique de la bactéroferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937. Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les deux sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TGA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). Les flèches verticales en position 794 et 1155 désignent les sites de coupure par les enzymes *NsiI* et *PstI* où la cassette *aphA3* et  $\Omega$  a été inséré pour construire respectivement les mutants *bfd* non polaire et *bfr* $\Omega$ .

Deux sites d'initiation de la transcription ont été déterminés par extension d'amorce au niveau des nucléotides A et T situés 18 et 30 nucléotides en amont du codon ATG du gène *bfd* (fig. 41). Un promoteur classique de type sigma-70 est associé aux sites d'initiation en positions 30 et 33. De plus, un promoteur de type  $\sigma^S$  a été identifié pour le site d'initiation de la transcription en position 18 en amont de l'ATG. Celui-ci présente une séquence -10 étendue caractéristique des promoteurs  $\sigma^S$  dépendant dont la séquence consensus définie est TGN<sub>0-2</sub>C(C/T)ATA(C/A)T. La séquence -10 identifiée est TGCGTTTAAT avec 7 bases conservées sur 9. Cependant nous n'avons pas identifié de séquence -35 affiliée à cette séquence -10. Des travaux réalisés chez *E. coli* ont d'ailleurs montré que le gène *bfr* est régulé par le facteur de transcription  $\sigma^S$ . Chacun des gènes *bfd* et *bfr* est précédé d'un site RBS potentiel dont la séquence est respectivement ATGAGT et AGGAGC.



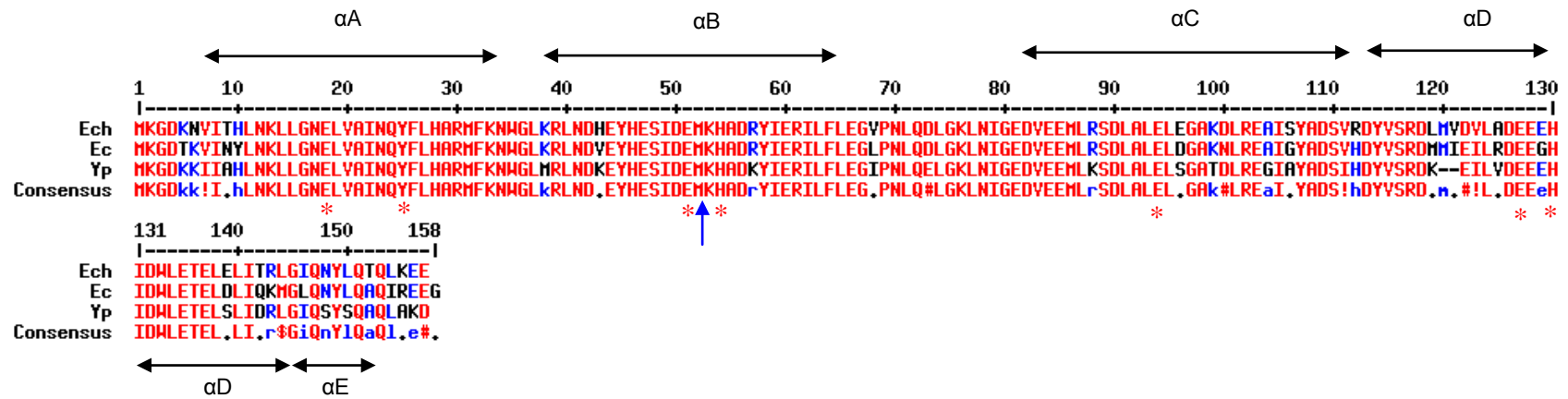


Figure 42 : Alignement des séquences de bactérioferritine d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO 92 (Yp). Les lettres A, B, C et D désignent les régions formant les 4 hélices  $\alpha$  et E une courte hélice. Les acides aminés impliqués dans la fixation du fer et l'activité ferroxidase sont indiqués par \*. La flèche verticale bleue en position 52 désigne le résidu méthionine M impliqué dans la fixation de l'hème.

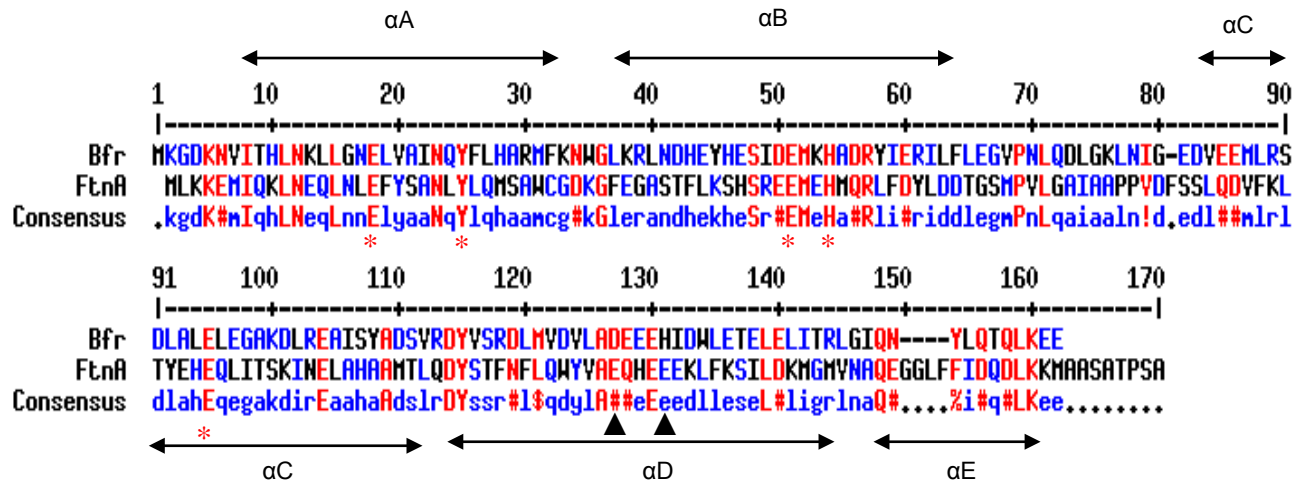


Figure 43 : Alignement des séquences de la ferritine FtnA et la bactérioferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech). Les résidus E et H du centre ferroxidase impliqués dans la fixation du fer sont indiqués par un astérisque \*. Les triangles désignent les résidus du centre ferroxidase en positions 127 et 130 qui diffèrent entre la ferritine et la bactérioferritine.

Le gène *bfr* code un polypeptide de 157 résidus qui présente un point isoélectrique de 4,7 et une masse moléculaire calculée de 18,4 kDa. Ces paramètres sont semblables à ceux du polypeptide FtnA précédemment caractérisé. Le polypeptide Bfr d'*E. chrysanthemi* possède un motif à l'extrémité N-terminale correspondant à la signature MkGdknVIthLnkLLgneL (PROSITE [PS50905](#)) définie pour la classe des bactéroferritines. De plus, il est identique à 81% et 84% respectivement avec les bactéroferritines Bfr de *Y. pestis* CO92 et *E. coli* K12 (fig. 42). Les résidus qui chélatent le fer au niveau du site ferroxidase E18, Y25, E51, H54, E94, E127 et H130 sont conservés dans la séquence protéique de Bfr d'*E. chrysanthemi* avec ceux des bactéroferritines d'autres micro-organismes (fig. 42). Le résidu M localisé en position 52 est conservé et est décrit comme étant impliqué dans la fixation de l'hème de type b entre deux sous-unités chez *E. coli* (Andrews et al., 1995). Tout comme le polypeptide FtnA, le polypeptide Bfr comporte 4 hélices  $\alpha$  A, B, C et D et une courte hélice E à l'extrémité C-terminale. Cependant, il ne présente que 16 % d'identité de séquence avec le polypeptide FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937 (fig. 43). Néanmoins, les résidus du centre ferroxidase sont relativement conservés avec ceux du polypeptide FtnA, seuls deux résidus diffèrent entre les centres ferroxidase des deux polypeptides. Il s'agit du glutamate en position 127 et de l'histidine en position 130 pour la bactéroferritine Bfr et de la glutamine en position 127 et du glutamate en position 130 pour la ferritine FtnA (fig. 43).

Le gène *bfd* code une protéine de 69 résidus dont la masse moléculaire déduite est de 7,3 kDa avec un pI 9. Le pI calculé est particulièrement élevé pour une protéine, mais est apparemment conservé avec celui des protéines Bfd notamment celle d'*E. coli*. Ce polypeptide présente 56 % d'identité de séquence avec la protéine Bfd d'*E. coli* K12 et 70 % avec celle de *Y. pestis* CO92 (fig. 44). La protéine Bfd est apparentée au domaine central de la sous-unité de la protéine NifU d'*A. vinelandii* qui contient un cluster [2Fe-2S]. La protéine NifU est impliquée dans la formation des clusters [Fe-S] de la nitrogénase. Ce cluster [2Fe-2S] n'est pas un précurseur pour la maturation de la nitrogénase, mais aurait une fonction redox (Agar et al., 2000). De même, la séquence protéique de Bfd est homologue aux domaines des nitrite réductases et de la nitrate réductase de *K. pneumoniae*. Les membres de cette famille comportent un motif de 4 résidus cystéines conservés en positions 4, 6, 39 et 42 organisés comme suit, -C-X-(C/H)-X<sub>31-34</sub>-C-X-X-C- et qui sont supposés être les ligands pour les clusters Fe-S. La protéine Bfd d'*E. coli* est monomérique (Quail et al., 1996 ; Garg et al., 1996).

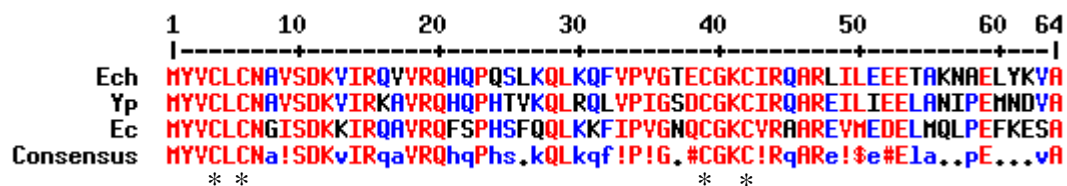


Figure 44 : Alignement des séquences de Bfd d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). Les résidus susceptibles d'être des ligands du centre [Fe-S] sont repérés par un astérisque \*.

L'analyse de la séquence des deux polypeptides Bfr et Bfd par le programme PSORTb conforte l'idée que ces protéines ont une localisation cytoplasmique, en effet ils ne présentent pas de peptide signal ou de régions transmembranaires.

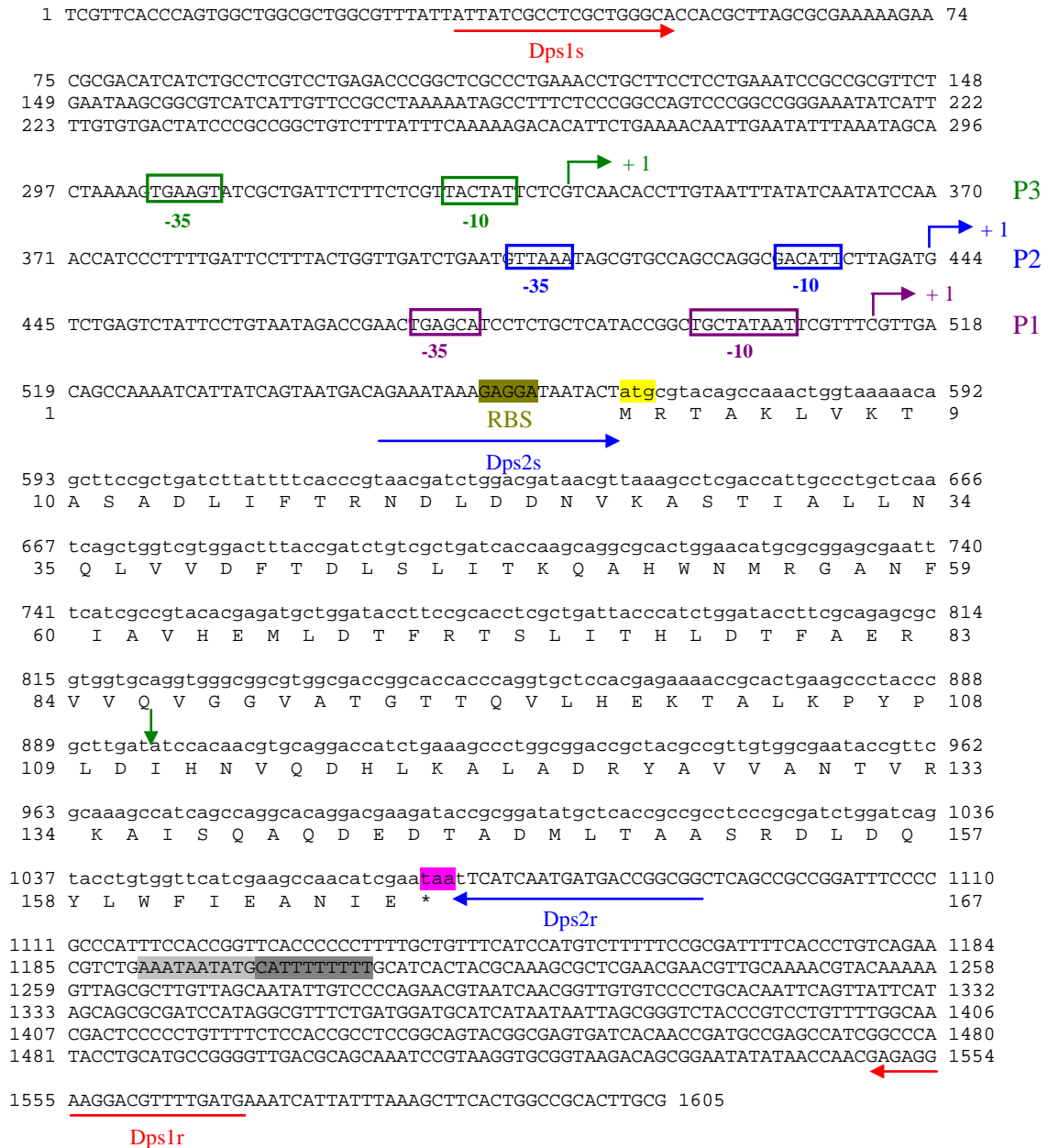


Figure 46 : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937.

Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les trois sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TAA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). La flèche verticale désigne le site de restriction *EcoRV* où l'interposon  $\Omega$  a été inséré pour construire un mutant *dps1 $\Omega$* .

### III- Les protéines Dps

#### A. Protéine Dps1

L'environnement du gène *dps1* est constitué du gène *glnH* situé en aval codant une perméase de type ABC et de l'ORF 18913 en amont dont le produit n'a pas de fonction connue (fig. 45). Une analyse bioinformatique pronostique la présence de plusieurs promoteurs potentiels dont trois ont été confirmés expérimentalement. En effet, trois sites d'initiation de la transcription ont été déterminés par extension d'amorce en positions -53, -122 et -226 par rapport à l'ATG (fig. 46). Un site RBS potentiel dont la séquence est GAGGA a été localisé en amont de l'ATG du gène *dps1*. Nous relevons que le promoteur P1 présente un site -10 étendu caractéristique des promoteurs activés par  $\sigma^S$  et dont le consensus défini est TGN<sub>0-2</sub>C(C/T)ATA(C/A)T (fig. 46).

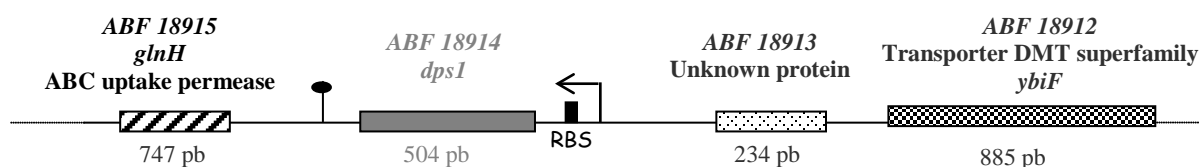


Figure 45 : Représentation schématique de l'environnement du gène *dps1* d'*E. chrysanthemi* 3937.

Le gène *dps1* code un polypeptide de 167 résidus dont le point isoélectrique est de 5,5. La séquence de la protéine Dps1 présente un motif correspondant à l'une des 2 signatures définies pour la famille de protéines Dps, « DPS-1 », localisé dans la région centrale de la protéine entre les résidus 51 et 67 et correspondant à la séquence en acides aminés suivante : HWnMrGanfiahVHemVHEMld (PROSITE [PS00818](#)). La seconde signature de la famille Dps LDtMAERavqLGvA n'est pas retrouvée entièrement dans la séquence du polypeptide Dps1 d'*E. chrysanthemi*, différant au niveau de 2 résidus. Ce polypeptide présente 73% et 69% d'identité de séquence avec les protéines Dps d'*E. coli* et *Y. pestis* respectivement (fig. 47). Les sites potentiels de fixation du fer formant le centre ferroxidase ont ainsi été déterminés par analogie aux autres protéines Dps. Il s'agit des résidus H, D et E localisés en positions 51, 63, 67, 78 et 82 de la séquence de Dps1. La séquence de Dps1 se caractérise par la présence de 4 hélices  $\alpha$  (A, B, C et D) et une courte hélice E qui relie les hélices  $\alpha$  B et C. Le polypeptide Dps1 ne présente qu'environ 7 % d'identité de séquence avec les polypeptides FtnA et Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937 et les résidus impliqués dans le centre ferroxidase sont différents de ceux trouvés dans les ferritines Ftn et Bfr. Par ailleurs, la particularité des protéines Dps soulevée dans la bibliographie est la localisation du centre ferroxidase entre deux sous unités.

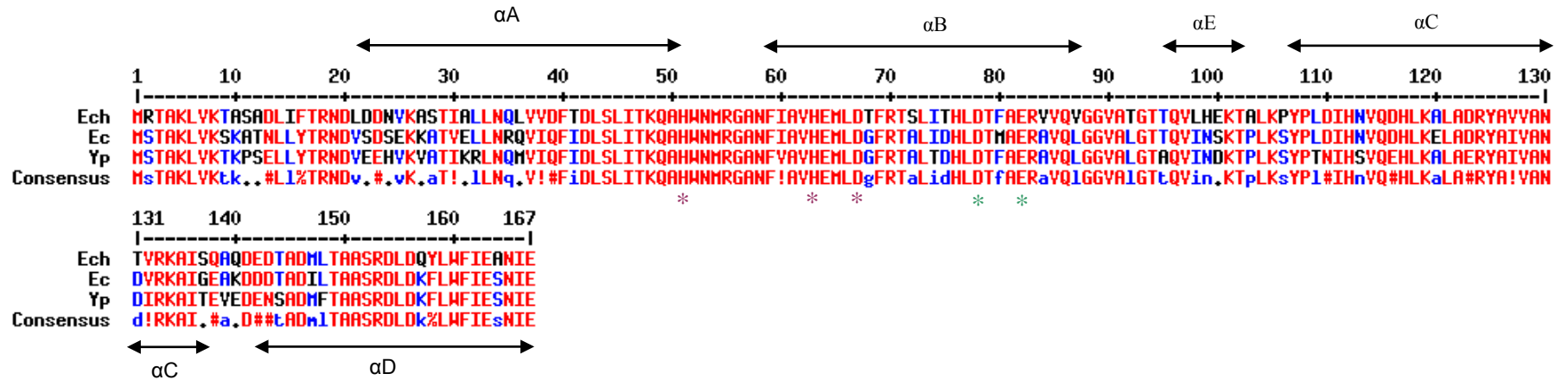


Figure 47 : Alignement de séquence de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et des protéines Dps d'*E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). Les lettres A, B, C et D désignent les régions formant les 4 hélices  $\alpha$  et E une courte hélice. Les résidus du centre ferroxidase sont indiqués par \*. Les astérisques violettes désignent les résidus du centre ferroxidase d'une sous unité et les astérisques verts ceux de l'autre sous unité.

Une autre particularité est l'aptitude de certaines protéines de cette classe à interagir avec l'ADN formant une structure cristalline singulière. Chez *E. coli*, l'aptitude de Dps à interagir avec la molécule d'ADN est associée à la présence d'une extrémité N-terminale flexible contenant 3 résidus lysine et un résidu arginine chargés positivement (Grant et al., 1998). L'extrémité N-terminale de Dps1 comporte 2 résidus lysine et un résidu arginine chargés positivement. La lysine en position 10 dans la séquence de Dps d'*E. coli* est remplacée par une alanine neutre dans la séquence de Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937.

```

1 AGTGAATGGGTGATATTTAAGCACTCCAGCCACATGCCGCATGTGGAAGAACGCGCCACC 60
61 TGCATGGCGGTGGTTCGGTGAGTTTCTGGGCCGTCTGCCCTGATGCCCGCTTGACCCGCC 120
121 GATAGCCGCACATCGGGCGGTCTGGGGCACGGGTTCAAAAAGTTGATACGTCGCAAACGTT 180
181 TATTCA CAGAATCGTTTTATAAAGGGTGAGCCAGCCACCTGGTGGAGCTGGGACAGCGG 240
-10 +1 -35
241 TTTCTGGTCTATGTTTCTGGTTCATGTTTCTGGTCCATGTTTCTGGTCCATGTTTCTGGT 300
-10 +1 -35
301 CTATGATCAAAAAGGCCGTCACATTGCCCGGCACGCGAGTACATGCCGGGACTGATGTTCA 360
361 TGGCGAACCATACGCGATTGACAGAAAGGAGAGCGTTATatgtcaggcagtaaaaagaa 420
1 M S G S K K K 7
421 aaagagccccgattggcctggatgtgacagcagctctgaaagattgcccgaactgaacac 480
8 K S P I G L D V Q Q S E K I A A K L N T 27
481 cttgctggcgaactaccagattctgtacatgaatgtgcgcggttatcactggaacatttc 540
28 L L A N Y Q I L Y M N V R G Y H W N I S 47
541 cggctgcccctttttcagcttcacgccaagtttgaggaaatctacaacgaactgctgtt 600
48 G A A F F E L H A K F E E I Y N E L L L 67
601 gaaaatcgacgaactggcggaaactgttctggcgctggcgacaaccgctgcatgccta 660
68 K I D E L A E R I L A L G G Q P L H A Y 87
661 cagcgactacctgaaagtggcggacatcaaagaagacgtcaacgccaccgacggcaaaaa 720
88 S D Y L K V A D I K E D V N A T D G K K 107
721 aacgctggaagggttgctggccggttacgccgtactgctgcaacagcagcgtgaaatcct 780
108 T L E G L L A G Y A V L L Q Q Q R E I L 127
781 gccgctggtggcagacgccagcgatgaaggcaccgctgctgatgaccgattacatcaa 840
128 P L V A D A S D E G T A S L M T D Y I K 147
841 agaacagaaaaacagatctggatgttcaacgcctacctgaaatTaaCCCCGGCCTGACTC 900
148 E Q E K Q I W M F N A Y L K * 161
901 CTCATCTGGCCCCGCCGTTCAAGGCGGGGCTCATGCATCAACGCATTTTTCCCGCGCA 960
961 TCGGCGTACTCTTGTCTTGCTTACGGCAGCGTGACGATTTCAATCCAGTTGGCGCCTTT 1020
1021 ACCCGTTGGGAATCGGCCGGTCAGCGTCAGTTCCCGCTGGTTTGATTGATGCGATACAC 1080
1081 CGACAGCTGATCGGATTTTTACCCGCTGGCGATCAGGTAACGGCCGCTGGGATCGACCTG 1140
1141 AATACCGCGCGGCTGGGTTTCGGTGGGATAGCGGTCACATAACGCAGTTGACCGCTCTT 1200
1201 GGGCGTAACCCGCAGCAGGCTAAGGGTACTGCTGGTGCCTTCGGAAACATACAGGAAACG 1260
1261 ACCGTTCCGGCGTCAGCCGCAATCCGCACTCCAGATTTGGGGCGATTATCGATGCCCGG 1320
1321 CGCTTTAGGGTGCACCGTGCCGGGTTGCATTTCCCGCTCCCGGGAGGGCATCGGTGTA 1380

```

Figure 49 : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937. Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les sites +1 sont putatifs et ont été identifiés à l'aide du programme « Neural Network Promoter Prediction ». Les codons d'initiation ATG et de terminaison TAA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris.



## B. Protéine Dps2

Le deuxième gène codant une protéine Dps, *dps2* (ORF 15905), est localisé entre les ORFs 15903 codant une proline iminopeptidase et 15908 codant une protéine dont la fonction n'est pas connue (fig. 48). Deux promoteurs P1 et P2 ont été prédits par analyse bioinformatique. Un terminateur de transcription Rho-indépendant a été déterminé en aval du gène *dps2*. De plus, un site RBS putatif dont la séquence est AGGAGA est présent en amont de l'ATG du gène *dps2* (fig. 49).

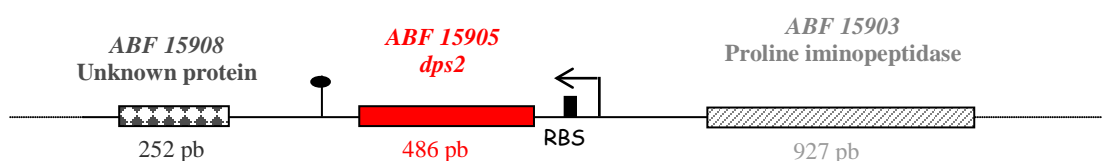


Figure 48 : Représentation schématique de l'environnement du gène *dps2* d'*E. chrysanthemi* 3937.

Le gène *dps2* code un polypeptide de 161 résidus et de masse moléculaire prévue 18,15 kDa. Ce polypeptide présente un pI de 5,4 sensiblement identique aux autres ferritines. Comme l'alignement des séquences le montre, ce polypeptide présente peu d'identité de séquence avec le polypeptide Dps d'*E. coli* (17%) et également avec le polypeptide Dps1 d'*E. chrysanthemi* (20%) (fig. 50). Néanmoins, les sites du centre ferroxidase sont conservés avec ceux de la protéine Dps1 en positions 43, 55, 58, 70 et 74 (fig. 50). Ce polypeptide Dps2 présente plus d'identité de séquence avec les protéines Dps putatives de *V. cholerae* N16961 (58%), *V. vulnificus* CMCP6 (54%), *B. fragilis* YCH46 (44,7%), *P. gingivalis* ATCC32277 (40%) et *P. syringae* DC3000 (34%) (fig. 51). Ce polypeptide possède des motifs dans sa région centrale correspondants aux signatures HWnIsGaaffeLHakfE (PROSITE [PS00818](#)) et IDeLAERilaLGgqP (PROSITE [PS00819](#)) définissant la famille des protéines Dps. L'extrémité N-terminale du polypeptide Dps2 est chargée positivement comme la plupart des Dps décrites. En effet, il présente quatre lysines consécutives, suggérant une possible interaction avec l'ADN.

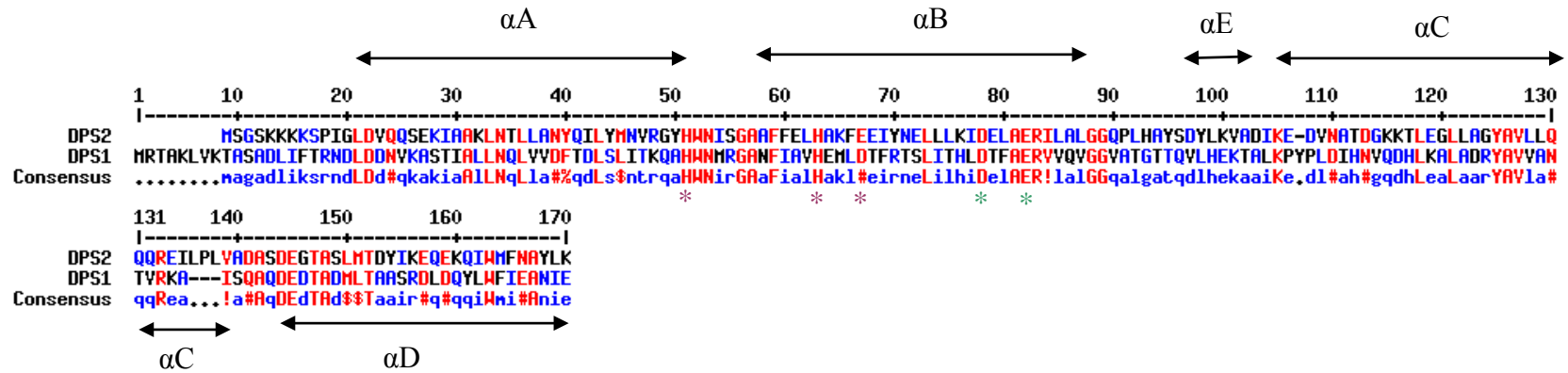


Figure 50 : Alignement des séquences des protéines Dps1 et Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937. Les résidus impliqués dans la fixation du fer au niveau du centre ferroxidase sont indiqués par un astérisque \* violet et vert correspondant à chacune des 2 sous-unités. Les lettres A, B, C et D désignent les régions formant les 4 hélices  $\alpha$  et E une courte hélice.

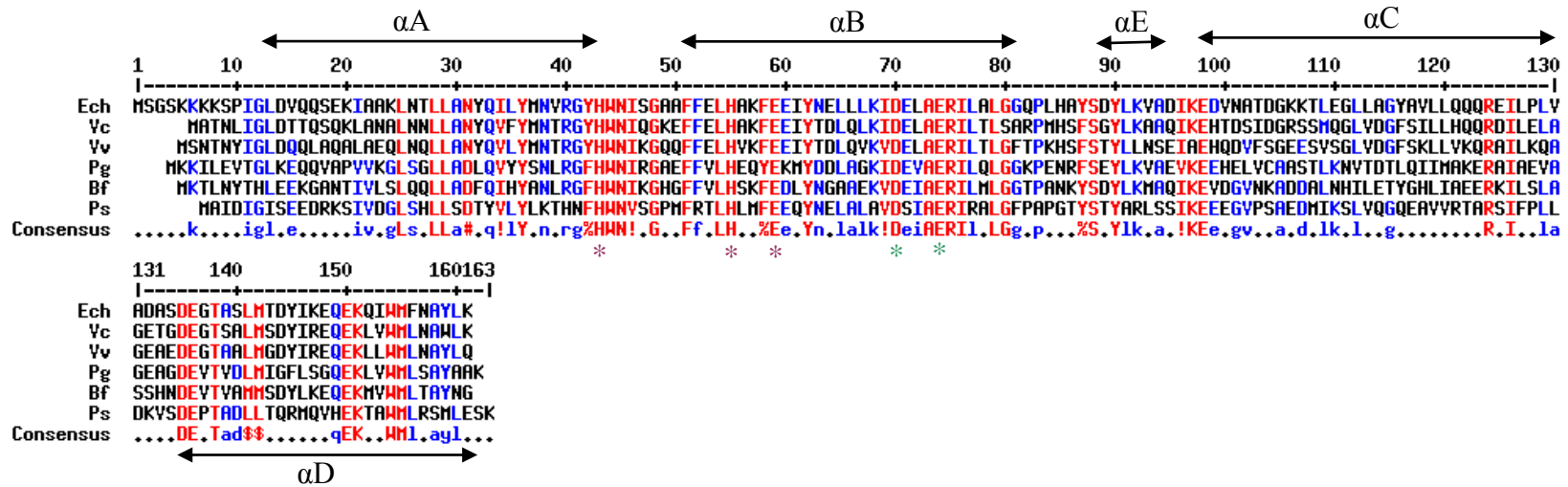


Figure 51 : Alignement de séquence de la protéine Dps2 d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et des protéines Dps putatives de *V. cholerae* N16961 (Vc), *V. vulnificus* CMCP6 (Vv), *P. gingivalis* ATCC32277 (Pg), *B. fragilis* YCH46 (Bf) et *P. syringae* DC3000 (Ps). Les lettres A, B, C et D désignent les régions formant les 4 hélices  $\alpha$  et E une courte hélice. Les résidus du centre ferroxidase sont indiqués par un astérisque \* violet et vert impliqués dans la fixation du fer au niveau de chacune des 2 sous-unités.

En conclusion, *Erwinia chrysanthemi* 3937 dispose d'une panoplie de quatre ferritines : une ferritine de type eucaryote FtnA, une bactérioferritine Bfr et deux protéines Dps. La ferritine FtnA et la bactérioferritine Bfr sont peu homologues entre elles en terme de séquence, cependant leurs sites ferroxidase respectifs sont fortement conservés. Chacune de ces deux protéines est conservée avec les protéines d'autres espèces bactériennes appartenant à la même famille. Quant aux deux protéines Dps, elles sont complètement différentes en terme de séquence et de nature/localisation de leur centre ferroxidase aux deux ferritines précédentes. Malgré l'hétérogénéité des ferritines bactériennes en terme de séquence, leurs structures résolues par cristallographie sont comparables. Celles-ci sont décrites comme des protéines multimériques de 24 sous unités (Ftn et Bfr) ou 12 sous unités (Dps appelés également mini-ferritines en raison de leur petite taille) formant une structure en forme de pelote et creuse à l'intérieure.

Dans la suite de mon manuscrit de thèse, nous étudierons la fonction physiologique des ferritines d'*E. chrysanthemi* 3937 au cours de trois chapitres dédiés à chacune des ferritines FtnA, Bfr et Dps1. En effet, vu l'ampleur du travail nous avons décidé de ne pas étudier la deuxième mini-ferritine Dps2.

## Chapitre II

La ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937

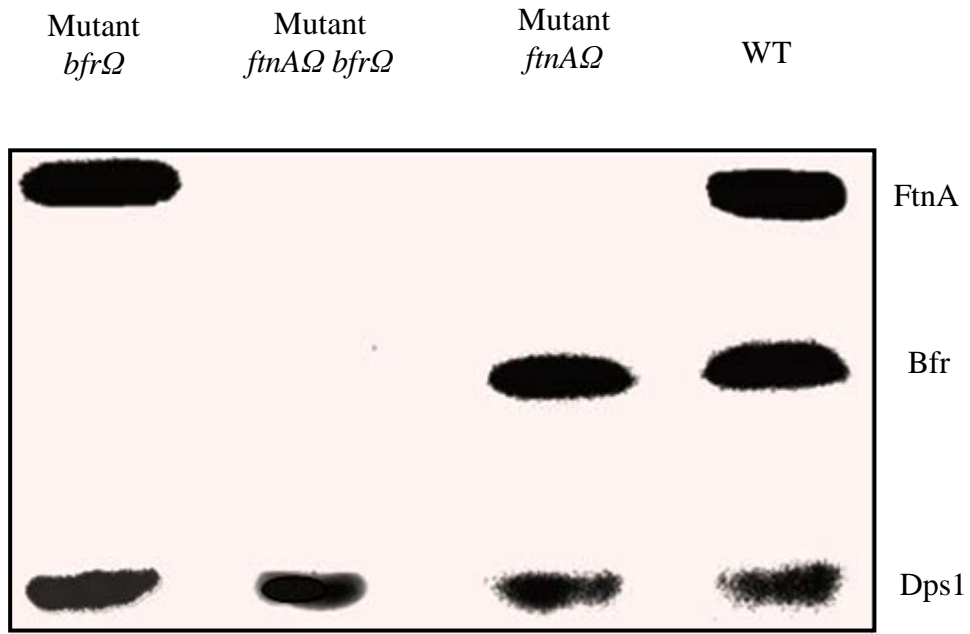


Figure 52 : Contenu en protéines à fer de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* et des mutants *ftnA*Ω, *bfr*Ω et *ftnA*Ω *bfr*Ω. Les souches bactériennes ont été cultivées en milieu L jusqu'à  $DO_{600} = 0,3$ , puis  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{59}\text{Cl}_3$  y ont été ajoutés. Des extraits cellulaires totaux ont été préparés après 45 min de marquage et ont été analysés par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

## I- Construction d'un mutant *ftnA* $\Omega$

Après avoir identifié par une analyse bioinformatique un gène codant une ferritine de type eucaryote homologue au gène *ftnA* d'*E. coli* et d'autres entérobactéries, nous l'avons inactivé dans la souche 3937 d'*Erwinia chrysanthemi* afin d'évaluer sa fonction physiologique. Nous avons procédé en remplaçant le gène chromosomique parental par une copie du gène *ftnA* interrompu par un interposon  $\Omega$ . Pour cela, nous avons amplifié par PCR avec les amorces *ftnA1s* et *ftnA1r* un fragment d'environ 1,3 kb contenant le gène *ftnA* en position centrale (annexe 1). Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy et la construction plasmidique résultante a été préalablement séquencée. Le gène *ftnA* a ensuite été récupéré par digestion de la construction plasmidique précédente par l'enzyme de restriction *EcoRI* et cloné dans le plasmide multicopie pBC-SK<sup>+</sup> linéarisé par la même enzyme. Pour inactiver le gène *ftnA*, l'interposon  $\Omega$  *specR* conférant la résistance à la spectinomycine est récupéré par digestion du plasmide pHP45 par *EcoRI* et introduit dans le gène *ftnA* au niveau du site de restriction unique *MunI*. La construction résultante a été introduite par électroporation dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* par électroporation où elle a été recombinaisonnée dans le chromosome. Les clones résistants à la spectinomycine ont été sélectionnés et vérifiés par PCR et Southern-blot.

## II- Vérification de l'absence de ferritine FtnA dans le mutant *ftnA* $\Omega$

Nous avons analysé le contenu en protéines à fer des mutants *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Pour cela, les cultures bactériennes ont été marquées au Fe<sup>59</sup> pendant leur croissance en milieu L en présence de 1  $\mu$ M de Fe<sup>59</sup>Cl<sub>3</sub>. Les extraits cellulaires des différents mutants ont été prélevés en phase exponentielle de croissance et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions natives. Nous constatons la présence de trois protéines marquées au Fe<sup>59</sup> dans la souche sauvage. Dans le mutant *ftnA* $\Omega$ , la bande supérieure disparaît. Cette bande doit correspondre à la protéine FtnA. De façon analogue, la bande intermédiaire marquée au Fe<sup>59</sup> qui disparaît dans le mutant *bfr* $\Omega$  et le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  doit correspondre au polypeptide Bfr. Enfin, la bande inférieure doit correspondre à la protéine Dps1 (voir chapitre IV). En conclusion, la protéine FtnA est bien absente dans le mutant *ftnA* $\Omega$ . Par ailleurs, elle est capable de fixer le fer apporté (fig. 52).

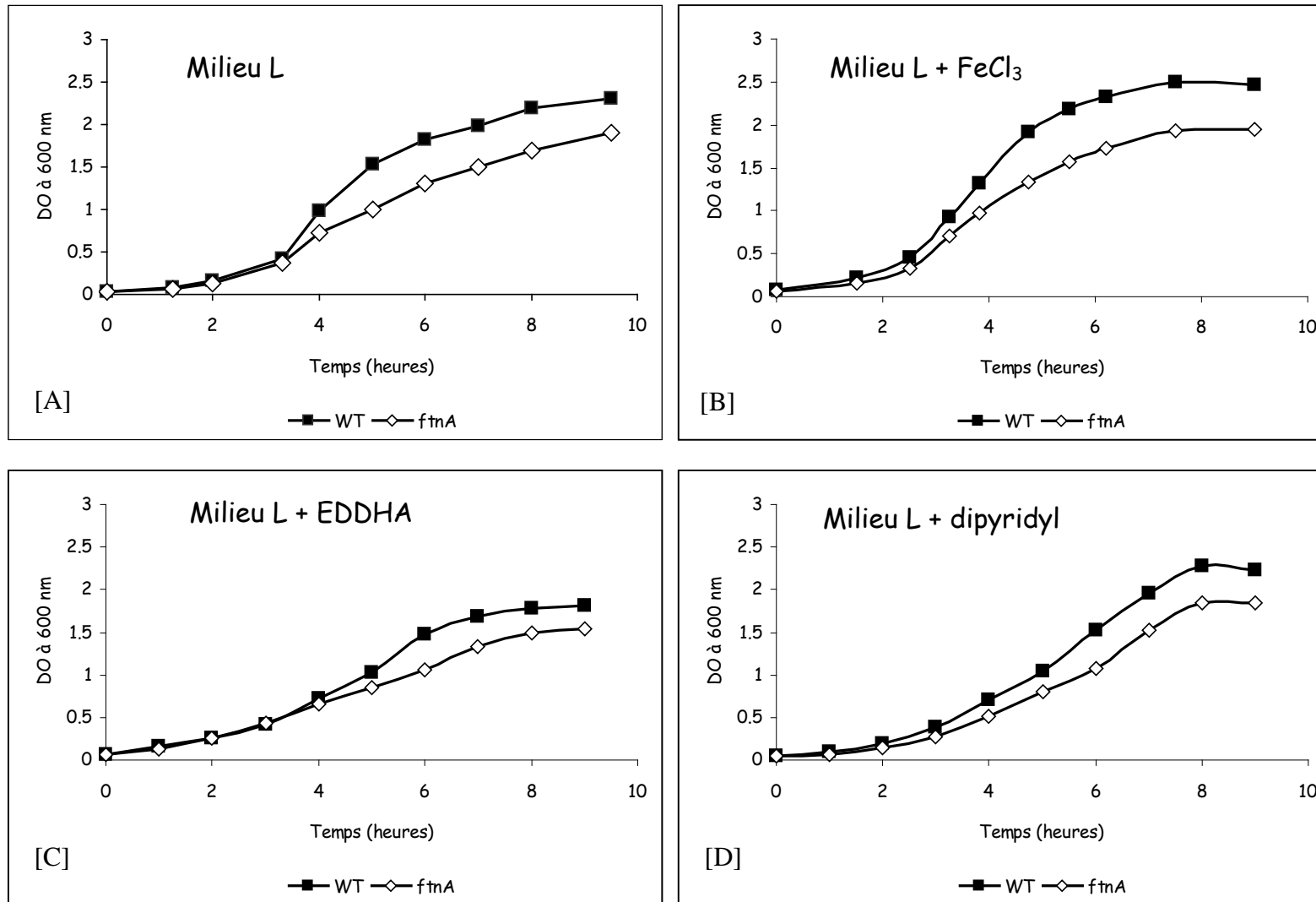


Figure 53 : Propriétés de croissance du mutant *ftnA* en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], EDDHA (100 μM) [C] et 2,2'-dipyridyl (200 μM) [D].

### III- Propriétés de croissance du mutant *ftnA*Ω

Nous avons testé les propriétés de croissance du mutant *ftnA*Ω en milieu liquide riche L ou minimum Tris en présence ou non de fer (FeCl<sub>3</sub>) ou d'un chélateur du fer.

Quelles que soient les conditions testées, le mutant *ftnA*Ω présente une croissance réduite par rapport à la souche sauvage. Après 9 heures de croissance en milieu riche L, le mutant *ftnA*Ω atteint une densité optique finale inférieure à celle de la souche sauvage avec un défaut de près de 20% en comparaison à la souche sauvage. L'ajout de fer entraîne une augmentation du taux de croissance du mutant *ftnA*Ω et de la souche sauvage en milieu L, cependant la croissance résiduelle du mutant *ftnA*Ω est toujours 80% de celle de la souche sauvage. Nous avons examiné l'effet de chélateurs du fer tels que le 2,2'-dipyridyl et l'EDDHA, sur les propriétés de croissance du mutant *ftnA*Ω. Le 2,2'-dipyridyl pénètre dans la cellule où il chélate le fer ferreux causant ainsi une rapide carence intracellulaire en fer alors que l'EDDHA chélate le fer ferrique présent dans le milieu de culture. La présence de chélateurs du fer (EDDHA ou 2,2'-dipyridyl) en milieu L inhibe la croissance du mutant *ftnA*Ω, mais n'exacerbe pas plus son défaut de croissance en comparaison à la souche sauvage. L'ensemble des courbes de croissance est présenté sur la figure 53. Il faut signaler également que le mutant *ftnA*Ω forme des colonies de taille plus petite que la souche sauvage sur milieu solide LA.



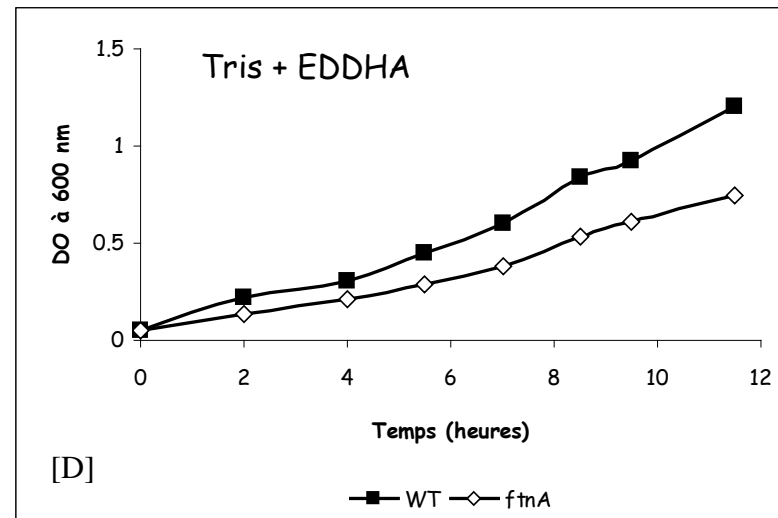
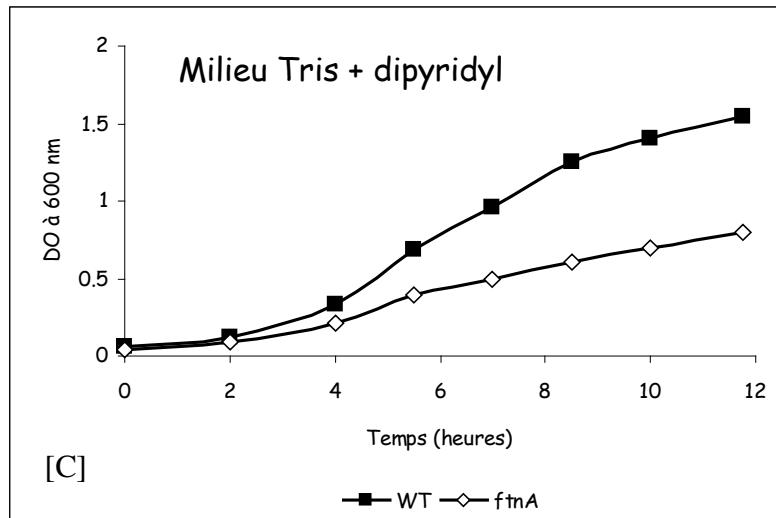
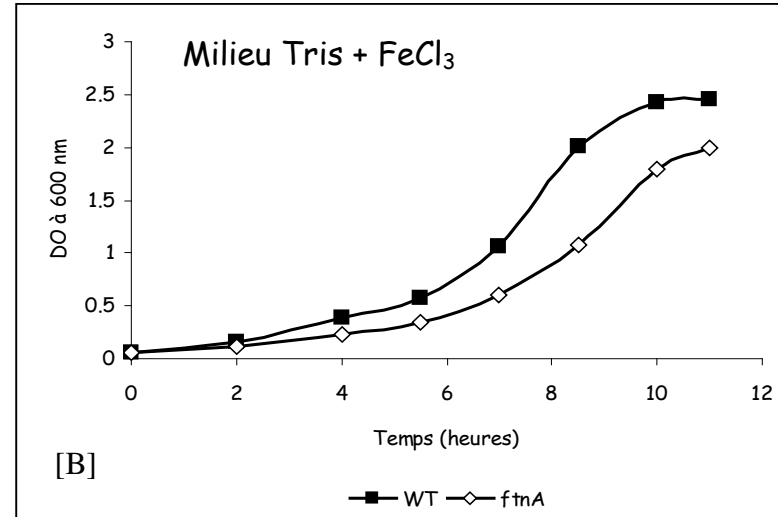
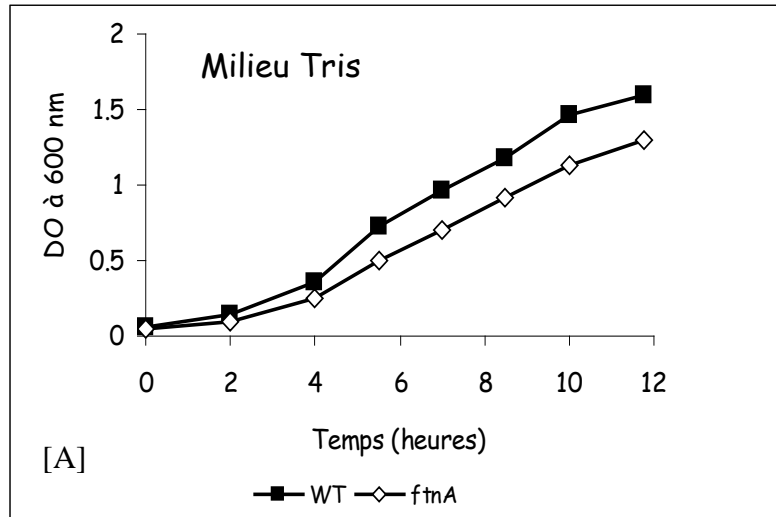


Figure 55 : Propriétés de croissance du mutant *ftnA* en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], 2,2'-dipyridyl (100 μM) [C] et EDDHA (37 μM) [D].

Pour être plus explicite, nous avons représenté les résultats sous forme de pourcentages de croissance résiduelle, qui ont été déterminés à partir des valeurs de densités cellulaires finales après 9 h de croissance en milieu L pour le mutant *fnA* rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 dans les mêmes conditions (fig. 54).

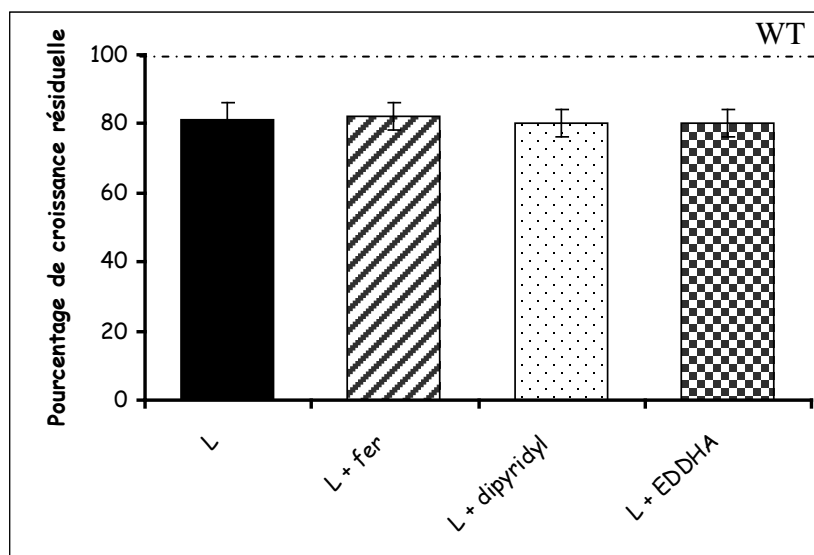


Figure 54 : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *fnA* en milieu L (hachuré), en présence de fer (noir), 2,2'-dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Le pourcentage de croissance résiduelle a été déterminé à partir des valeurs de DO<sub>600</sub> après 9 h de croissance pour le mutant *fnA* rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 dans les mêmes conditions.

En revanche, le mutant *fnA* croît significativement moins bien que la souche sauvage en milieu minimum Tris. Il atteint une densité cellulaire finale moindre par rapport à celle de la souche sauvage au bout de 9 heures (fig. 55). De plus, le taux de croissance du mutant *fnA* est diminué par rapport à celui de la souche sauvage. Cependant, la phase de latence du mutant *fnA* est comparable à celle de la souche sauvage. Le mutant *fnA* affiche un pourcentage de croissance résiduelle de près de 78% par rapport à la souche sauvage en milieu Tris. Nous avons constaté que l'ajout de fer stimule la croissance du mutant *fnA* et de la souche sauvage en milieu Tris. Les souches atteignent une densité cellulaire finale supérieure à celle observée en absence de fer ajouté et leur taux de croissance est également à la hausse. Néanmoins, le défaut de croissance du mutant *fnA* n'est pas compensé par cet apport de fer et est toujours de l'ordre de 20 % en comparaison à la souche sauvage. Les résultats montrent que l'ajout de 2,2'-dipyridyl ou d'EDDHA affecte beaucoup plus la croissance bactérienne du mutant *fnA* que la souche sauvage en milieu Tris (fig. 55).

Cependant, l'effet le plus significatif a été obtenu avec le 2,2'-dipyridyl. La croissance résiduelle du mutant *ftnA*Ω est réduite de 50% et 35% en présence de 2,2'-dipyridyl et EDDHA respectivement dans le milieu Tris en comparaison à la souche sauvage. Nous avons représenté les résultats sous forme de pourcentages de croissance résiduelle, qui ont été déterminés à partir des valeurs de densités cellulaires finales après 9 h de croissance en milieu minimum Tris pour le mutant *ftnA*Ω rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* dans les mêmes conditions (fig. 56).

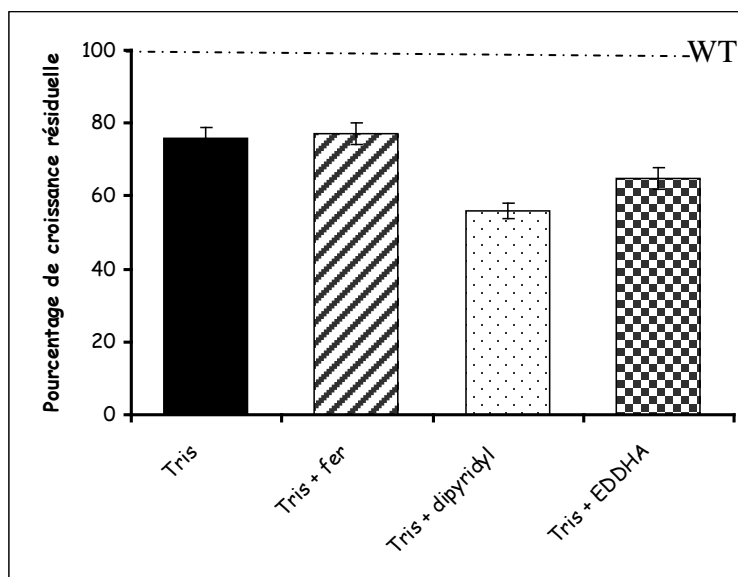
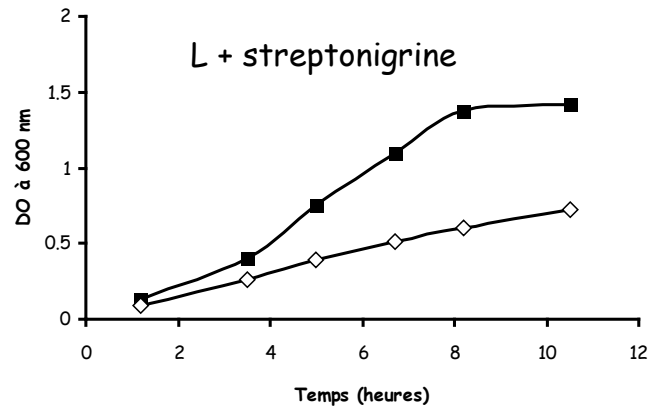


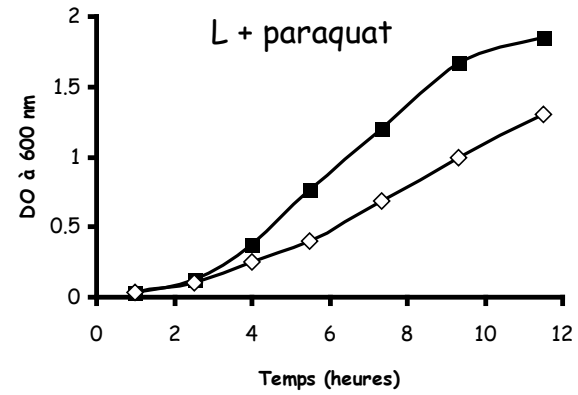
Figure 56 : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *ftnA*Ω en milieu Tris (noir), en présence de fer (hachuré), 2,2'-dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Le pourcentage de croissance résiduelle a été déterminé à partir des valeurs de  $DO_{600}$  après 9 h de croissance pour le mutant *ftnA*Ω rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 dans les mêmes conditions.

En conclusion, la présence d'une ferritine FtnA fonctionnelle est critique pour la croissance bactérienne, et d'autant plus en milieu carencé en fer. Cette protéine joue donc un rôle important dans la croissance bactérienne en conditions de carence en fer en apportant le fer nécessaire au métabolisme bactérien, métal indispensable dans divers processus biologiques essentiels à la vie. L'absence de la protéine FtnA avec son stock de fer biodisponible conduit à une croissance réduite dans ces conditions.



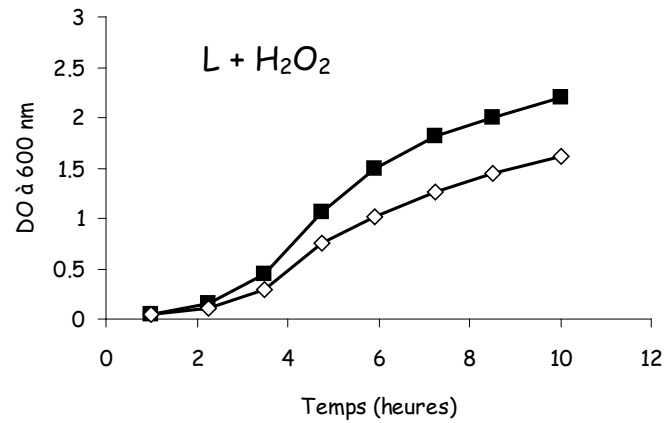
[A]

■ WT ◇ *ftnA*



[B]

■ WT ◇ *ftnA*



[C]

■ WT ◇ *ftnA*

Figure 57 : Sensibilité à la streptonigrine (1,5 µg/mL) [A], au paraquat (6 µM) [B] et au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) [C] du mutant *ftnA* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les souches bactériennes ont été cultivées à 30°C en milieu L. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

#### IV- Sensibilité au stress oxydant du mutant *ftnA* $\Omega$

La concentration intracellulaire en fer peut influencer la sensibilité au stress oxydant, c'est pourquoi nous avons testé la contribution de la ferritine FtnA à la résistance au stress oxydant. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'aptitude d'un mutant *ftnA* $\Omega$  à croître en présence de streptonigrine, de paraquat, de peroxyde d'hydrogène ou de spermine NONOate. Une des expériences caractéristique est présentée en figure 57.

La streptonigrine est un antibiotique activé par le fer qui génère des anions superoxyde et radicaux par réduction en fonction de la concentration en fer. Son effet est d'autant plus important que la concentration en fer intracellulaire réactif augmente. L'ajout de streptonigrine (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) affecte beaucoup plus la croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  que celle de la souche sauvage. Nous avons constaté que le mutant *ftnA* $\Omega$  présente 50% de croissance résiduelle par rapport à la souche sauvage après 10 h 30 de culture en présence de streptonigrine.

Le paraquat diffuse à travers les enveloppes cellulaires et génère dans le cytoplasme des anions superoxyde  $\text{O}_2^-$ . Ces anions superoxyde oxydent les clusters [Fe-S] des enzymes et les inactivent. Nous avons constaté que le paraquat affecte drastiquement la croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage. Il affiche 70 % de croissance résiduelle par rapport à la souche sauvage en présence de 6  $\mu\text{M}$  de paraquat après 11 h 30 de culture.

Le peroxyde d'hydrogène s'attaque aux résidus cystéine et méthionine des protéines en oxydant les atomes de soufre et aux clusters [4Fe-4S] de protéines (Imlay, 2003). L'addition de peroxyde d'hydrogène à la concentration 0,3 mM inhibe la croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  alors que la souche sauvage est peu sensible à cette concentration. Il présente près de 60 % de croissance résiduelle en comparaison à la souche sauvage après 10 h de croissance.

Nous avons également testé l'effet d'un donneur de NO, la spermine NONOate, sur le mutant *ftnA* $\Omega$ . Alors que la souche sauvage est peu sensible à la spermine NONOate (70  $\mu$ M), la croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  est réduite (fig. 58). Il atteint une DO<sub>600</sub> finale de 1,6 alors que la souche sauvage croît jusqu'à une DO<sub>600</sub> finale de 2 après 9 h 45 de culture.

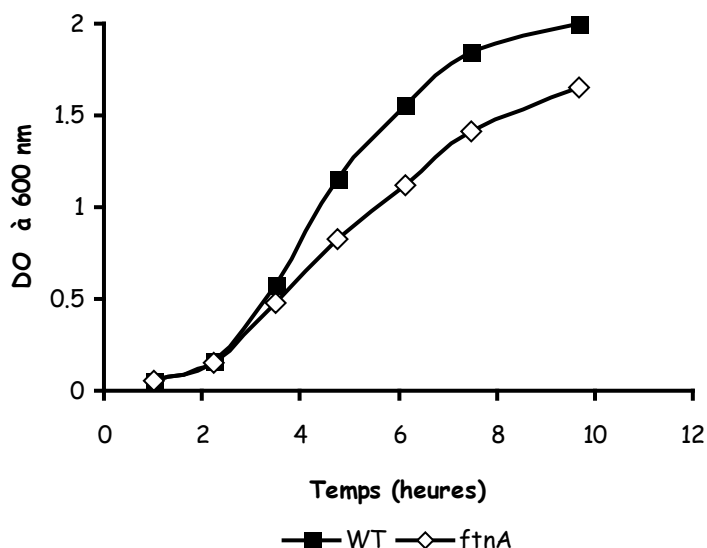


Figure 58 : Sensibilité à la spermine NONOate (70  $\mu$ M) du mutant *ftnA* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les souches bactériennes ont été cultivées à 30°C en milieu L en présence de 70  $\mu$ M de spermine NONOate ajoutés dès l'inoculation. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

Par ailleurs, la présence en trans du plasmide multicopie portant le gène *ftnA* supprime la sensibilité du mutant *ftnA* $\Omega$  à ces composés (données non présentées).

En conclusion, l'inactivation du gène *ftnA* rend plus sensible les bactéries de façon générale au stress oxydant et nitrosylant. FtnA protègerait les bactéries face au stress oxydant sans doute en séquestrant le fer sous une forme non réactive limitant ainsi sa toxicité. Nous formulons l'hypothèse que l'inactivation du gène *ftnA* entraînerait une augmentation de la concentration intracellulaire en fer réactif aboutissant à une surproduction d'espèces actives de l'oxygène et à un stress oxydant. Nous pourrions alors envisager de vérifier si l'ajout du chélateur intracellulaire du fer 2, 2'-dipyridyl supprime la sensibilité du mutant *ftnA* $\Omega$  aux différents agents testés comme la streptonigrine ou le paraquat. Cependant ce chélateur affecte aussi la croissance de ce mutant, c'est pourquoi il pourrait être difficile d'interpréter les résultats.

Pour corroborer notre hypothèse, nous avons testé le comportement d'un mutant *sufC* affecté dans la biosynthèse des centres [Fe-S] en conditions de stress oxydant (streptonigrine) lorsque le gène *ftnA* est surexprimé. Le gène *sufC* code une ATPase de type ABC qui interagit avec les protéines SufB et SufD impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] en conditions de stress oxydant et de carence en fer (Nachin et al., 2001 ; 2003). Le mutant *sufC* est sensible à la streptonigrine de par l'augmentation de la concentration intracellulaire en fer réactif. L'expression en trans du gène *ftnA*, cloné dans le vecteur multicopie pBC-SK<sup>+</sup>, rétablit la croissance du mutant *sufC* dans ces conditions (fig. 59). La ferritine FtnA « pompe » l'excès de fer réactif présent dans le mutant *sufC* et le maintient sous une forme non réactive. Ainsi, la surproduction de la ferritine FtnA réduit la sensibilité du mutant *sufC* à la streptonigrine.

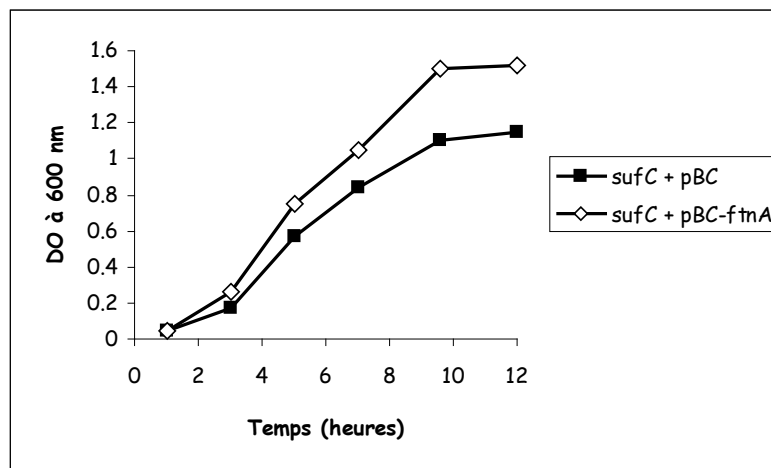


Figure 59 : Influence de l'expression de la ferritine FtnA sur la sensibilité du mutant *sufC* à la streptonigrine. Les différentes souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées en milieu L en présence de 0,5 µg/mL de streptonigrine. La DO à 600 nm a été suivie au cours du temps.

#### V- Contenu en fer du mutant *ftnAΩ*

Afin de vérifier si le contenu intracellulaire en fer réactif augmente dans le mutant *ftnAΩ*, nous avons entrepris deux approches d'analyse, d'une part la spectrométrie Mössbauer et d'autre part la spectrométrie d'émission ICP-AES.

Dans un premier temps, nous avons dosé la quantité totale de fer dans le mutant *ftnAΩ* en comparaison à la souche sauvage par spectrométrie d'émission atomique de plasma d'argon à couplage inductif ICP-AES.

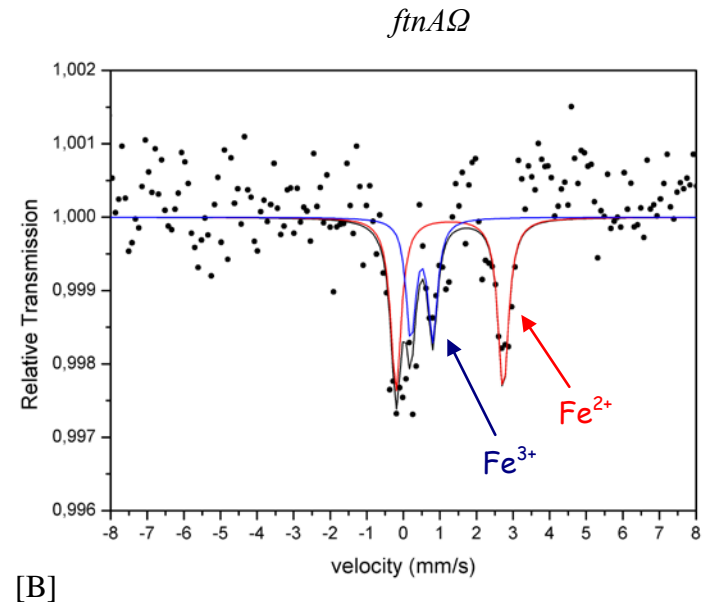
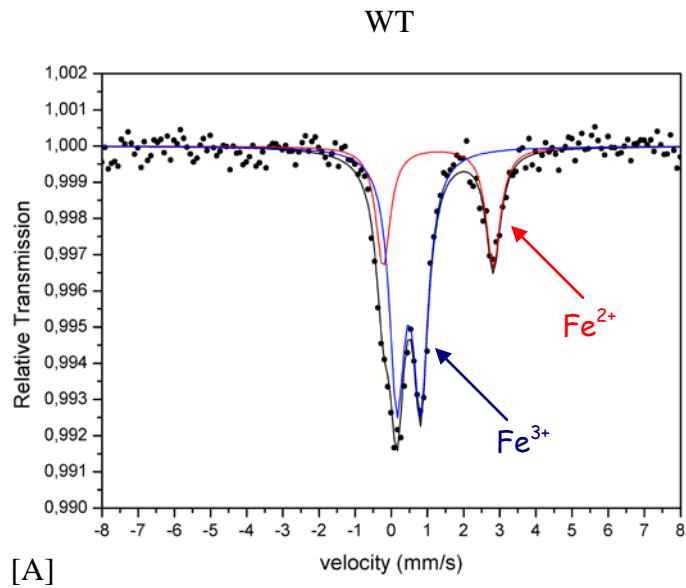


Figure 61 : Spectres Mössbauer de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 [A] et du mutant *fnA* $\Omega$  [B]. Les cellules bactériennes en phase stationnaire ont été marquées avec une solution de 5  $\mu$ M  $Fe^{57}$ /100  $\mu$ M DHBA pendant deux heures, récoltées et analysées par spectrométrie Mössbauer en collaboration avec l'équipe du Pr Berthold Matzanke (Medical University, Lübeck). Le tracé rouge correspond au signal du fer ferreux et le tracé bleu à celui du fer ferrique. Le résultat est donné dans l'histogramme sous forme de pourcentage de surface relative par rapport à la ligne de base.



Nous avons quantifié le fer total du mutant *ftnA* cultivé en milieu riche L ou minimum Tris. Le nombre de cellules utilisé pour le dosage est équivalent entre les différentes souches et est de l'ordre de  $10^{10}$  cellules. Les résultats montrent que quel que soit le milieu le contenu en fer total du mutant *ftnA* n'est pas différent de celui de la souche sauvage (fig. 60). L'absence de la protéine FtnA ne semble pas provoquer une baisse du contenu en fer total dans ces conditions de culture. Il faudrait tester le contenu en fer dans les cellules après plusieurs passages en milieu Tris ou bien après croissance en milieu L avec pré-culture en milieu Tris.

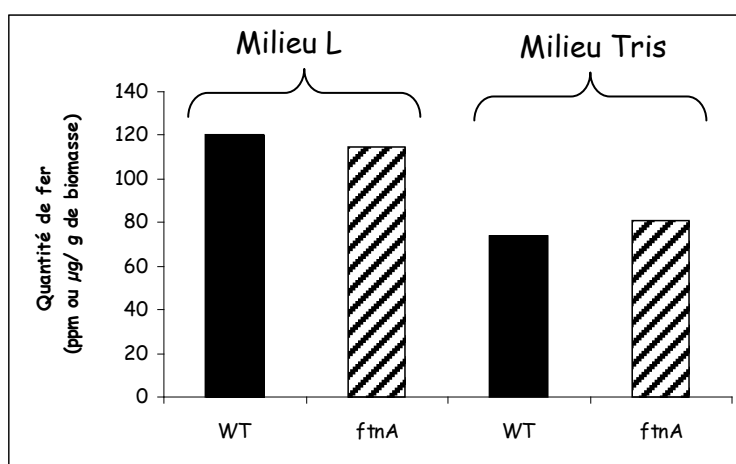


Figure 60 : Contenu en fer total du mutant *ftnA* (hachuré) en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir). Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées en milieu L ou Tris après respectivement 7 h et 13 h de croissance. Les extraits bactériens ont été préparés et leur contenu en fer dosé par spectrométrie d'émission atomique de plasma d'argon à couplage inductif ICP-AES.

Nous avons donc analysé la distribution intracellulaire du fer *in vivo* par spectrométrie Mössbauer pour le mutant *ftnA* en comparaison avec la souche sauvage dans le cadre d'un projet européen de collaboration PROCOPE avec l'équipe du Pr Berthold Matzanke (Medical University, Lübeck). Cette approche permet de déterminer dans quel état redox se trouve le fer et dans quelles proportions. En effet, elle est qualitative et semi-quantitative. Nous avons mené deux expériences, une première sur des cellules en phase stationnaire avec un temps de marquage court de 2 heures et une seconde sur des cellules en phase exponentielle avec un temps de marquage long de 15 heures. Après 2 heures de marquage des cultures bactériennes avec un complexe  $5 \mu\text{M Fe}^{57}/100 \mu\text{M DHBA}$ , nous avons obtenu les spectres présentés sur la figure 61, à partir desquels nous avons calculé les pourcentages de la surface de chacun des signaux rapportée sur la surface totale.

Nous remarquons qu'après 2 heures de marquage le fer présent dans la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* se trouve principalement à l'état ferrique à raison de 67% de fer ferrique pour 33% de fer ferreux (fig. 62). Toutefois, tout le fer ferreux détecté par spectrométrie Mössbauer ne se retrouve pas libre dans le cytoplasme. Il est incorporé au niveau des centres ferroxydases des ferritines et d'autres enzymes. En effet, il est admis que la proportion de fer ferreux libre dans le cytoplasme est très faible et avoisine les 1% (Keyer et *al.*, 1996). Le signal détecté pour la souche sauvage reflétant le fer à l'état ferrique présente un décalage isomère caractéristique des maxi-ferritines bactériennes. La réalisation d'un spectre à basse température confirme une relaxation magnétique caractéristique de la ferritine ou de la bactérioferritine. Chez le mutant *ftnA* le fer ferreux prédomine à plus de 62% contre 38 % de fer ferrique (fig. 62). L'augmentation du ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  et même son renversement par rapport à celui de la souche sauvage suggère une augmentation de la concentration de fer ferreux réactif permettant de comprendre la sensibilité accrue du mutant *ftnA* au stress oxydant ou nitrosylant. Cependant, 38 % du fer intracellulaire est encore à l'état ferrique dans le mutant *ftnA* en étant présent dans les autres ferritines : bactérioferritine et protéines Dps. L'ensemble des résultats suggère que la perte de la ferritine FtnA influence la nature du contenu en fer d'*E. chrysanthemi* confirmant que celle-ci joue un rôle important dans le stockage intracellulaire du fer chez *E. chrysanthemi* 3937. Ainsi, la ferritine FtnA contribue pour une part importante au stockage intracellulaire du fer sous forme ferrique  $Fe^{3+}$ .

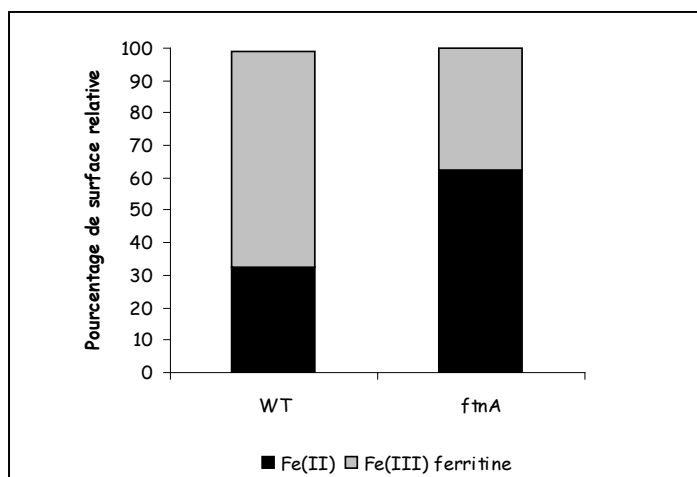


Figure 62 : Distribution du fer intracellulaire dans le mutant *ftnA* en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C en milieu Tris pendant 15 h, puis un mélange de DHBA- $Fe^{57}$  ont été ajoutés dans le milieu de culture. Des extraits ont été prélevés après deux heures, préparés et analysés par spectrométrie Mössbauer.

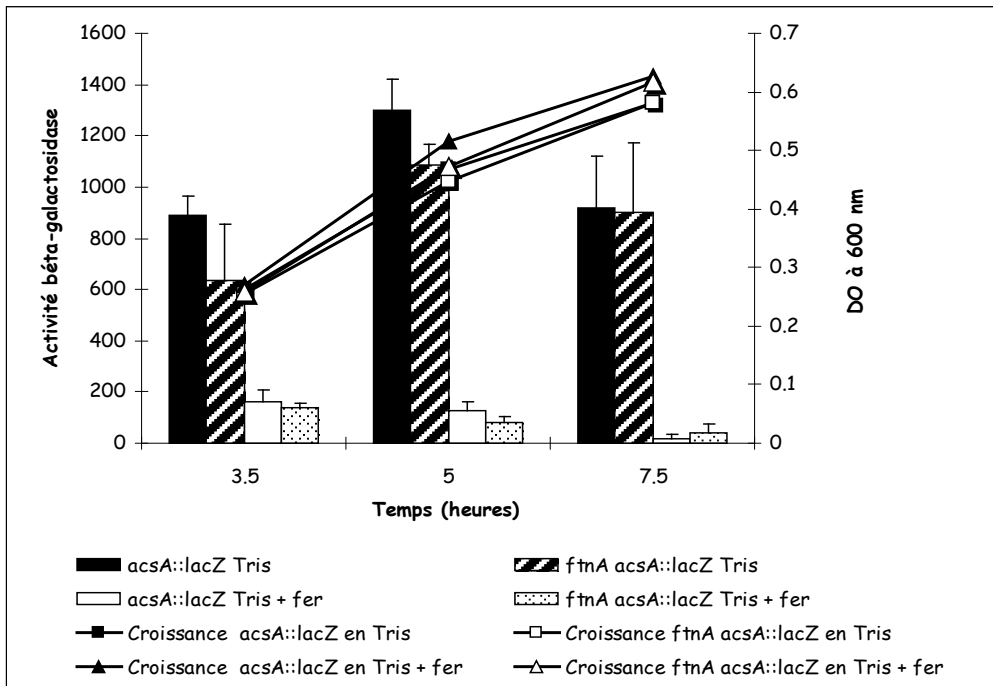


Figure 63 : Influence de la mutation *ftsA* sur l'expression de la fusion *acsA ::lacZ* au cours de la croissance bactérienne. Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C en milieu minimum Tris (carré) et en présence de 30 µM de FeCl<sub>3</sub> (triangle). Les activités β-galactosidase ont été mesurées au cours de la croissance bactérienne après 3 h 30, 5 h et 7 h 30, et exprimées en unités Miller.

Les expériences de marquage long sur 15 heures sont en cours d'analyse. Les premiers résultats indiquent une plus forte accumulation de fer intracellulaire dans ces conditions avec une répartition différente par rapport à la manipulation précédente. Ce marquage réalisé sur des cellules en phase exponentielle ne peut être comparé au précédent car il est à l'origine de nombreux signaux correspondant à différents états du fer intracellulaire.

## VI- Effet sur les systèmes de transport du fer

Nous avons voulu voir si l'absence de ferritine FtnA perturbe les voies de transport du fer à haute affinité dépendant des sidérophores. L'accumulation de fer réactif à l'intérieur de la bactérie peut en effet ralentir ou abaisser la production de ses sidérophores pour limiter l'entrée de ce métal. Deux voies de transport du fer à haute affinité ont été caractérisées au laboratoire chez *E. chrysanthemi* 3937, celles de l'achromobactine et la chrysobactine. En supposant que la concentration en fer réactif  $Fe^{2+}$  augmente dans le mutant *ftnA* $\Omega$ , le répresseur transcriptionnel Fur pourrait en effet réprimer ces voies même en absence de fer exogène ajouté. Pour se faire, nous avons étudié si une mutation dans le gène *ftnA* influence l'expression des gènes de biosynthèse et de transport de la chrysobactine et de l'achromobactine. Nous disposons de fusions transcriptionnelles *lacZ* dans les gènes *fct* et *acsA* impliqués respectivement dans le transport de la chrysobactine et la biosynthèse de l'achromobactine. Nous avons donc transduit la mutation *ftnA* $\Omega$  dans des mutants *fct::lacZ* et *acsA::lacZ* grâce au phage  $\Phi$ EC2 (Résibois et al., 1984).

Nous avons comparé l'expression de l'opéron *acsF acr acsDE ychA acsCBA* grâce à la fusion transcriptionnelle *acsA::lacZ* dans un contexte sauvage et mutant *ftnA* $\Omega$  au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris supplémenté ou non de 30  $\mu$ M de  $FeCl_3$ . Dans la souche sauvage, la fusion *acsA::lacZ* est fortement réprimée en présence de fer dans le milieu de culture Tris et déréprimé par une carence en fer (fig. 63). Le profil d'expression de la fusion *acsA::lacZ* dans le mutant *ftnA* $\Omega$  est semblable à celui de la souche sauvage. Il n'y a pas de dérèglement du gène *acsA* dans le mutant *ftnA* $\Omega$  (fig. 63). Nous constatons que le mutant *ftnA* $\Omega$  n'est pas affecté pour sa croissance dans un contexte *acsA* en comparaison à la souche référence *acsA*. La biosynthèse et le transport de la ferri-achromobactine étant abolie, la concentration intracellulaire en fer est diminuée limitant ainsi ses effets délétères d'autant plus importants en absence de ferritine FtnA.

De même, nous avons comparé les profils d'expression de l'opéron *fct cbsCEBA* grâce à la fusion transcriptionnelle *fct::lacZ* dans un contexte sauvage et un mutant *ftnA* $\Omega$ . Dans la souche sauvage, la fusion *fct::lacZ* est fortement réprimée en présence de fer dans le milieu de culture Tris et déréprimée en absence de fer ajouté (fig. 64). Le profil d'expression de la fusion *fct::lacZ* dans le mutant *ftnA* $\Omega$  est semblable à celui de la souche sauvage. Nous constatons encore que le mutant *ftnA* $\Omega$  n'est pas affecté pour sa croissance dans un contexte *fct* en comparaison à la souche référence *fct*. Le transport de la ferri-chrysobactine étant abolie, il y a moins de fer qui s'accumule intracellulairement limitant ainsi sa toxicité exacerbée en absence de la ferritine FtnA. Nous pourrions vérifier nos dires en testant la sensibilité des mutants *ftnA* $\Omega$  *acs* et *ftnA* $\Omega$  *fct* face au stress oxydant qui est sensée baisser.

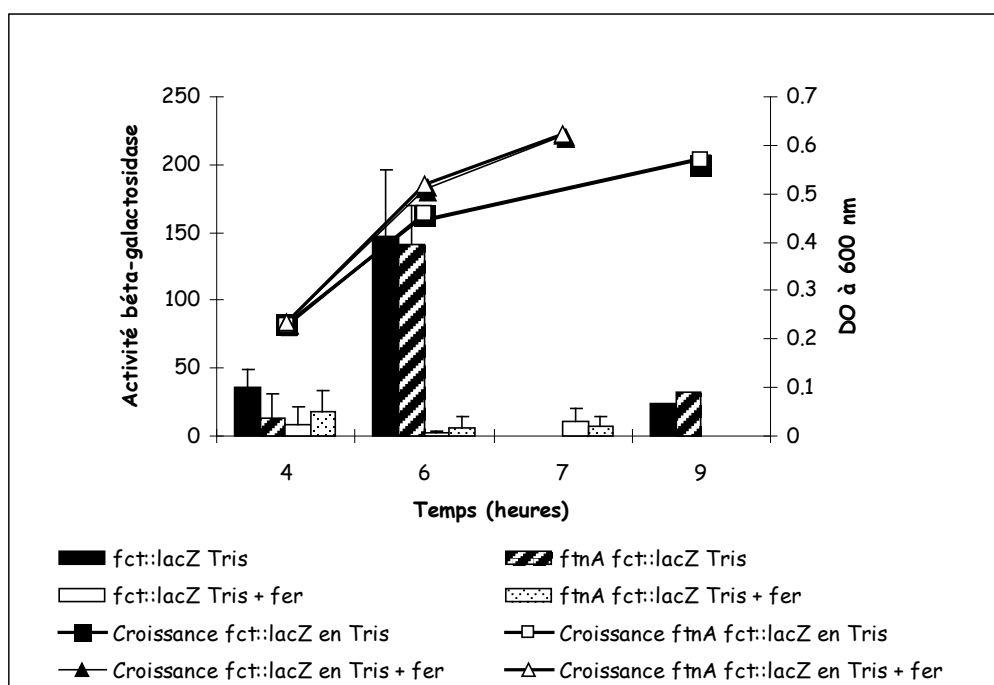


Figure 64 : Influence de la mutation *ftnA* sur l'expression de la fusion *fct::lacZ* au cours de la croissance bactérienne. Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C en milieu minimum Tris (carré) et en présence de 30  $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> (triangle). Les activités  $\beta$ -galactosidase ont été mesurées au cours de la croissance bactérienne après 4 h, 6 h, 7 h et 9 h.

Contrairement à notre hypothèse, les données suggèrent que l'inactivation du gène *ftnA* n'affecte pas le niveau de transcription des gènes de biosynthèse et de transport des deux sidérophores d'*E. chrysanthemi* 3937, mais il n'est pas exclu qu'un contrôle puisse avoir lieu au niveau post-transcriptionnel.

Pour répondre à cette interrogation, nous avons quantifié les quantités respectives de chrysobactine et d'achromobactine produites dans le mutant *ftnA $\Omega$*  en comparaison à la souche sauvage 3937 d'*E. chrysanthemi*. La production d'achromobactine a été mesurée par la méthode de Schwyn et Neilands (1987). Elle permet de détecter les sidérophores quelque soit leurs structures, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser un mutant *fct* incapable de produire et d'excréter la chrysobactine ; dans ce contexte, seule l'achromobactine est produite. Les mutants *fct* et *ftnA $\Omega$  fct* sont cultivés en milieu minimum Tris, conditions inductrices des systèmes de transport de haute affinité. En présence de sidérophore produit par la souche bactérienne, le fer ferrique est capturé par le sidérophore et le Chrome Azurol S déferré n'absorbe plus à la longueur d'onde de 630 nm. Nous remarquons que dans un contexte sauvage l'achromobactine est produite dès le milieu de la phase exponentielle après 4 h 30 de croissance à une DO<sub>600</sub> de 0,35 avec environ 20 équivalents  $\mu$ M DFO par unité de densité optique (fig. 65). Après 7 h 30 de croissance, la quantité d'achromobactine passe à 140 équivalents  $\mu$ M DFO par unité de densité optique. Elle est multipliée par un facteur 7 entre les DO<sub>600</sub> 0,35 et 0,7 dans la souche sauvage. Le mutant *ftnA $\Omega$*  produit autant d'achromobactine que la souche sauvage au cours de la croissance bactérienne (fig. 65).

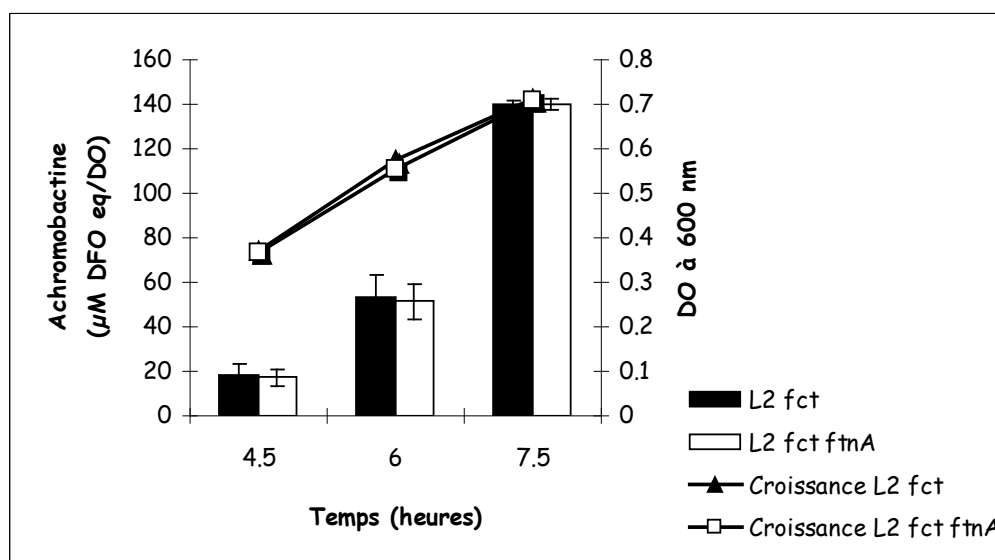


Figure 65 : Production d'achromobactine par la souche référence d'*E. chrysanthemi* 3937 *fct* (noir) et le mutant *fct ftnA $\Omega$*  (blanc) cultivés en milieu Tris. Les courbes de croissance des souches *fct* (triangle) et *fct ftnA $\Omega$*  (carré) sont superposés. Les surnageants de culture ont été prélevés au cours de la croissance bactérienne après 4 h 30, 6 h et 7 h 30 et analysés par le test de Schwyn et Neilands.

La quantité de chrysobactine produite a été estimée grâce au test de Arnow (1937) qui est une méthode colorimétrique de détection des composés de type catéchol. La chrysobactine est produite à partir d'une DO<sub>600</sub> d'environ 0,5 dans un contexte sauvage, légèrement plus tard que l'achromobactine. Nous observons une hausse de la quantité de chrysobactine d'un facteur 3 entre les temps 6 h et 10 h et d'un facteur 5 entre les temps 6 h et 24 h. Nous remarquons que chez le mutant *ftnA* la quantité de chrysobactine produite est équivalente à celle de la souche sauvage au cours de la croissance (fig. 66).

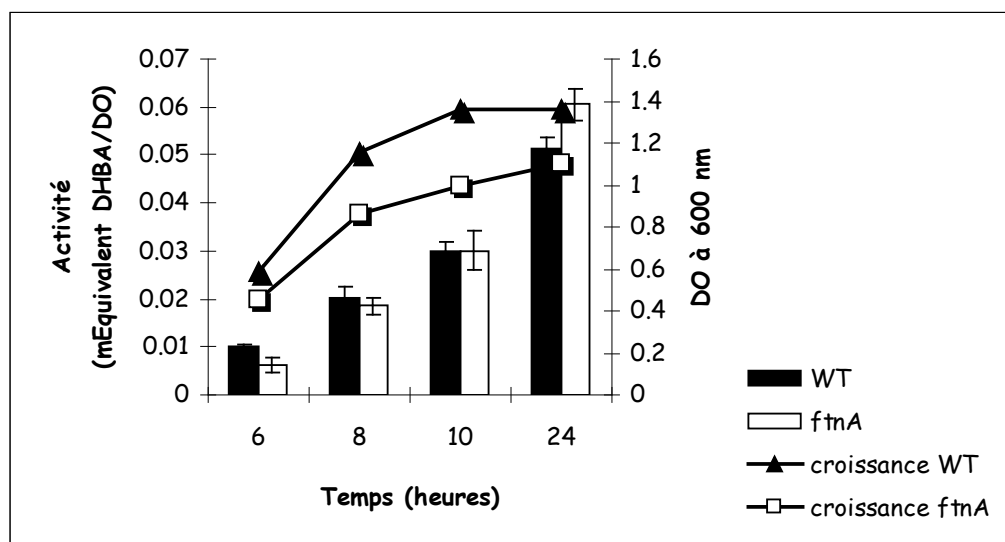


Figure 66 : Production de chrysobactine par la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir) et le mutant *ftnA* (blanc) cultivés en milieu Tris. Les courbes de croissance de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (triangle) et du mutant *ftnA* (carré) sont superposés. Les surnageants de culture ont été prélevés au cours de la croissance bactérienne après 6 h, 8 h, 10 h et 24 h et analysés par le test de Arnow.

Ainsi, l'absence de ferritine FtnA ne semble pas influencer la production des sidérophores chrysobactine et achromobactine en terme de quantité et de cinétique chez *E. chrysanthemi* 3937. Ces résultats ne réfutent pas l'hypothèse d'une augmentation de la concentration intracellulaire en fer en absence de ferritine FtnA. Nous soupçonnons que le pool de fer libéré à partir de la ferritine FtnA n'est pas perçu par le répresseur transcriptionnel Fur car en carence en fer le métal serait directement pris en charge par d'autres protéines.

Par ailleurs, nous avons réalisé des essais de complémentation nutritionnelle pour déterminer si l'absence de ferritine FtnA influence le transport des sidérophores achromobactine ou chrysobactine, de FeCl<sub>3</sub> ou encore d'hème. Une souche d'*E. chrysanthemi* ne produisant pas de sidérophore (double mutant *acs fct*) est incapable de pousser sur un milieu additionné d'un chélateur fort du fer comme l'EDDHA ou le 2,2'-dipyridyl.

L'ajout exogène de sidérophore ou toute autre source de fer ( $\text{FeCl}_3$  ou encore hème) permet de rétablir la croissance bactérienne, un halo est alors observé autour des sources de fer. Nous apprécions la taille des halos de croissance formés pour les deux souches *acs37 fct* (référence) et *acs37 fct ftnA $\Omega$*  après 24 h d'incubation. Nous ne présentons que les résultats obtenus sur milieu supplémenté d'EDDHA sur la figure 67. Le diamètre des halos formés par la souche *acs37 fct ftnA $\Omega$*  en présence d'achromobactine ferrée,  $\text{FeCl}_3$  et d'hème est équivalent à ceux de la souche référence *acs37 fct*. Les observations n'ont pas mises en évidence de différence significative dans le mutant *ftnA $\Omega$*  et la souche sauvage. Cependant, la vitesse d'entrée des sidérophores peut être différente tout en permettant la même croissance que dans un contexte sauvage. En raison de résistances croisées entre les différentes mutations, nous n'avons pas pu analyser par cette technique l'utilisation de chrysobactine.

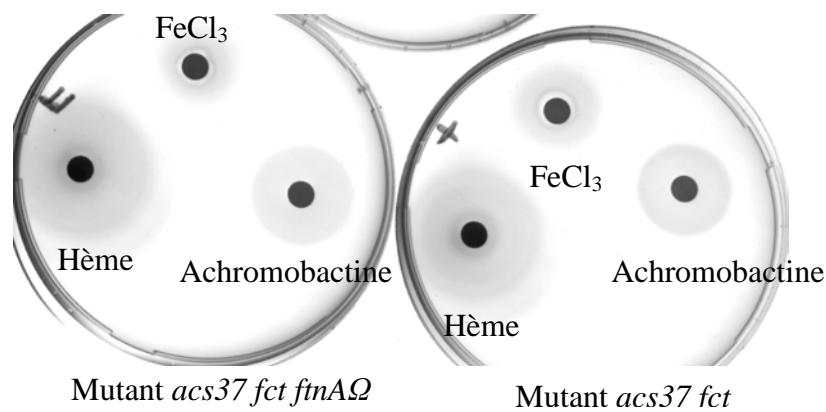


Figure 67 : Test de complémentation nutritionnelle avec les souches *acs37 fct* (référence) et *acs37 fct ftnA $\Omega$* . Les souches ont été ensemencées dans 20 mL de milieu L agar additionné de 100  $\mu\text{M}$  d'EDDHA. 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hème 1 mM, d'achromobactine ferrée 100  $\mu\text{M}$  et de  $\text{FeCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  ont été déposés sur des filtres placés sur la surface de l'agar. Le diamètre des halos de croissance a été mesuré après 24 h d'incubation à 30°C.

## VII- Régulation de l'expression du gène *ftnA*

Si la ferritine FtnA remplit une fonction de stockage du fer, l'expression du gène *ftnA* devrait être modulée en fonction de la concentration en fer et par le régulateur global du métabolisme du fer, Fur (**F**erric **U**ptake **R**epressor). Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'expression du gène *ftnA* grâce à une fusion transcriptionnelle et par la technique de Northern. Nous avons construit une fusion transcriptionnelle dans le gène *ftnA* avec une cassette comportant le gène *uidA* codant une  $\beta$ -glucuronidase délété de sa région promotrice (Bardonnnet et Blanco, 1992). La cassette *uidA* interrompt le gène *ftnA* au site de restriction unique *MunI* et se trouve sous le contrôle du promoteur du gène *ftnA*. La construction résultante est recombinée et intégrée dans le chromosome d'*E. chrysanthemi* 3937.



Nous avons mesuré l'expression de la fusion *ftnA::uidA* au cours de la croissance bactérienne en milieu minimum L ou Tris. Le fer est ajouté ou non dans le milieu de culture des cellules en phase exponentielle de croissance. Les résultats indiquent que le gène *ftnA* est exprimé à un niveau basal au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris (fig. 68). L'ajout de fer induit le gène *ftnA* au cours de la croissance bactérienne avec une forte hausse de l'activité  $\beta$ -glucuronidase après une heure correspondant à une induction d'un facteur 5, mais décline rapidement atteignant un niveau équivalent à celui de départ lors de la fin de la phase exponentielle de croissance (fig. 68). La hausse observée d'activité de la fusion transcriptionnelle *ftnA::uidA* par le fer peut être attribuée à Fur senseur du fer dans la cellule. Le fer s'accumule dans la cellule grâce aux systèmes de transport du fer qui sont induits en milieu minimum Tris. La concentration intracellulaire augmente activant la protéine Fur qui réprime en retour les systèmes de transport du fer. Il en résulte une baisse de la concentration intracellulaire en fer qui aboutit à une baisse du niveau de transcription du gène *ftnA*.

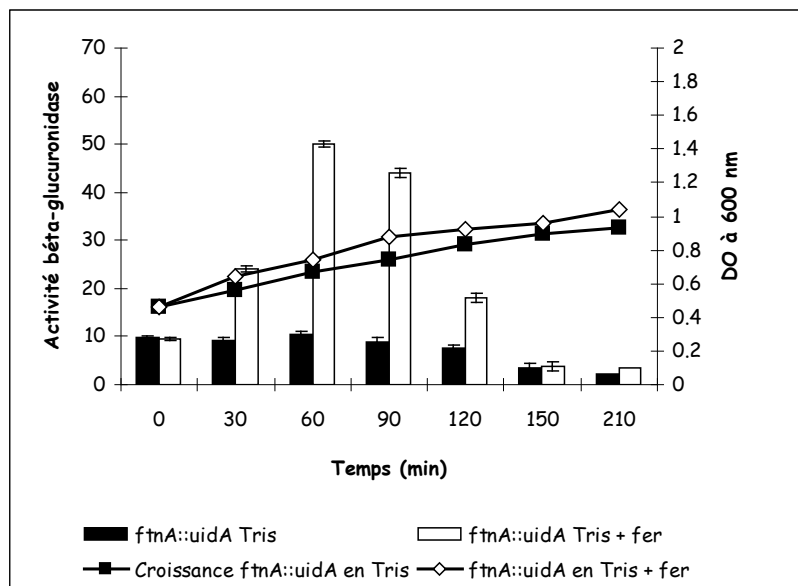


Figure 68 : Expression de la fusion *ftnA::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu Tris. La souche *ftnA::uidA* a été cultivée à 30°C en milieu minimum Tris (carré noir) et en présence de  $\text{FeCl}_3$  (losange blanc). L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée au cours du temps toutes les 30 min pour les échantillons en milieu Tris (noir) et pour les échantillons en milieu Tris en présence de fer (blanc).

Nous pouvons remarquer que le gène *ftnA* est exprimé en absence de fer en milieu L à un niveau basal semblable à celui observé en milieu Tris. Après l'ajout de fer, l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la fusion *ftnA::uidA* augmente significativement avec une forte hausse après une heure et demi correspondant à un facteur 6. Contrairement à la régulation en milieu Tris, l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la fusion *ftnA::uidA* se maintient à un niveau élevé même en phase stationnaire. En milieu L, le fer est transporté de manière non spécifique et par conséquent la concentration cellulaire en fer ne diminue pas au cours de la croissance. Dans ces conditions, le niveau de transcription du gène *ftnA* ne décroît pas (fig. 69).

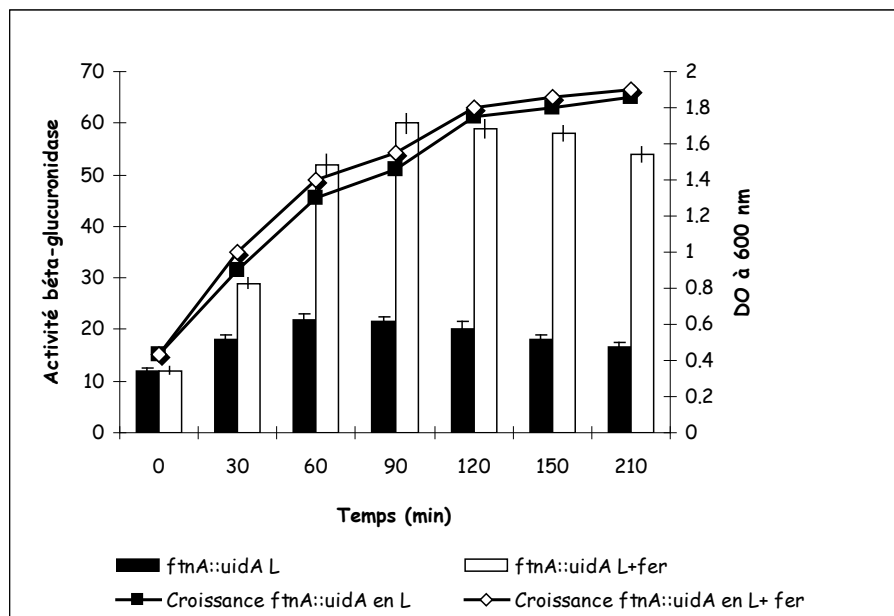
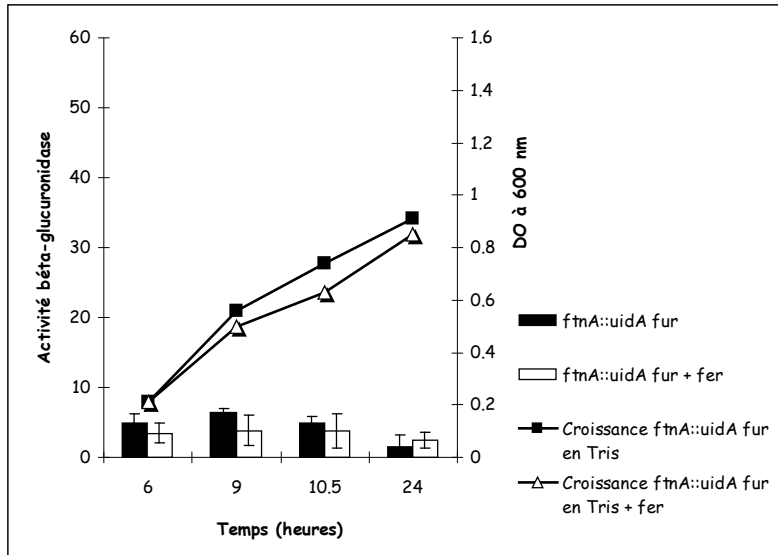
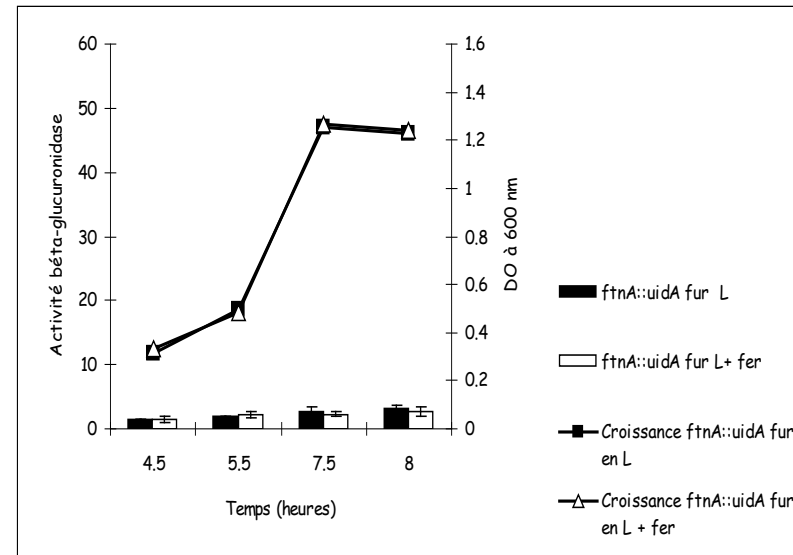


Figure 69 : Expression de la fusion *ftnA::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L en absence (noir) et en présence de  $\text{FeCl}_3$  (blanc). La souche *ftnA::uidA* a été cultivée à 30°C en milieu riche L en absence (carré noir) et en présence de  $\text{FeCl}_3$  (losange blanc). L'activité  $\beta$ -glucuronidase a été mesurée au cours du temps toutes les 30 min pour les échantillons en milieu L (noir) et pour les échantillons en milieu L en présence de fer (blanc).



[A]



[B]

Figure 70 : Expression de la fusion *ftnA::uidA* dans le mutant *furΩ* d'*E. chrysanthemi* 3937 au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris et milieu L. La souche *ftnA::uidA furΩ* [B] a été cultivée en milieu minimum Tris [A] et milieu riche L [B] en absence (noir) ou en présence (blanc) de  $FeCl_3$ . L'activité β-glucuronidase de la fusion *ftnA::uidA* a été mesurée dans la souche sauvage [A] et le mutant *furΩ* [B] à différents temps au cours de la croissance bactérienne.

Afin de vérifier que l'induction du gène *ftnA* par le fer est dépendante du répresseur transcriptionnel Fur, nous avons analysé l'expression de la fusion *ftnA::uidA* dans un mutant *fur $\Omega$*  et dans un contexte sauvage *fur $^+$*  au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris ou L en présence ou non de fer ajouté. Dans un mutant *fur $\Omega$*  en milieu Tris, nous n'observons plus l'induction par le fer du gène *ftnA*, le niveau d'expression de la fusion transcriptionnelle *ftnA::uidA* restant très bas en présence ou absence de fer. En milieu riche, on observe aussi une très faible expression du gène *ftnA* dans un génotype *fur $\Omega$*  (fig. 70). Ces données montrent que la protéine Fur d'*E. chrysanthemi* 3937 contrôle positivement le gène *ftnA* en réponse à la disponibilité en fer. Dans un contexte sauvage, la bactérie produit la ferritine FtnA en réponse à la présence de fer dans le milieu.

Afin de corroborer les résultats obtenus précédemment avec la fusion transcriptionnelle, nous avons étudié l'expression du gène *ftnA* par la technique de Northern. Pour cela, la souche sauvage a été cultivée en milieu Tris et 20  $\mu$ M de  $\text{FeSO}_4$  ont été ajoutées ou non à  $\text{DO}_{600}$  de 0,6. Nous détectons la présence d'un transcrit *ftnA* d'environ 750 bases correspondant à la taille attendue en présence de fer ajouté dans le milieu de culture. La quantité de transcrits *ftnA* est fortement induite dès 30 min après ajout de 20  $\mu$ M de  $\text{FeSO}_4$  et reste constante après 90 min. Par contre en carence en fer, nous n'observons pas de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne à  $\text{DO}_{600}$  équivalentes (fig. 71). Nous confirmons ainsi que l'expression du gène *ftnA* est stimulée par le fer en milieu minimum Tris.

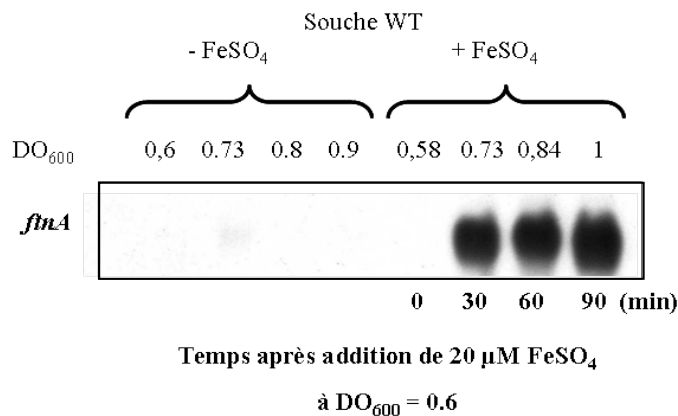
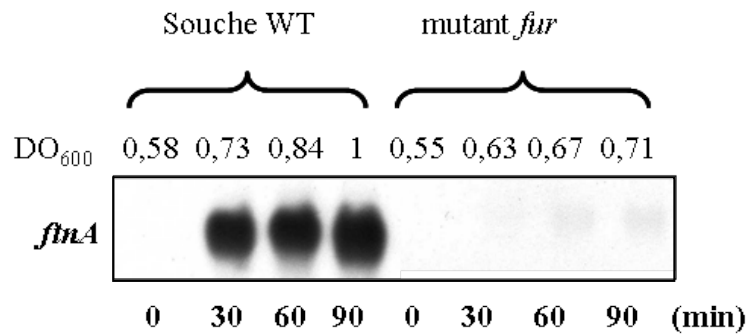
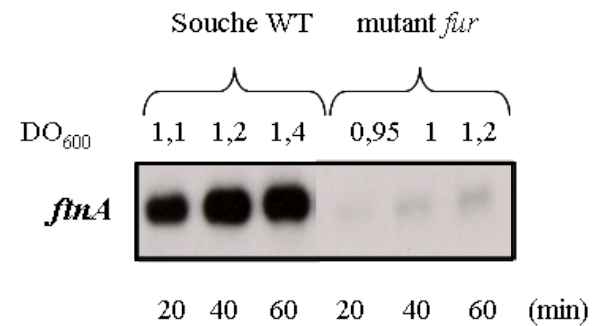


Figure 71 : Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu minimum Tris jusqu'à une densité optique de  $\text{DO}_{600} = 0,6$ , à laquelle ont été ajoutés 20  $\mu$ M de  $\text{FeSO}_4$ . Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs totaux ont été extraits et quantifiés.



Temps après addition de 20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>

[A]



Temps après addition de 20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>

[B]

Figure 73 : Accumulation de transcrits *fnA* au cours de la croissance bactérienne détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *fur* $\Omega$ . Les bactéries ont été cultivées en milieu minimum Tris [A] ou L [B]. 20 $\mu$ M de FeSO<sub>4</sub> ont été ajoutés à une densité optique de DO<sub>600</sub> ~ 0,5 en milieu Tris et ~ 1 en milieu L. Des prélèvements ont été effectués au cours de la croissance bactérienne à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

De même, lorsque la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* est cultivée en milieu L, nous constatons que l'expression du gène *ftnA* est fortement induite par l'addition de fer. En revanche, le gène *ftnA* est peu transcrit en carence en fer, en présence de 2,2'-dipyridyl (fig. 72).

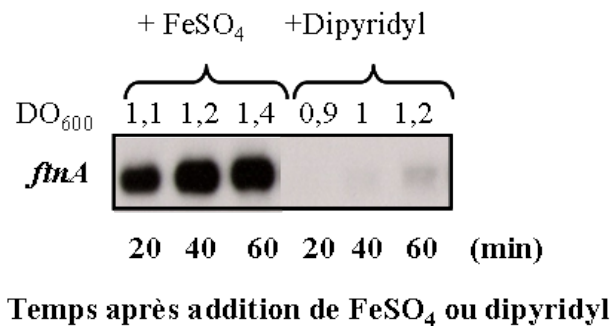


Figure 72 : Accumulation de transcrits *ftnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu riche L jusqu'à une densité optique DO<sub>600</sub> ~ 1 à laquelle ont été ajoutés 20 µM de FeSO<sub>4</sub> ou 200 µM de 2,2'-dipyridyl. Des prélèvements ont été effectués toutes les 20 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Nous avons aussi étudié l'expression du gène *ftnA* dans un contexte *fur*<sup>-</sup> en comparaison avec la souche sauvage. La souche sauvage et le mutant *fur*<sup>Ω</sup> ont été cultivés en milieu Tris ou milieu L et 20 µM de FeSO<sub>4</sub> y ont été ajoutés à DO<sub>600</sub> de 0,6. Dans un mutant *fur*<sup>Ω</sup> quel que soit le milieu de culture utilisé, nous n'observons plus de hausse de la quantité de transcrits *ftnA* après l'ajout de fer. Dans un génotype *fur*<sup>-</sup>, le gène *ftnA* est très peu transcrit et son niveau d'expression est comparable à celui observé en carence en fer (fig. 73). Ces résultats confirment que Fur régule positivement la transcription du gène *ftnA* en présence de fer.

L'ensemble des résultats montre que Fur contrôle positivement le gène *ftnA* en présence de fer. Cette régulation est-elle directement exercée par Fur ? Pour y répondre, nous avons recherché dans la région promotrice du gène *ftnA* une boîte Fur. Aucune boîte Fur correspondant à la séquence consensus définie chez *E. coli* n'a été trouvée en amont du gène *ftnA*, suggérant que l'expression du gène *ftnA* est influencée par Fur de manière indirecte. Or, Fur est classiquement décrit comme un répresseur transcriptionnel et non comme un activateur.

	1	10	20	30	40	50	60	70
Ech	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Ec	ATGCGTTCCGGGAAGCCAAATGAATCCATCCTTGACTCATCGCGGTTTTGCTGTGAAGGCACGACAT							
Consensus	.....gC <b>ATCaggaaGAC</b> .Ca <b>TCGCGG</b> agaac <b>CTG</b> ..AA <b>aGCACGACAT</b>							
	71	80	90	100	110	120	124	
Ech	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----							
Ec	TGCTCACATTGCTTCCAGTATTACTTAGCCAGCTCGGGTGC <b>TGGCTTTTTTTTA</b>							
Consensus	TGCTCACATTGCTTCCAGTATTACTTAGCCAGC <b>.CGGGTGC</b> TGGCTTTTTTTT <b>a</b>							

Figure 75 : Alignement des séquences du gène *ryhB* d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) et *E. coli* K12 (Ec).

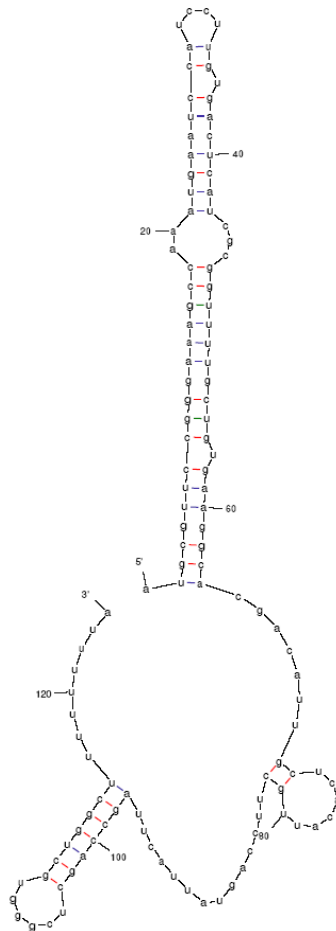


Figure 76 : Structure secondaire de RyhB d'*E. chrysanthemi* 3937 obtenue avec le programme Mfold de M. Zuker.

Un travail réalisé par Massé et Gottesman a mis en évidence l'existence d'un petit ARN anti-sens RyhB chez *E. coli* qui explique comment Fur peut induire l'expression de certains gènes. RyhB régule négativement l'expression de certains gènes en s'appariant à l'extrémité 5' de l'ARN messager cible au niveau ou à proximité du site de fixation du ribosome (RBS), affectant ainsi la stabilité et / ou la traduction du messager. Le gène *ryhB* est lui-même réprimé par Fur, ce qui implique une régulation positive lorsque le fer est abondant dans l'environnement. D'ailleurs, ils ont montré que le gène *fnA* d'*E. coli* est induit par Fur par l'intermédiaire de ce petit ARN. Nous avons alors regardé s'il existe également un petit ARN homologue à RyhB chez *E. chrysanthemi*. Effectivement, nous avons identifié dans le génome d'*E. chrysanthemi* un gène *ryhB* homologue à celui d'*E. coli* dans la région intergénique d'environ 1200 nucléotides entre le gène *glpC* appartenant à l'opéron *glpABC* codant une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et le gène *yhhW* codant une protéine de fonction inconnue (fig. 74). Le gène *ryhB*, ORF ABF 61312, est situé en position 4509497 du chromosome d'*E. chrysanthemi* 3937.

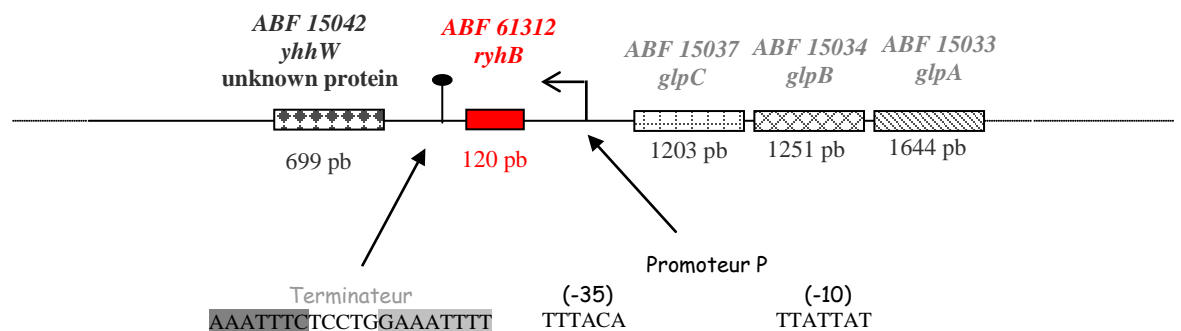


Figure 74 : Représentation schématique de l'environnement du gène *ryhB* d'*E. chrysanthemi* 3937.

Le gène *ryhB* d'*E. chrysanthemi* est plus long que celui d'*E. coli* avec 124 nucléotides contre 90 pour *E. coli*. Il présente plus de 92 % d'identité de séquence avec celui d'*E. coli* si on ne considère que les 70 derniers nucléotides (fig. 75). Cette séquence de RyhB d'*E. chrysanthemi* 3937 comporte la région fortement conservée qui forme la structure tige-boucle centrale de RyhB d'*E. coli* K12. D'ailleurs, la structure secondaire du petit ARN RyhB, prédite chez *E. chrysanthemi* grâce au programme Mfold, est comparable à celle d'*E. coli* et présente 3 structures tiges-boucles (fig. 76).



Nous avons identifié un promoteur potentiel pour le gène *ryhB* avec les sites -10 et -35 et un site d'initiation de la transcription (fig. 77). Cette séquence promotrice est identique à celle du gène *ryhB* d'*E. coli* et son analyse révèle la présence d'une boîte Fur au niveau du site -10 appuyant l'hypothèse que Fur régule le gène *ryhB* en empêchant l'initiation de sa transcription par l'ARN polymérase en présence de fer. Cette boîte Fur est bien conservée, elle présente 17 bases conservées sur les 19 définies chez *E. coli* GATAATGAT(A/T)ATCATTATC (fig. 77).



Figure 77 : Aligment des séquences nucléiques des régions promotrices du gène *ryhB* d'*E. coli* (Ec) et *E. chrysanthemi* 3937 (Ech). Les boîtes -35 et -10 sont encadrées et la séquence consensus de fixation du répresseur transcriptionnel Fur est soulignée en vert.

Par ailleurs, l'analyse de la séquence nucléique du gène *ftnA* et la détermination de son départ de transcription a permis de mettre en évidence deux régions de complémentarité avec RyhB en aval du site +1 de transcription du gène *ftnA* et de proposer un appariement possible avec RyhB grâce au programme lfasta (fig. 78).

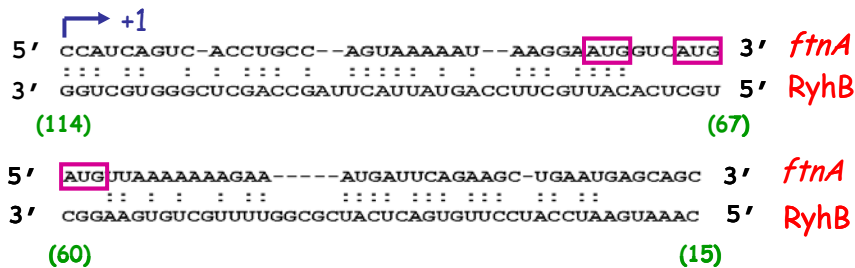


Figure 78 : Régions de complémentarité entre RyhB et le transcrit *ftnA* chez *E. chrysanthemi* 3937. Les chiffres indiqués entre parenthèses désignent les positions des nucléotides de l'ARN RyhB.

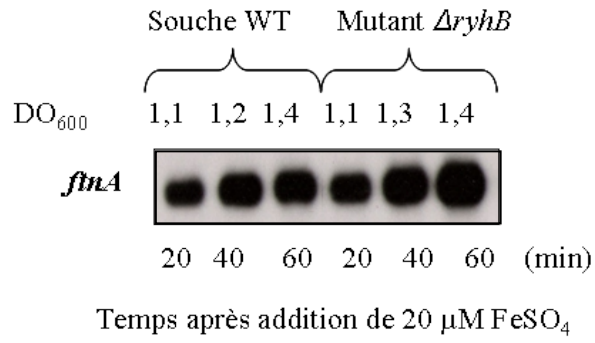


Figure 79 : Accumulation de transcrits *fnA* au cours de la croissance bactérienne en milieu L en présence de 20 $\mu\text{M}$  de FeSO<sub>4</sub>, détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant  $\Delta ryhB$ . Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique de DO<sub>600</sub> ~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20  $\mu\text{M}$  de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 20 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Ces données de séquence soutiennent donc l'hypothèse que le transcrit *ftnA* est une cible de l'ARN anti-sens RyhB. Pour confirmer ce contrôle, nous avons analysé par Northern-blot l'accumulation de transcrits dans un mutant  $\Delta ryhB$  après ajout de fer en comparaison à la souche sauvage. Nous avons donc construit un mutant de délétion du gène *ryhB* noté  $\Delta ryhB$  en amplifiant les régions flanquantes du gène *ryhB* par PCR avec les couples d'amorces RyhB1s/RyhB1r et RyhB2s/RyhB2r. Ces régions flanquantes ont été recollées au site *Bam*HI où a été introduit la cassette  $\Omega$  Spec<sup>R</sup> et le fragment résultant a été cloné dans le vecteur pBC-SK<sup>+</sup> utilisé pour être recombiné dans le chromosome d'*E. chrysanthemi*. Nous avons analysé le contenu en transcrits *ftnA* dans un mutant  $\Delta ryhB$  et la souche sauvage en cours de croissance en milieu L. Il apparaît que le transcrit *ftnA* est plus abondant dans un mutant  $\Delta ryhB$  en comparaison à la souche sauvage 60 min après addition de fer, soit à une DO<sub>600</sub> d'environ 1,4 (fig. 79).

En conclusion, le gène *ftnA* est régulé en fonction de la biodisponibilité en fer. En effet, il est induit par l'apport exogène de fer et réprimé par la carence en fer en milieu riche L ou minimum Tris. Cette induction par le fer est dépendante du répresseur transcriptionnel Fur qui réprime la transcription du petit ARN anti-sens RyhB, qui régule négativement l'expression du gène *ftnA* en bloquant sa transcription et/ou sa traduction comme le suggère la proximité de l'appariement de RyhB avec le site +1 (fig. 78).

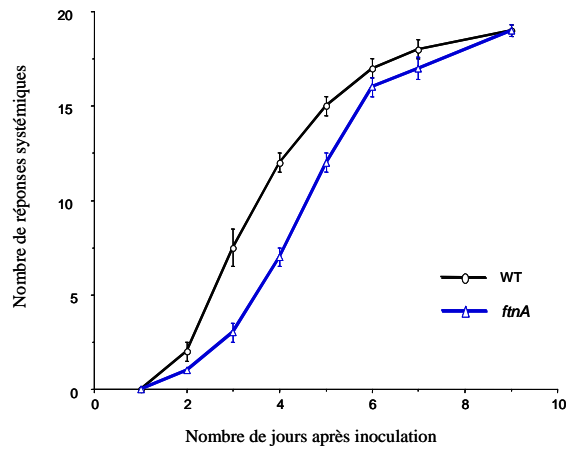


Figure 80 : Pouvoir pathogène du mutant *ftnA* et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* sur saintpaulia.



Figure 81 : Pouvoir pathogène du mutant *ftnA* et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* sur endive.

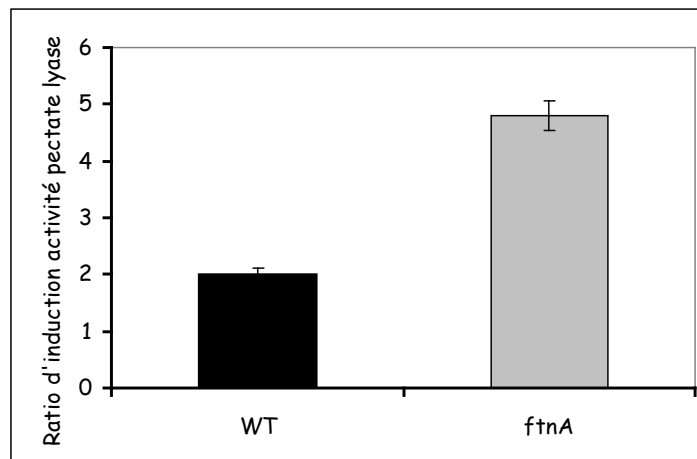


Figure 82 : Activité globale pectate lyase du mutant *ftnA* et de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi*. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris en présence de PGA (condition inductrice). Le ratio indiqué en ordonnée désigne le rapport d'induction par la carence en fer de l'activité pectate lyase.

### VIII- Pouvoir pathogène du mutant *ftnA*Ω

Nous avons aussi étudié l'implication de la ferritine FtnA dans la virulence de *E. chrysanthemi* 3937. La virulence a été testée sur des plantes de saintpaulia et sur des feuilles d'endives. Un mutant *ftnA*Ω affiche un retard dans l'apparition de symptômes systémiques sur saintpaulia en comparaison à la souche sauvage. Trois jours après inoculation, le nombre de réponses systémiques pour le mutant *ftnA*Ω est de 3 contre 7 pour la souche sauvage (fig. 80). Néanmoins, après 9 jours, le nombre de réponses systémiques est le même pour la souche sauvage et le mutant *ftnA*Ω. Une fois que les lésions sont apparues, les vitesses de progression des symptômes sont les mêmes pour le mutant *ftnA*Ω et la souche sauvage.

La mutation du gène *ftnA* affecte aussi la virulence de la bactérie sur feuilles d'endive. Nous avons observé un retard dans l'apparition des symptômes sur feuilles d'endives par rapport à la souche sauvage. Après 36 h, les zones macérées par le mutant *ftnA*Ω se limitent à la zone entourant le point d'inoculation et représentant environ 1/4 de la surface des feuilles d'endives alors que les feuilles inoculées par la souche sauvage étaient macérées au 2/3 (fig. 81). Cependant, nous avons constaté que le mutant *ftnA*Ω macère entièrement la surface de la feuille d'endive après 72 h comme la souche sauvage.

Ce retard de développement des symptômes observé sur plantes est sans doute lié à la sensibilité du mutant *ftnA*Ω à la carence en fer et au stress oxydant, des conditions rencontrées au cours de l'infection. En effet, la plante en réponse à l'infection induit des mécanismes de défense, notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène et la séquestration du fer. Malgré sa sensibilité au stress oxydant et à la carence en fer, le mutant *ftnA*Ω est capable de macérer la feuille de saintpaulia à la même vitesse que la souche sauvage et de provoquer une infection systémique. Nous avons alors étudié l'effet de l'absence de ferritine FtnA sur la production de pectate lyase qui est un déterminant majeur du pouvoir pathogène chez *E. chrysanthemi* 3937. Nous observons que le mutant *ftnA*Ω présente un facteur d'induction par la carence en fer de l'activité pectate lyase de 5 contre 2 pour la souche sauvage après 7 heures de croissance en milieu Tris en présence de PGA, condition équivalente à celle rencontrée *in planta* (fig. 82). Ce résultat peut apporter une explication pour le développement d'une réponse systémique malgré un retard de macération initial. L'augmentation de l'activité pectate lyase dans le mutant *ftnA*Ω permettrait de contrecarrer le défaut de croissance du mutant *ftnA*Ω dans les premières étapes de l'infection.

## Chapitre III

La bactéroferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937

## I- Construction des mutants *bfr* $\Omega$ , *ftnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$ et *bfd* ::*ahpA3*

Pour déterminer la contribution biologique de la bacferritine Bfr, nous avons construit un mutant *bfr* $\Omega$  dans la souche 3937 d'*Erwinia chrysanthemi* par insertion d'un marqueur de sélection dans le gène *bfr* chromosomique par recombinaison homologue. A cet égard, nous avons amplifié par PCR avec les amorces *bfr1s* et *bfr1r* un fragment d'environ 1,5 kb qui contient les gènes *bfd* et *bfr* organisés en opéron (annexe 2). Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy et la construction plasmidique a été préalablement séquencée. Le locus *bfd-bfr* a été récupéré par digestion de la construction plasmidique précédente par les enzymes de restriction *ApaI* et *SpeI* et cloné dans le plasmide multicopie pBC-SK linéarisé par les mêmes enzymes. Pour inactiver le gène *bfr*, l'interposon  $\Omega$ Km<sup>R</sup> conférant la résistance à la kanamycine est récupéré par digestion du plasmide pHP45 par *SmaI* et cloné au site *PstI* du gène *bfr* préalablement comblé par l'ADN polymérase T4. La construction résultante a été introduite par électroporation dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* où elle a été recombinaisonnée dans le chromosome. Nous avons également construit un double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  en transduisant la mutation *ftnA* $\Omega$ Spec<sup>R</sup> dans le mutant *bfr* $\Omega$ Km<sup>R</sup> grâce au phage  $\Phi$ EC2. Les différents mutants ont été confirmés par PCR et Southern-blot. L'absence de la protéine Bfr a été vérifiée dans les extraits cellulaires du mutant *bfr* $\Omega$  après marquage au Fe<sup>59</sup>. Nous avons également montré l'aptitude de la protéine Bfr à fixer du fer (voir chapitre II, fig. 52).

Comme évoqué au chapitre I, le gène *bfd* est organisé en opéron avec le gène *bfr* ce qui suggère que les produits de ces gènes fonctionnent en coopération. Or peu de travaux ont porté sur la protéine Bfd. C'est pourquoi, un mutant *bfd* non polaire a aussi été construit. Nous avons inséré la cassette *aphA3* à l'intérieur du gène *bfd* au site *NsiI*. Le vecteur pUC18K est digéré par l'enzyme *SmaI* pour libérer le gène *aphA3*, conférant la résistance à la kanamycine. Cette cassette est introduite dans le plasmide pBC-*bfr* préalablement linéarisée par l'enzyme *NsiI* et rendu franc par l'ADN polymérase T4. Le gène *aphA3* est précédé par des codons d'arrêt de la traduction dans les trois phases ouvertes de lecture et est suivi d'un site RBS et d'un codon d'initiation de la traduction, ce qui permet de générer une mutation non polaire. La construction résultante a été introduite dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* où elle a été recombinaisonnée dans le chromosome. La mutation a été confirmée par PCR.

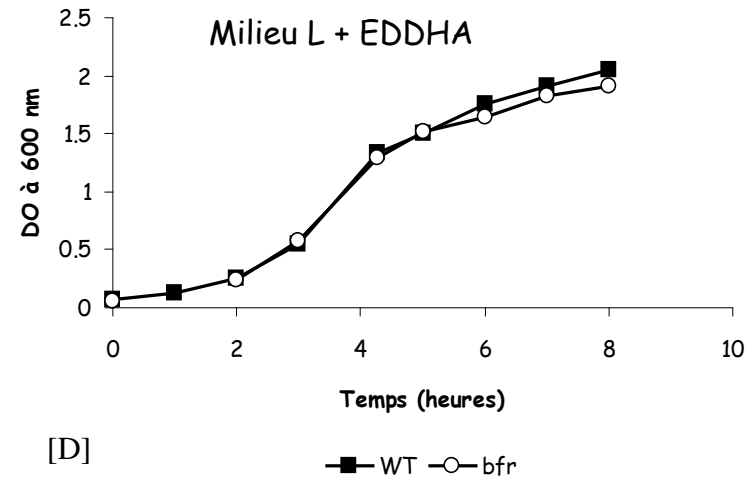
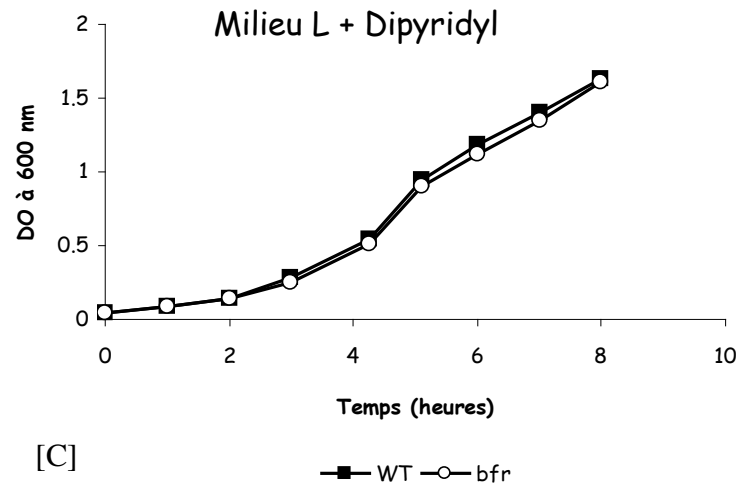
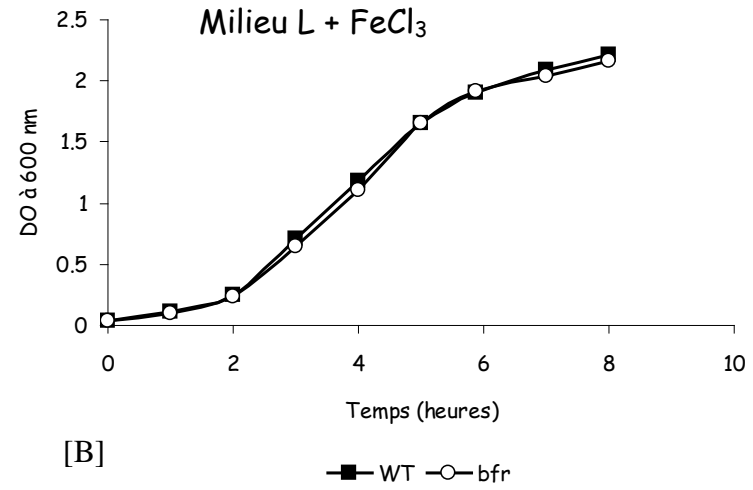
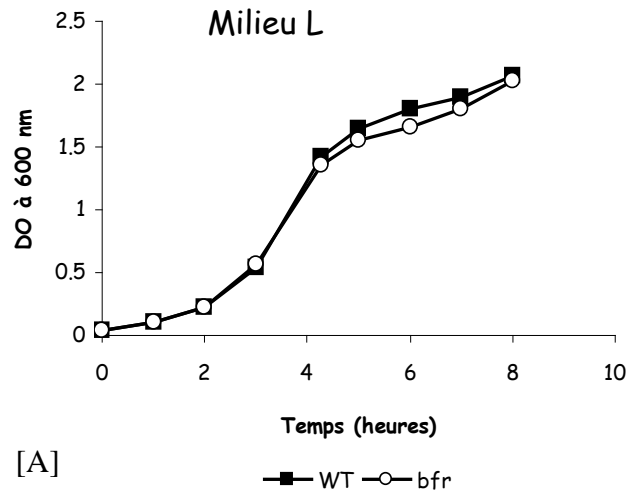
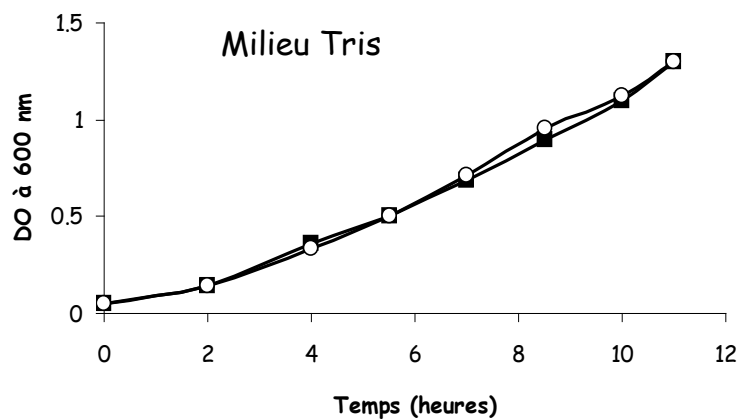


Figure 83 : Propriétés de croissance du mutant *bfr* $\Omega$  en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30  $\mu$ M) [B], 2,2'-dipyrindyl (200  $\mu$ M) [C] et EDDHA (100  $\mu$ M) [D].



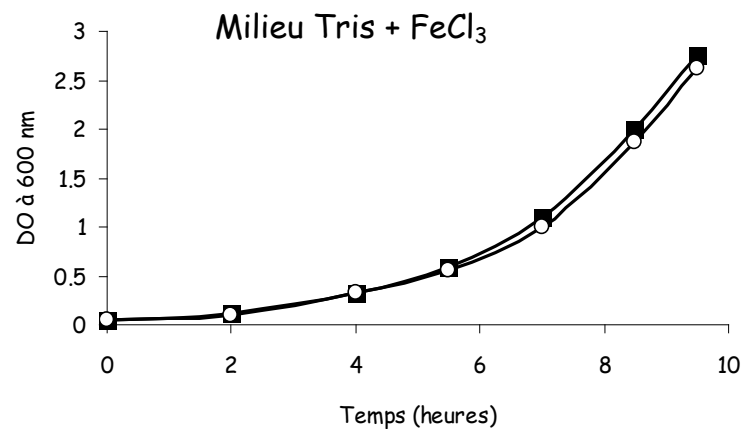
## II- Propriétés de croissance des mutants *bfr* $\Omega$ , *ftnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$ et *bfd* ::*ahpA3*

Les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  ont été caractérisés quant à leurs propriétés de croissance en comparaison à la souche sauvage. La croissance des différentes souches a été réalisée à 30°C et suivie par mesure de la densité optique à 600 nm au cours du temps. Plusieurs expériences ont été réalisées : une seule est présentée. Il apparaît que le mutant *bfr* $\Omega$  se comporte comme la souche sauvage en milieu riche L ou en milieu minimum Tris (fig. 83[A] et 84[A]). L'addition de fer dans les milieux L ou Tris stimule la croissance du mutant *bfr* $\Omega$  mais de manière semblable à celle de la souche sauvage (fig. 83[B] et 84[B]). De même, la présence de chélateurs du fer EDDHA ou 2,2'-dipyridyl affecte la croissance du mutant *bfr* $\Omega$  en milieu L et en milieu Tris tout comme la souche sauvage (fig. 83 et 84 [C] et [D]). L'inactivation du gène *bfr* n'affecte vraisemblablement pas la croissance bactérienne. Ce résultat suggère que la bactérioferritine Bfr contribuerait peu au stockage du fer dans ces conditions de croissance. Les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  forment sur boîtes LA des colonies de même taille et avec la même cinétique que la souche sauvage. En revanche, le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présente un phénotype intermédiaire pour ses capacités de croissance. Nous présentons les courbes de croissance du mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  avec celles obtenues pour le mutant *ftnA* $\Omega$  pour comparaison (fig. 85).



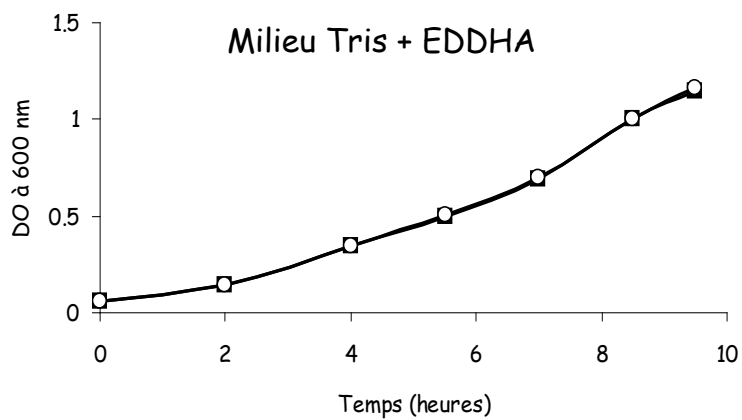
[A]

■ WT ○ bfr



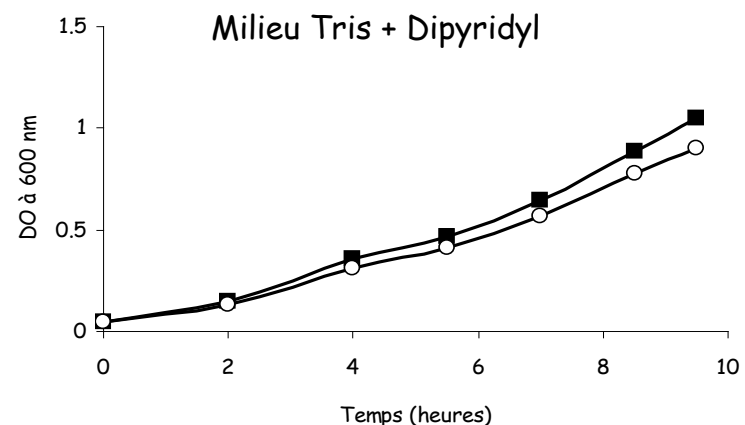
[B]

■ WT ○ bfr



[C]

■ WT ○ bfr



[D]

■ WT ○ bfr

Figure 84 : Propriétés de croissance du mutant *bfr* $\Omega$  en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30  $\mu$ M) [B], EDDHA (37  $\mu$ M) [C] et 2,2'-dipyridyl (100  $\mu$ M) [D].

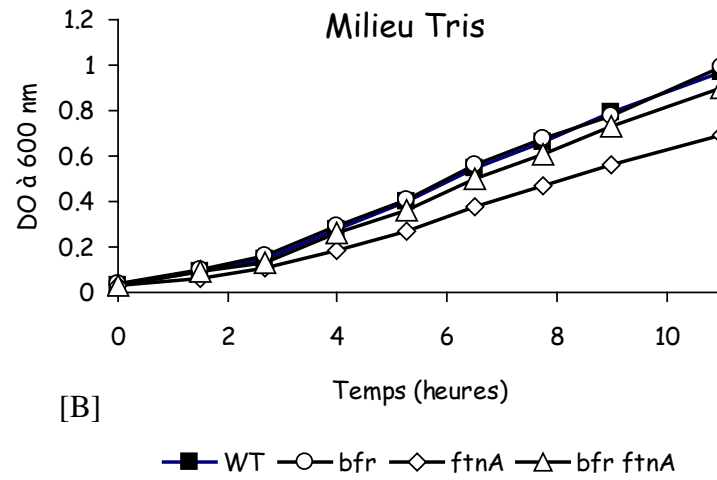
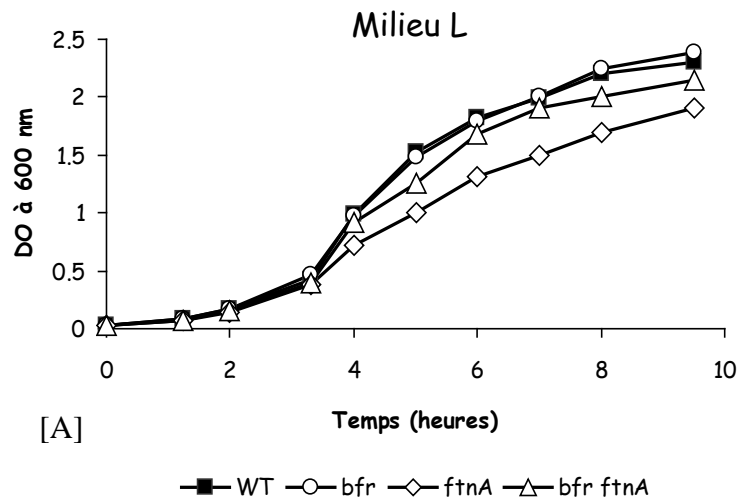
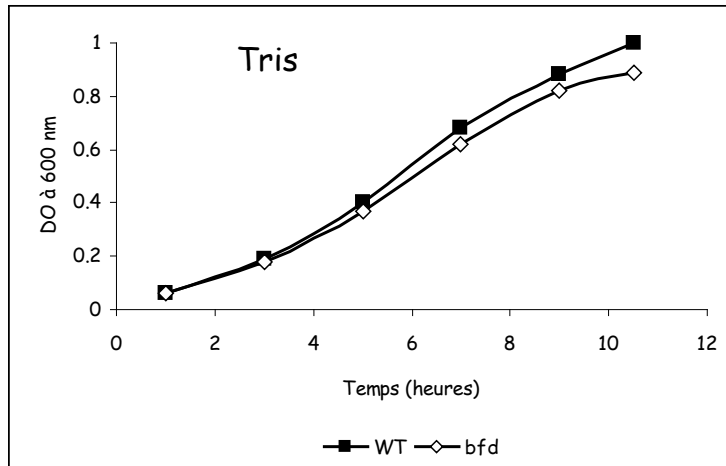
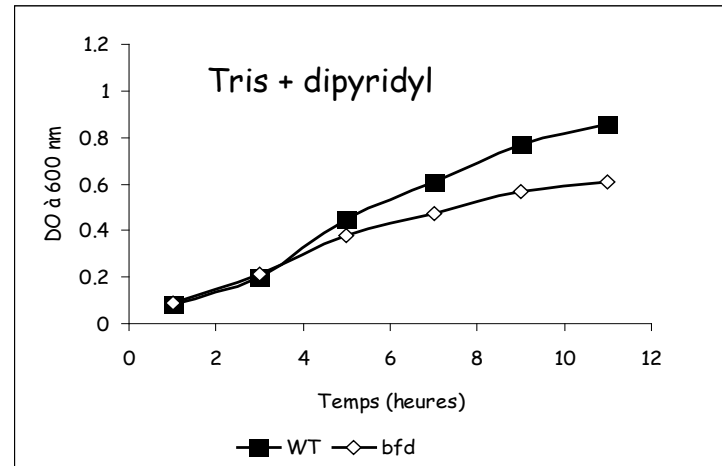


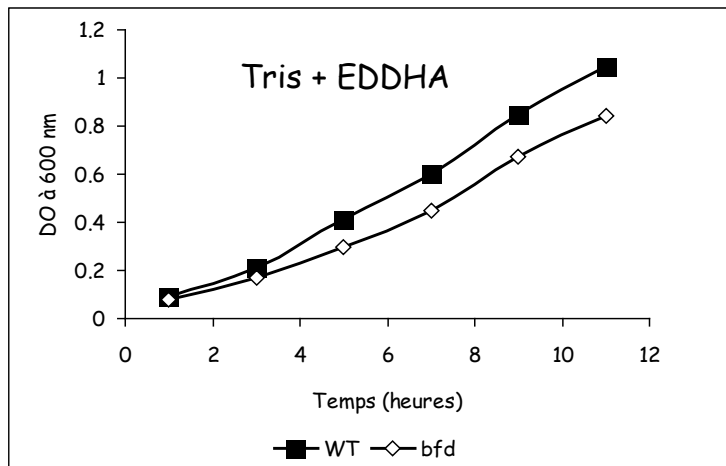
Figure 85 : Propriétés de croissance des mutants *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$ , *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L [A] et en milieu Tris [B]. Les souches ont été cultivées à 30°C sous agitation et la densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.



[A]



[B]



[C]

Figure 87 : Propriétés de croissance du mutant *bfd::aphA3* et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu Tris en présence de glucose comme source de carbone [A], en présence de 100  $\mu\text{M}$  de 2,2'-dipyridyl [B] et 37  $\mu\text{M}$  d'EDDHA [C]. Les souches bactériennes ont été cultivées à 30°C sous agitation. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

Pour résumer nos données, un récapitulatif des propriétés de croissance des mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  est présenté sous forme d'histogramme dans la figure ci-dessous.

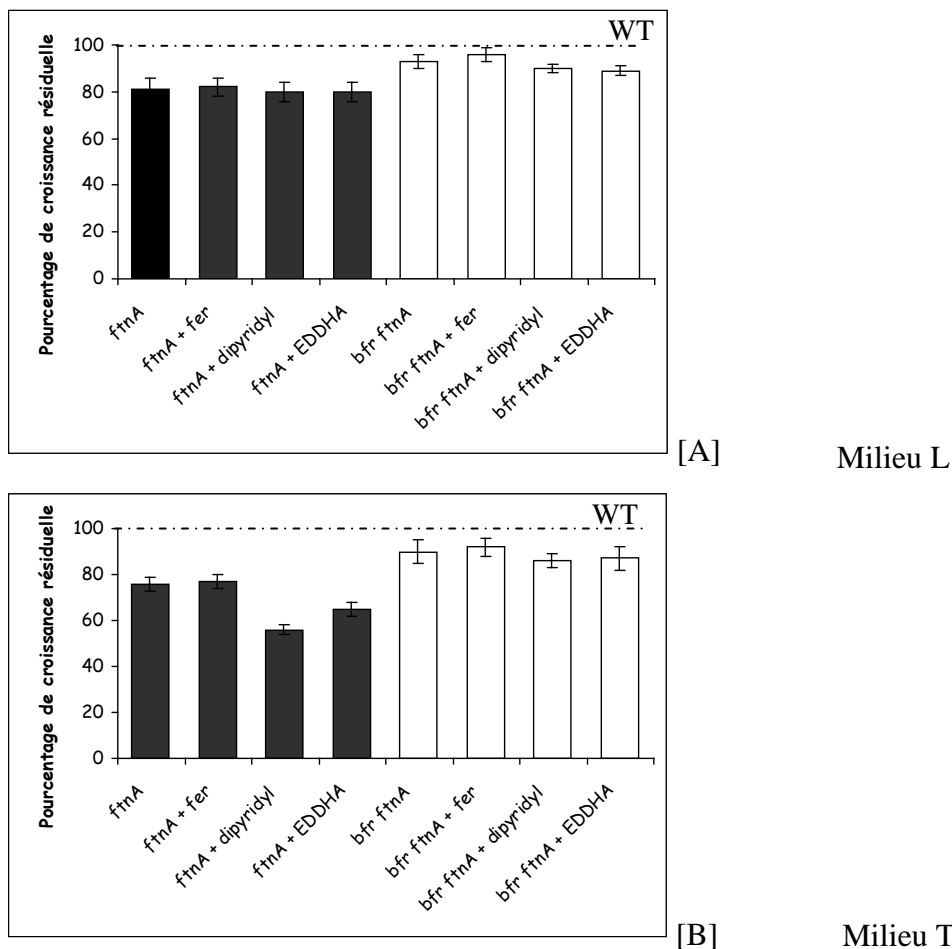
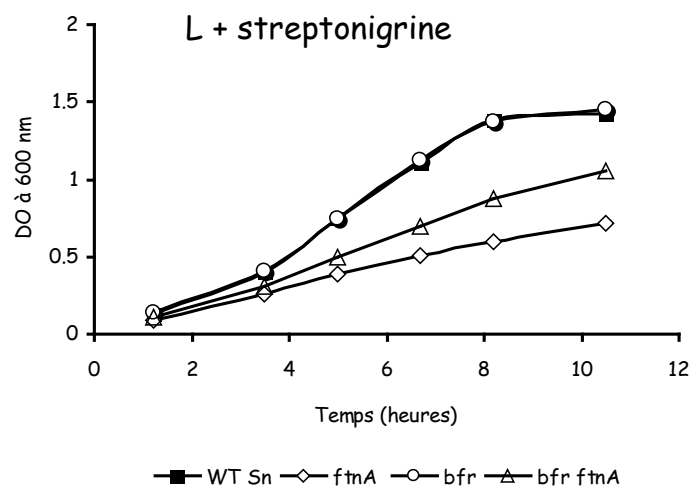
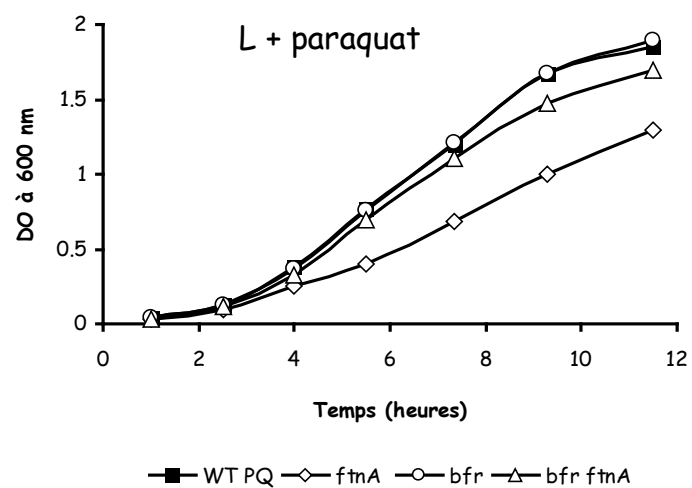


Figure 86 : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance des mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  en milieu L [A] et milieu Tris [B] en absence ou en présence de FeCl<sub>3</sub>, de 2,2'-dipyridyl et d'EDDHA normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Le pourcentage de croissance résiduelle a été déterminé à partir des valeurs de DO<sub>600</sub> après 9 h 30 de croissance pour les mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 dans les mêmes conditions.

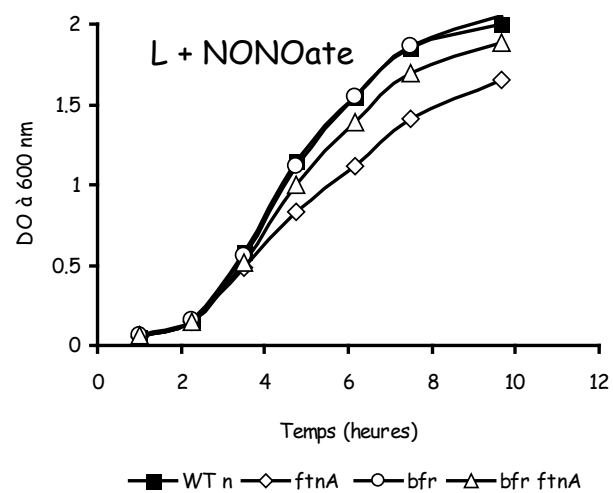
Enfin pour terminer, nous avons caractérisé le mutant *bfd* ::*aphA3*. Ce mutant se comporte comme la souche sauvage lorsqu'il est cultivé en milieu riche L. La croissance bactérienne du mutant *bfd* ::*aphA3* est légèrement affectée lorsqu'il est cultivé en milieu Tris avec 89% de croissance résiduelle et davantage en présence de 2,2'-dipyridyl ou d'EDDHA avec respectivement 75 ± 3% et 77 ± 2,8% de croissance résiduelle (fig. 87). Cette ferrédoxine semble donc être impliquée dans l'adaptation à la carence en fer.



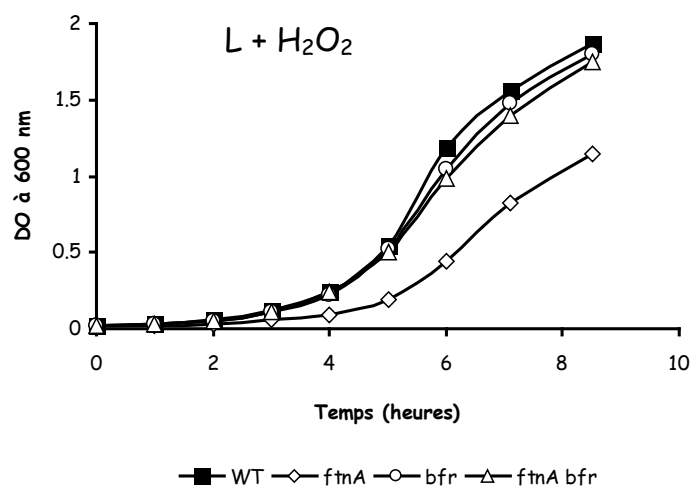
[A]



[B]



[C]



[D]

Figure 88 : Sensibilité à la streptonigrine (1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [A], paraquat (6  $\mu\text{M}$ ) [B], spermine NONOate (70  $\mu\text{M}$ ) [C], et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,3 mM) [D] des mutants *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$ , *ftnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les souches bactériennes ont été cultivées à 30°C en milieu L. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

### III- Sensibilité au stress oxydant des mutants *bfr* $\Omega$ , *ftnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$ et *bfd* ::*aphA3*

Nous avons ensuite testé le comportement des mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  face au stress oxydant généré par la streptonigrine, le paraquat, le peroxyde d'hydrogène et la spermine NONOate. Pour comparaison, nous avons représenté les données obtenues pour le mutant *ftnA* $\Omega$  en parallèle de ceux des deux mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ .

Le mutant *bfr* $\Omega$  n'est pas plus sensible à la streptonigrine que la souche sauvage. En ce qui concerne le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ , il est affecté par la streptonigrine, mais de manière moins sévère que le mutant *ftnA* $\Omega$  (fig. 88 [A]). En présence de paraquat, le mutant *bfr* $\Omega$  se comporte comme la souche sauvage. Toutefois, le paraquat ralentit la croissance du double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  mais son effet est plus réduit que pour le mutant *ftnA* $\Omega$  (fig. 88 [B]). Le mutant *bfr* $\Omega$  n'est pas plus sensible à la spermine NONOate par rapport à la souche sauvage. Quant au double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ , il est légèrement affecté par la spermine NONOate et de manière moins prononcée que le mutant *ftnA* $\Omega$  (fig. 88 [C]). Enfin, les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  parviennent après 8 h 30 de croissance en milieu L en présence de peroxyde d'hydrogène à une DO<sub>600</sub> finale équivalente à celle de souche sauvage : ils ne présentent donc pas de sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène (fig.88 [D]).

D'après ces résultats, la bactérioferritine Bfr ne semble pas être impliquée dans la résistance au stress oxydant et nitrosylant. Contrairement à la ferritine FtnA, elle ne semble contribuer au stockage intracellulaire du fer que de manière mineure. De manière surprenante, la mutation dans le gène *bfr* semble compenser en partie le défaut de croissance lié à l'inactivation du gène *ftnA* ainsi que sa sensibilité au stress oxydant. En ce qui concerne le mutant *bfd* ::*aphA3*, des expériences préliminaires indiquent qu'il n'est pas plus sensible que la souche sauvage au stress oxydant provoqué par le paraquat, la streptonigrine ou la spermine NONOate (données personnelles de Thierry Franza). Ces premiers résultats indiquent que la ferrédoxine Bfd ne confère pas de résistance au stress oxydant.

Comme nous l'avons fait pour la ferritine FtnA, nous avons testé le comportement d'un mutant *sufC* affecté dans la biosynthèse des centres [Fe-S] lorsque le gène *bfr* est surexprimé en conditions de stress oxydant (streptonigrine). Le mutant *sufC* est sensible à la streptonigrine de par l'augmentation de la concentration intracellulaire en fer réactif. L'expression en trans du gène *bfr*, cloné dans le vecteur multicopie pBC-SK<sup>+</sup>, ne restaure pas la croissance du mutant *sufC* dans ces conditions (fig. 89). Ces observations confortent l'idée que la bactérioferritine a une capacité de stockage du fer beaucoup moins importante que celle de la ferritine FtnA.

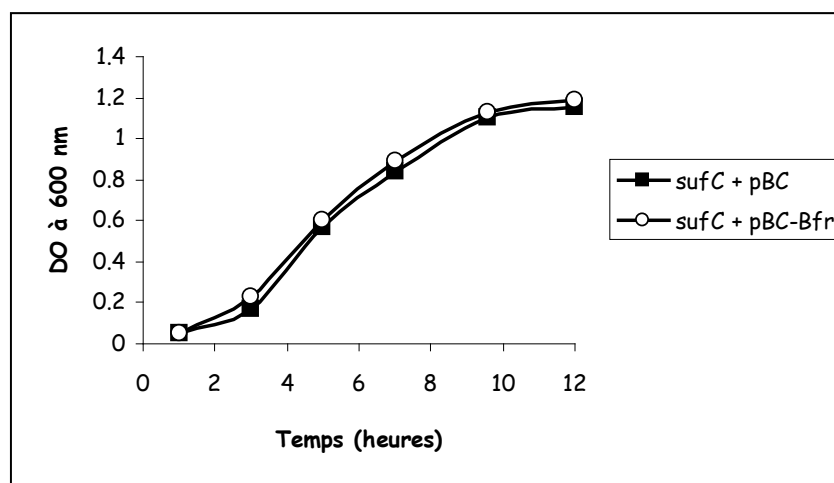


Figure 89 : Influence de l'expression la bactérioferritine Bfr sur la sensibilité à la streptonigrine du mutant *sufC*. Les différentes souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées en milieu L en présence de 0,5 µg/mL de streptonigrine. La DO à 600 nm a été suivie au cours du temps.



#### IV- Contenu en fer du mutant *bfr* $\Omega$

Nous avons étudié, dans un premier temps, l'effet d'une mutation du gène *bfr* sur le contenu en fer en dosant la quantité totale de fer dans le mutant *bfr* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage par spectrométrie d'émission atomique de plasma d'argon à couplage inductif ICP-AES. Le nombre de cellules utilisé pour le dosage est équivalent entre les différentes souches et est de l'ordre de  $10^{10}$  cellules. Le dosage n'a été réalisé qu'une fois et devra être renouvelé pour confirmer les résultats. Il apparaît que les quantités de fer sont équivalentes dans le mutant *bfr* $\Omega$  et la souche sauvage (fig. 90). Le contenu en fer du double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  est en cours d'analyse.

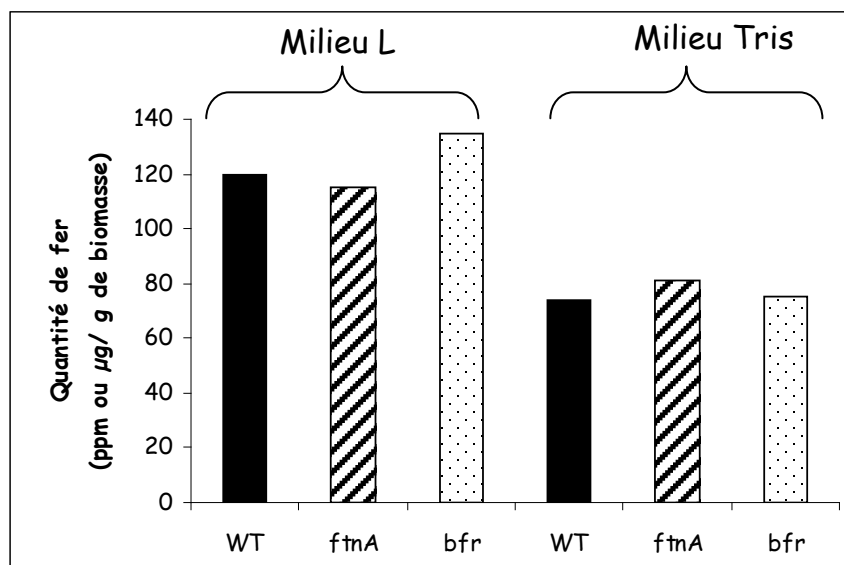


Figure 90 : Contenu en fer total des mutants *ftnA* $\Omega$  (hachuré) et *bfr* $\Omega$  (pointillé) en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir). Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées en milieu riche L et minimum Tris après respectivement 7 h et 13 h de croissance. Les extraits bactériens ont été préparés et leur contenu en fer dosé par spectrométrie d'émission atomique de plasma d'argon à couplage inductif ICP-AES.

Cependant, la répartition de ce métal dans la bactérie peut être distincte en absence de la bactérioferritine Bfr, c'est en ce sens que nous avons suivi la répartition du fer intracellulaire chez les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  par spectrométrie Mössbauer. Nous avons mené deux expériences, une première sur des cellules en phase stationnaire et un temps de marquage court de 2 heures avec un complexe  $5 \mu\text{M Fe}^{57}/100 \mu\text{M DHBA}$  et une seconde sur des cellules en phase exponentielle et un temps long d'environ 15 heures.

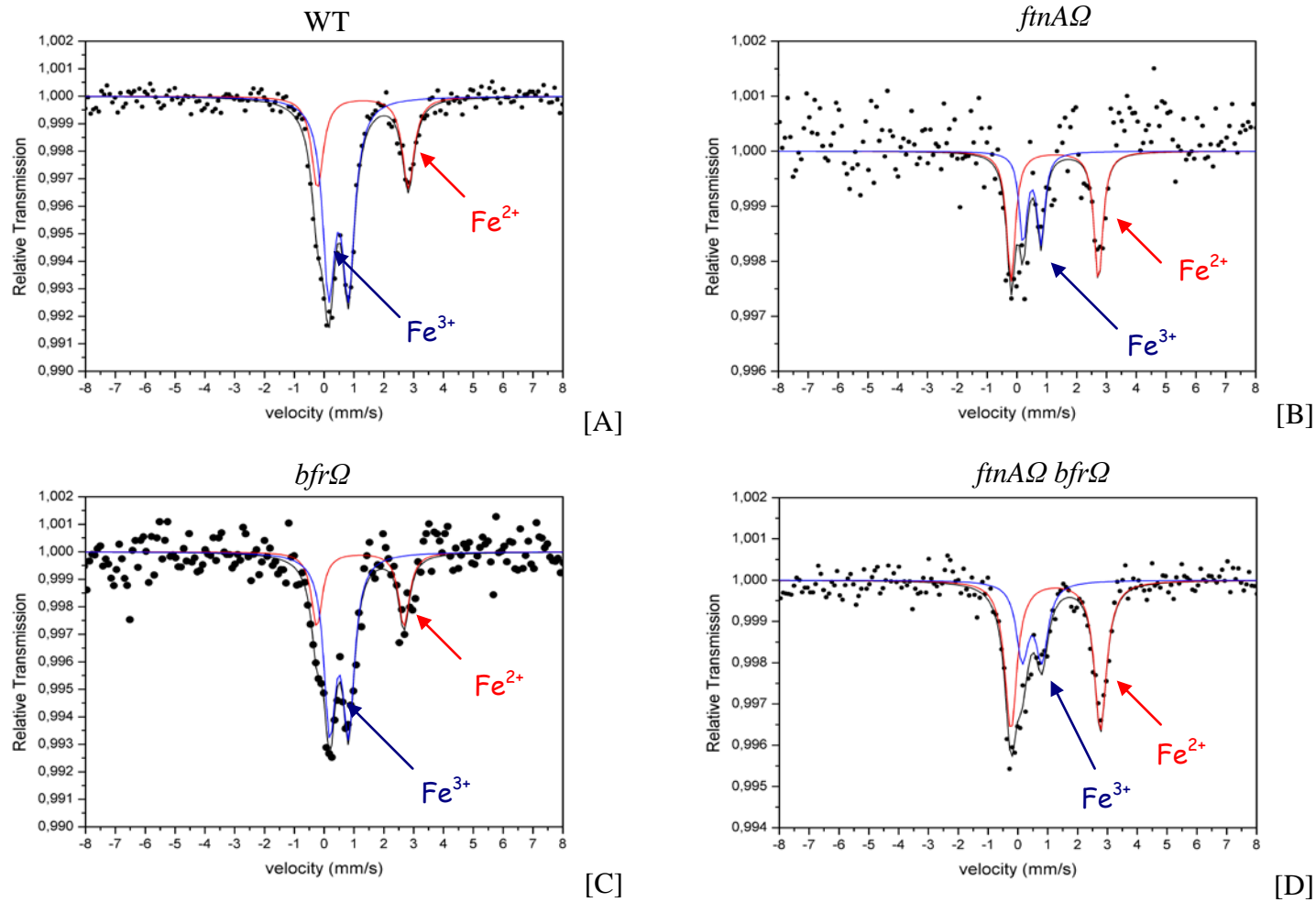


Figure 91 : Spectres Mössbauer de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 [A] et des mutants *ftnA*Δ [B], *bfr*Δ [C] et *ftnA*Δ *bfr*Δ [D]. Les bactéries en phase stationnaire ont été marquées avec une solution de 5 μM Fe<sup>57</sup>/100 μM DHBA pendant deux heures, récoltées et analysées par spectrométrie Mössbauer en collaboration avec l'équipe du Pr Berthold Matzanke (Medical University, Lübeck). Le tracé rouge correspond au signal du fer ferreux et le tracé bleu celui du fer ferrique.

De l'analyse des spectres donnés sur la figure 91, nous avons déduit des pourcentages correspondants à la surface de chacun des signaux rapportée sur la surface totale. Nous présentons les résultats sous forme d'histogramme sur la figure 92. Nous constatons qu'après 2 heures de marquage le fer présent dans le mutant *bfr*Ω est à 70% à l'état ferrique et 30% à l'état ferreux, ce qui est sensiblement identique à la répartition observée pour la souche sauvage (fig. 92). En effet, dans la souche sauvage, la balance  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  est de l'ordre 33/67. La présence d'une ferritine FtnA fonctionnelle et ce ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  expliquent pourquoi le mutant *bfr*Ω n'est pas plus sensible aux agents oxydants en comparaison à la souche sauvage. Par contre un double mutant *ftnA*Ω *bfr*Ω voit son ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  inversé par rapport à la souche sauvage ou au mutant *bfr*Ω (fig. 92). L'analyse des spectres montre que la proportion de fer ferreux est légèrement plus importante dans le double mutant *ftnA*Ω *bfr*Ω par rapport au mutant *ftnA*Ω. De plus, la quantité intracellulaire de fer est réduite dans le double mutant *ftnA*Ω *bfr*Ω par rapport à la souche sauvage ou au mutant *bfr*Ω. Néanmoins, en absence de ferritine et de bactioferritine, une proportion non négligeable de fer (33,5%) se trouve encore à l'état ferrique, propriété que nous attribuons aux protéines Dps1 et Dps2. Nos spéculations se sont avérées justifiées ; en effet le spectre réalisé à basse température pour le double mutant *ftnA*Ω *bfr*Ω ne montre pas de relaxation magnétique caractéristique de la ferritine ou de la bactioferritine.

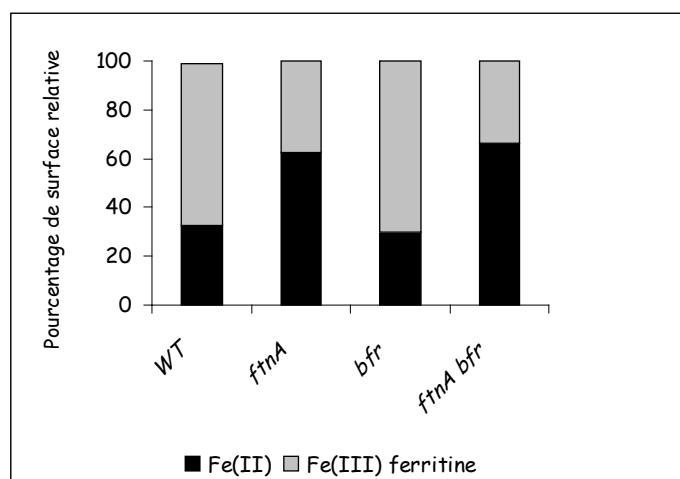


Figure 92 : Distribution du fer intracellulaire dans les mutants *ftnA*Ω, *bfr*Ω et *ftnA*Ω *bfr*Ω en comparaison à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les souches d'*E. chrysanthemi* ont été cultivées à 30°C en milieu Tris pendant 15 h, puis un mélange de DHBA- $Fe^{57}$  a été ajouté dans le milieu de culture. Des extraits ont été prélevés après deux heures, préparés et analysés par spectrométrie Mössbauer.

L'analyse des spectres obtenus pour un marquage long est encore en cours de réalisation. En résumé, la perte de la bactérioferritine Bfr ne semble pas affecter le contenu en fer total d'*E. chrysanthemi* 3937. Par ailleurs, ce métal se retrouve dans le même état redox et dans les mêmes proportions dans le mutant *bfr* $\Omega$  et dans la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Ces résultats confirment que la bactérioferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937 n'a pas une capacité de stockage aussi importante que la ferritine FtnA. Des travaux réalisés chez *E. coli* ont montré que l'absence de bactérioferritine n'influence pas le contenu total en fer et la balance  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999).

#### V- Effet sur les systèmes de transport du fer

Dans un premier temps, nous avons mesuré la quantité de chrysobactine produite dans les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage 3937 d'*E. chrysanthemi*. La quantité de chrysobactine produite par les deux mutants au cours de la croissance bactérienne est comparable à celle produite par la souche sauvage (fig. 93). Il n'a pas été possible d'estimer la quantité d'achromobactine dans un mutant *bfr* $\Omega$  en raison de l'incompatibilité des marqueurs de sélection.

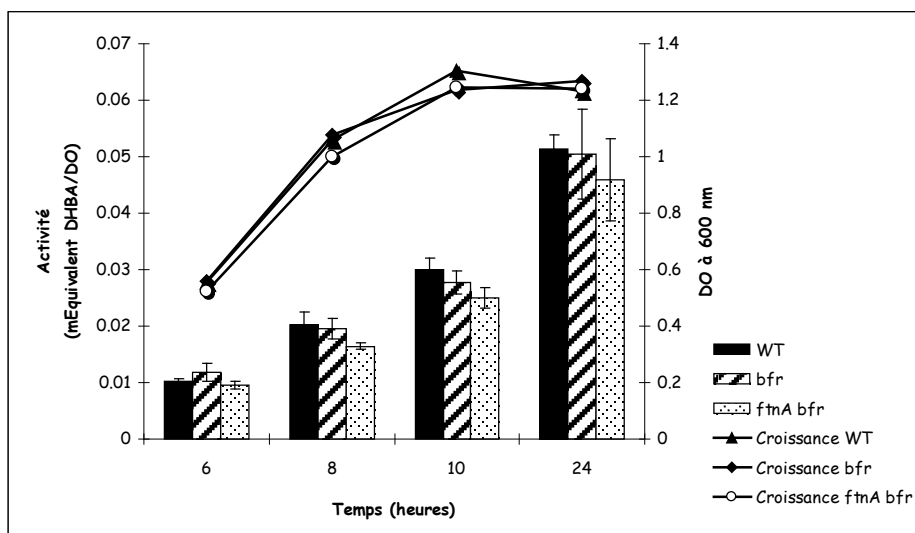


Figure 93 : Production de chrysobactine par la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (noir) et les mutants *bfr* $\Omega$  (hachuré) et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  (pointillé) cultivés en milieu Tris. Les courbes de croissance des différentes souches sont superposées. Les surnageants de culture ont été prélevés au cours de la croissance bactérienne après 6 h, 8h, 10 h et 24 h et analysés par le test de Arnow.

Par ailleurs, nous avons réalisé des essais de complémentation nutritionnelle pour déterminer si l'absence de la bactérioferritine Bfr influence le transport de l'achromobactine, du  $\text{FeCl}_3$  ou encore d'hème. Nous n'avons pas testé la chrysobactine pour des questions de résistances croisées entre les mutants. Nous apprécions la taille des halos de croissance formés pour les deux souches *acs37 cbsE* (référence) et *acs37 cbsE bfr $\Omega$*  après 24 h d'incubation. Le diamètre des halos formés par la souche *acs37cbsE bfr $\Omega$*  en présence d'achromobactine ferrée,  $\text{FeCl}_3$  et d'hème est équivalent à ceux de la souche référence *acs37 fct*. Nous n'observons donc pas de différence pour l'utilisation d'achromobactine, d'hème ou de  $\text{FeCl}_3$  entre le mutant *bfr $\Omega$*  et la souche sauvage (fig. 94). Cependant, la cinétique d'entrée de sidérophore peut être différente tout en permettant la même croissance que dans un contexte sauvage.

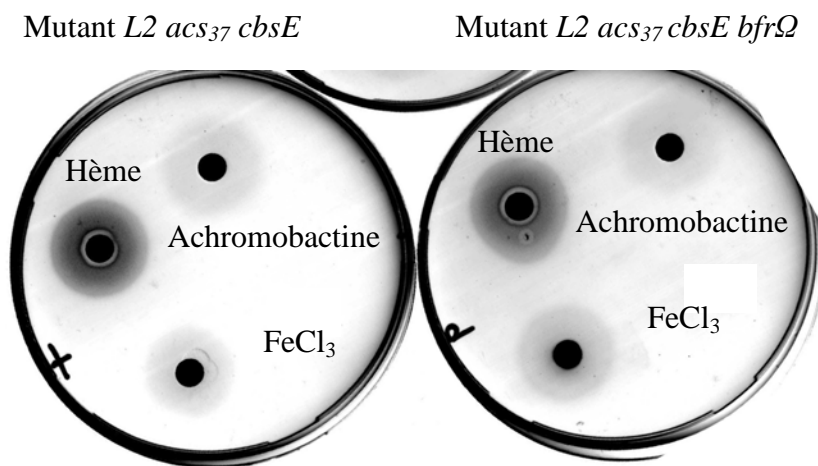


Figure 94 : Test de complémentation nutritionnelle avec les souches *acs37 cbsE* (référence) et *acs37 cbsE bfr $\Omega$* . Les souches ont été ensemencées dans 20 mL de milieu L agar additionné de 200  $\mu\text{M}$  de 2,2'-dipyridyl. 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'hème 1 mM, d'achromobactine ferrée 100  $\mu\text{M}$  et de  $\text{FeCl}_3$  30  $\mu\text{M}$  ont été déposés sur des filtres placés sur la surface de l'agar. Le diamètre des halos de croissance a été mesuré après 24 h d'incubation à 30°C.

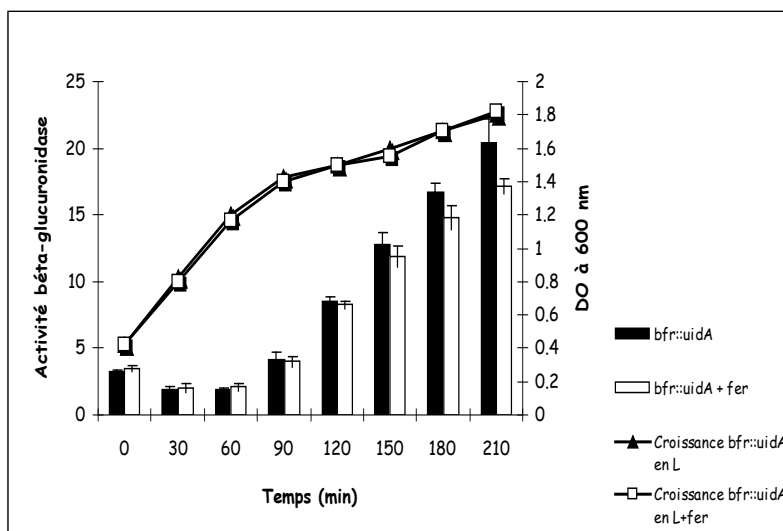


Figure 95 : Expression de la fusion *bfr::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L en présence (blanc) ou en absence (noir) de  $\text{FeCl}_3$ . La souche *bfr::uidA* d'*E. chrysanthemi* 3937 a été cultivée à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique de  $\text{DO}_{600} = 0,4$  à laquelle a été ajouté ou non du fer.

## VI- Régulation de l'expression du gène *bfr*

L'analyse de l'expression d'une fusion transcriptionnelle *bfr::uidA* dans une souche sauvage cultivée en milieu L révèle que la transcription du gène *bfr* est induite dès que la souche bactérienne atteint une  $DO_{600}$  de 1,5 qu'il y ait ou non addition de fer (fig. 95).

Une analyse par Northern confirme le résultat précédent. Lorsque la souche sauvage est cultivée en milieu L, la quantité de transcrits *bfr* ne semble pas être influencée par la présence de fer. Un transcrit d'environ 850 bases est détecté, ce qui correspond à la taille attendue pour un ARNm polycistronique *bfd-bfr*. Nous constatons une augmentation de la quantité de messagers *bfr* au cours de la croissance bactérienne avec une forte accumulation en phase stationnaire indépendamment de l'addition de fer (fig. 96).

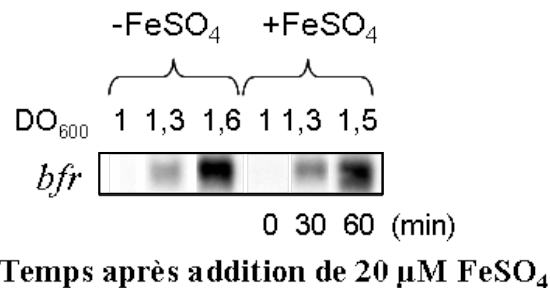


Figure 96 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique d'~1, à laquelle ont été ajoutés 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Le profil d'expression du gène *bfr* évoque un contrôle par la phase stationnaire. Ce type de régulation peut être attribué à un phénomène dépendant de la densité cellulaire désigné par le terme de quorum-sensing. Nous avons donc d'abord examiné la transcription du gène *bfr* dans des mutants des systèmes de quorum-sensing. Les différents acteurs du quorum-sensing ont été identifiés chez *E. chrysanthemi* (Nasser et Reverchon, 2002 ; Barnard et Salmond, 2007) : un premier système fait intervenir le régulateur ExpR qui appartient à la famille LuxR d'activateurs transcriptionnels et l'acyl-homosérine lactone (acyl-HSL) synthase ExpI de la famille LuxI alors qu'un deuxième système implique le régulateur CanR appartenant également à la famille LuxR et une acyl-HSL synthase non identifiée. Nous avons transduit la mutation *bfr::uidA* dans des mutants *expR* et *canR* qui nous ont été fournis par Sylvie Reverchon de l'unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, UMR 5240.

Nous avons analysé l'activité  $\beta$ -glucuronidase d'une fusion transcriptionnelle *bfr::uidA* dans des mutants *canR* et *expR* cultivés en milieu L. Il s'avère que la transcription du gène *bfr* dans un mutant *canR* est comparable à celle de la souche sauvage (fig. 97). L'inactivation du gène *expR* influence très légèrement la transcription du gène *bfr*, mais ce régulateur ne peut à lui seul être responsable de la forte induction du gène *bfr* en phase stationnaire (fig. 97). En conclusion, l'induction du gène *bfr* en phase stationnaire de croissance ne dépend pas de ces deux systèmes de quorum-sensing.

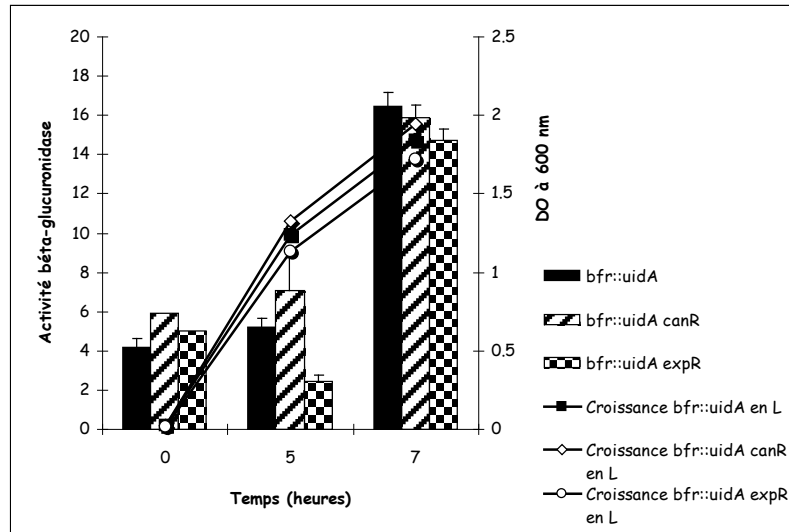


Figure 97 : Influence de mutations *canR* et *expR* sur l'expression de la fusion *bfr::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. La croissance des différentes souches d'*E. chrysanthemi* cultivées à 30°C en milieu L a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm au cours du temps. Des prélèvements ont été effectués à différents temps au cours de la croissance bactérienne pour lesquels l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la fusion *bfr::uidA* a été mesurée.



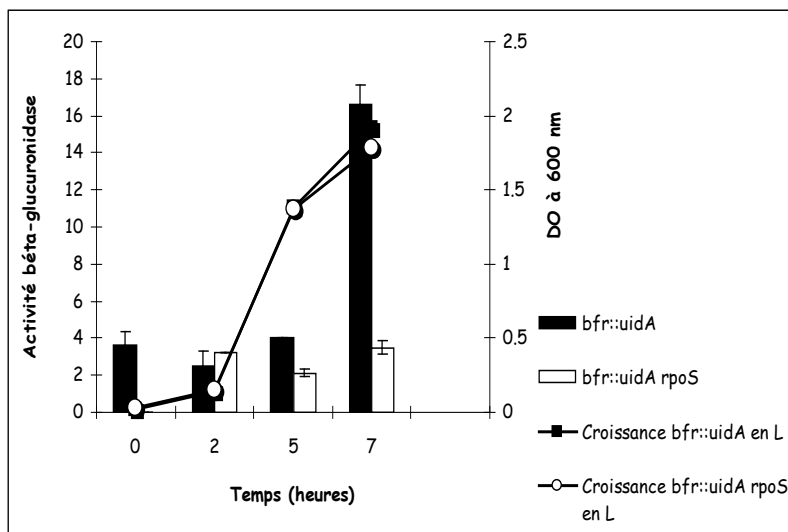


Figure 98 : Influence d'une mutation *rpoS* sur l'expression de la fusion *bfr::uidA* au cours de la croissance bactérienne d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. La croissance des différentes souches d'*E. chrysanthemi* cultivées à 30°C en milieu riche L a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm au cours du temps. Des prélèvements ont été effectués à différents temps au cours de la croissance bactérienne pour lesquels l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la fusion *bfr::uidA* a été mesurée

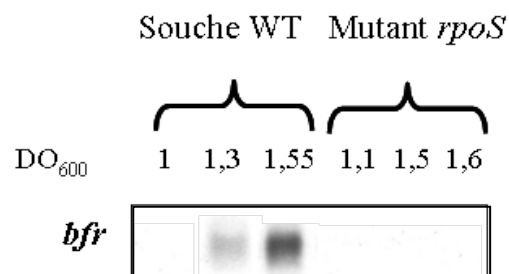
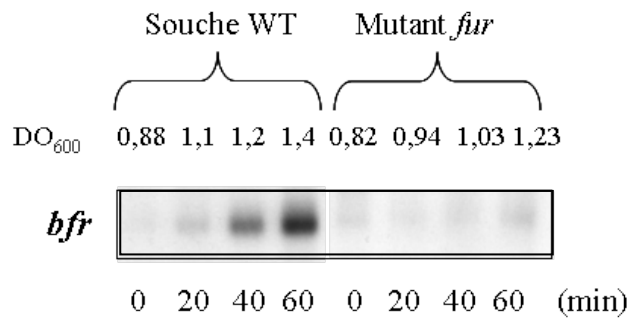


Figure 99 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et du mutant *rpoS*. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L. Des prélèvements ont été effectués dès DO<sub>600</sub> ~ 1 au cours de la croissance bactérienne à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Nos investigations se sont tournées alors vers le facteur de transcription  $\sigma^S$  qui est décrit dans la littérature comme inducteur de nombreux gènes en phase stationnaire de croissance et qui serait susceptible d'induire la transcription du gène *bfr* en phase stationnaire. L'annotation du génome d'*E. chrysanthemi* 3937 a mis en évidence la présence d'un homologue au gène *rpoS* d'*E. coli* (ABF 20446) dont le produit fait 330 acides aminés et présente 92% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* (annexe 3). L'analyse de la séquence nucléique du gène *rpoS* révèle que ce dernier est organisé en opéron avec le gène *nlpD* situé en amont (ABF 20445) et codant une lipoprotéine de 408 acides aminés (annexes 4 et 5). Cette organisation génique est conservée chez *E. coli* et le gène *rpoS* est lui-même induit par la phase stationnaire à partir de deux promoteurs potentiels localisés à l'intérieur du gène *nlpD* (Lange et al., 1994).

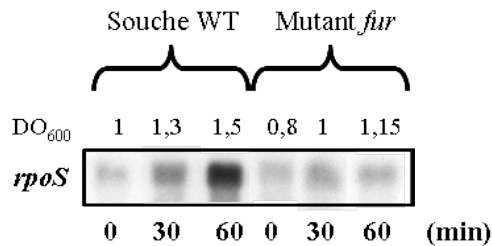
De plus, l'analyse de la région promotrice du gène *bfr* dévoile la présence d'un promoteur susceptible d'être reconnu par  $\sigma^S$  avec un site -10 étendu TGCGTTTAAT (voir chapitre I). Toutefois, aucune boîte -35 associée n'a été identifiée. Un mutant *rpoS* nous a été fourni par Sylvie Reverchon. Afin de corroborer cette hypothèse, nous avons suivi l'activité  $\beta$ -glucuronidase de la fusion *bfr::uidA* dans le mutant *rpoS* cultivé en milieu L en comparaison à la souche sauvage. Pour cela, nous avons construit un double mutant *bfr::uidA rpoS* en transduisant la mutation *bfr::uidA* dans le mutant *rpoS*. Nous avons constaté que le gène *bfr* n'est plus induit en phase stationnaire dans le mutant *rpoS*, indiquant que le facteur  $\sigma^S$  est responsable de l'induction du gène *bfr* en phase stationnaire (fig. 98).

Par ailleurs, une analyse par Northern de la quantité de transcrits *bfr* confirme ce résultat montrant que le gène *bfr* est peu transcrit dans un mutant *rpoS* et qu'il n'y a plus d'accumulation de transcrits *bfr* dans un mutant *rpoS* cultivé en milieu L contrairement à la souche sauvage (fig. 99). Ces résultats suggèrent que le facteur  $\sigma^S$  est responsable de l'accumulation de transcrits *bfr* dès l'entrée en phase stationnaire de croissance. Nous avons montré que le gène *ftnA*, contrairement au gène *bfr*, n'est pas contrôlé par  $\sigma^S$  (données non présentées).



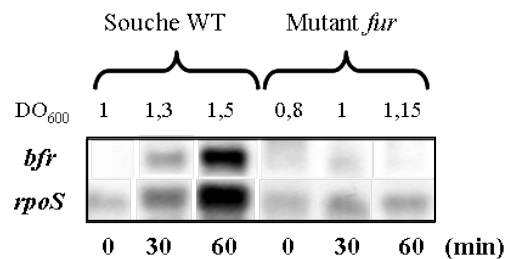
#### Temps après addition de 20 μM FeSO<sub>4</sub>

Figure 100 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et du mutant *fur*Ω. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une DO<sub>600</sub> ~ 0,8, à laquelle ont été ajoutés 20μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 20 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.



#### Temps après addition de 20 μM FeSO<sub>4</sub>

Figure 101 : Accumulation de transcrits *rpoS* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *fur*Ω. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une DO<sub>600</sub> ~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.



#### Temps après addition de 20 μM FeSO<sub>4</sub>

Figure 102 [A] : Accumulation des transcrits *bfr* et *rpoS* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *fur*Ω. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une DO<sub>600</sub> ~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Nous avons voulu savoir si la protéine Fur était impliquée dans le contrôle du gène *bfr*. Pour y répondre, nous avons réalisé un Northern dans le mutant *fur* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage. Nous observons que la forte accumulation de transcrits *bfr* présente dans la souche sauvage en phase stationnaire n'a pas lieu dans le mutant *fur* $\Omega$  (fig. 100). En effet, le taux de transcription du gène *bfr* est réduit dans un contexte *fur* $\bar{}$ . Il faut souligner que le mutant *fur* $\Omega$  croît plus lentement que la souche sauvage. Cependant, à DO<sub>600</sub> équivalente de 1,2 la quantité de transcrits *bfr* est significativement diminuée dans le mutant *fur* $\Omega$  en comparaison à la souche sauvage. Il semblerait que ce mécanisme de régulation du gène *bfr* soit dépendant de la protéine Fur. Suite au profil d'expression du gène *bfr* dans un contexte *fur* $\bar{}$ , nous avons étudié la régulation de la transcription du gène *rpoS* dans un mutant *fur* $\Omega$  en quantifiant l'accumulation de transcrits *rpoS* dans ce mutant au cours de la croissance bactérienne. Nous constatons que la quantité de transcrits *rpoS* est quasiment nulle dans le mutant *fur* $\Omega$  (fig. 101). Toutefois, il faut mentionner que le mutant *fur* $\Omega$  pousse lentement et difficilement en milieu L en comparaison à la souche sauvage et que les densités cellulaires auxquelles les prélèvements ont été effectués ne sont pas équivalentes. En superposant les membranes, nous constatons que les profils d'expression des gènes *bfr* et *rpoS* sont similaires (fig. 102 [A]). Dans un mutant *fur* $\Omega$ , il y a un retard de croissance qui conduit à un retard de l'accumulation de l'ARNm *rpoS*. Ce retard de croissance provoque également un retard dans l'accumulation du transcrit *bfr* : cet effet est illustré sur la figure 102 [B]. La croissance du mutant *fur* $\Omega$  n'est pas stimulée par le fer contrairement à celle de la souche sauvage. L'ajout de fer accentue encore plus l'écart de croissance entre la souche sauvage et le mutant *fur* $\Omega$ . De plus, il est très difficile de travailler avec le mutant *fur* $\Omega$  dont les ARNs extraits en phase stationnaire sont de mauvaise qualité.

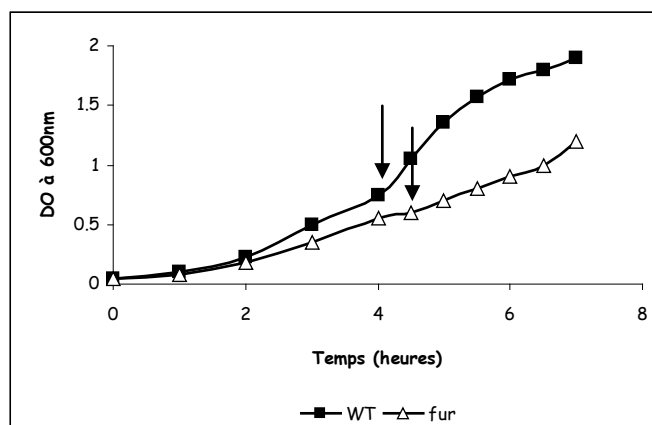


Figure 102 [B] : Croissance du mutant *fur* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 en milieu L. Les flèches horizontales indiquent le moment où ont été ajoutés 20  $\mu$ M de  $\text{FeSO}_4$  dans les cultures du mutant *fur* $\Omega$  et de la souche sauvage.

Nous pouvons aussi imaginer que la protéine Fur contrôle indirectement la transcription du gène *rpoS* et/ou la stabilité de son ARN messager. En effet, Fur peut être impliqué dans le contrôle de régulateurs posttranscriptionnels du facteur  $\sigma^S$  tels que la protéase ClpXP, la protéine RssB, la protéine H-NS, l'ARN OxyS ou DsrA ou RprA. Cependant, aucune boîte Fur n'a été identifiée dans la région promotrice de l'opéron *nlpD-rpoS*. En conclusion, nous avons montré que le gène *bfr* est induit en phase stationnaire par le facteur de transcription  $\sigma^S$  ; néanmoins, il n'est pas exclu qu'il y ait également une régulation par le fer du gène *bfr* masquée par l'effet dépendant de la phase stationnaire.

Nous avons examiné l'expression du gène *bfr* codant la bactérioferritine par Northern-blot au cours de la croissance bactérienne en milieu minimum Tris avec ou sans fer ajouté. La quantité de transcrits *bfr* augmente significativement en comparaison à la souche sauvage dès  $DO_{600} \sim 0,8$ , soit 1 heure après l'ajout de fer dans le milieu Tris (fig. 103). Il apparaît donc que l'expression du gène *bfr* est différente en fonction du type de milieu dans lequel est cultivé la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937.

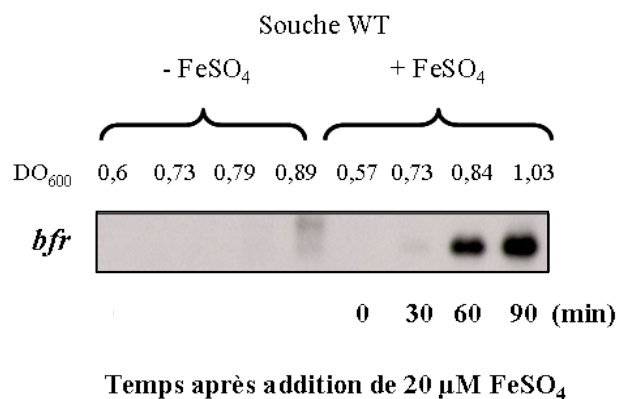


Figure 103 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris jusqu'à une densité optique de  $DO_{600} \sim 0,6$ , à laquelle ont été ajoutés ou non 20  $\mu$ M de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Nous avons donc vérifié si le gène *bfr* d'*E. chrysanthemi* 3937 est régulé par le fer sous le contrôle de la protéine Fur au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris par Northern. En milieu minimum, l'ajout de fer induit la transcription du gène *bfr*. Cette forte induction n'est plus observée dans un mutant *furΩ* (fig.104). Néanmoins la densité cellulaire des extraits bactériens issus du mutant *furΩ* n'est pas équivalente à celle des extraits de la souche sauvage. L'absence d'augmentation de la quantité de transcrits *bfr* en présence de fer dans le mutant *furΩ* est soit la conséquence directe de l'absence de Fur soit une conséquence indirecte liée à un retard de croissance du mutant *furΩ*. Néanmoins, des travaux réalisés chez *E. coli* ont révélé que l'expression du gène *bfr* d'*E. coli* est dépendante du répresseur Fur et du fer (Hantke, 2001 ; McHugh et al., 2003).

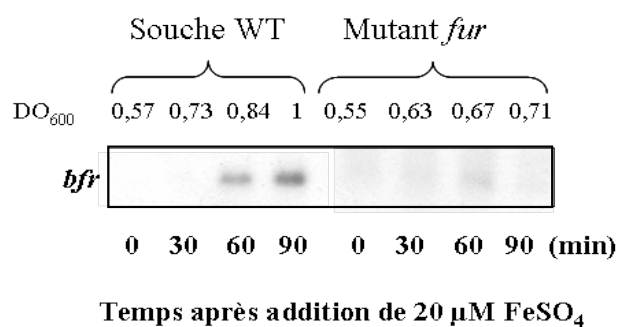


Figure 104 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *furΩ*. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris jusqu'à une densité optique DO<sub>600</sub> = 0,6, à laquelle ont été ajoutés 20μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Nous remarquons que dans le mutant *furΩ*, le gène *bfr* est très peu exprimé en milieu Tris et n'est plus induit par le fer (fig. 105).

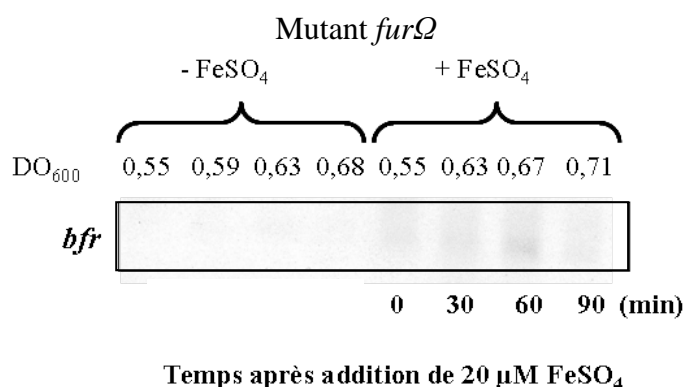
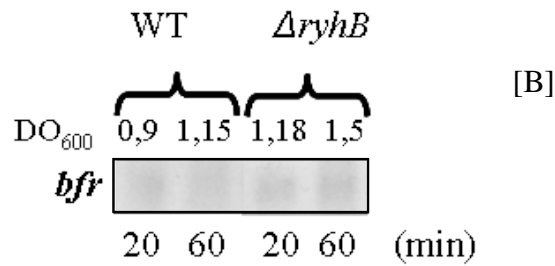
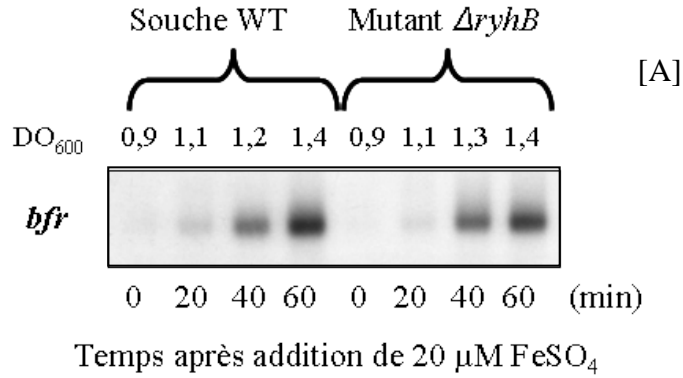


Figure 105 : Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir du mutant *furΩ*. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris jusqu'à une densité optique DO<sub>600</sub> ~ 0,5 à laquelle ont été ajoutés ou non 20μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.



Temps après addition de 200 μM 2,2'-dipyridyl

Figure 106 : [A] Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L après ajout de 20 μM de FeSO<sub>4</sub> détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant  $\Delta ryhB$ . [B] Accumulation de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne en milieu L après ajout de 200 μM de 2,2'-dipyridyl détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant  $\Delta ryhB$ . Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique d'environ DO<sub>600</sub> ~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20 μM de FeSO<sub>4</sub> ou 200 μM de 2,2'-dipyridyl. Des prélèvements ont été effectués au cours de la croissance bactérienne à partir desquels les ARNs ont été extraits et quantifiés.

Dans l'hypothèse d'une régulation du gène *bfr* par Fur, est-ce que le mécanisme est analogue à celui décrit précédemment pour le gène *ftnA* ? Afin de tester si le mécanisme de régulation de l'expression du gène *bfr* passe par l'intermédiaire du petit ARN anti-sens RyhB, nous avons examiné la quantité de transcrits *bfr* au cours de la croissance bactérienne d'un mutant  $\Delta$ *ryhB* en comparaison à la souche sauvage. Aucune différence significative dans l'abondance de transcrits *bfr* n'est mise en évidence entre un mutant  $\Delta$ *ryhB* et la souche sauvage en milieu riche (fig. 106 [A]) et pauvre en fer (fig. 106 [B]). De plus, aucun appariement n'a pu être détecté entre l'ARN RyhB et le transcrit *bfr*, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle RyhB ne régule pas l'expression du gène *bfr* chez *E. chrysanthemi*.

Après analyse plus poussée de la séquence du gène *bfr*, une boîte Fur potentielle a été repérée à l'intérieur du gène *bfr* en position 333 par rapport à l'ATG. Elle possède 12 bases conservées sur 19 par rapport à la séquence définie chez *E. coli* (GATTATGTCAGTCGCGATC). Fur pourrait être impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle du gène *bfr* dans certaines conditions à préciser.

En conclusion, le gène *bfr* d'*E. chrysanthemi* est induit par la phase stationnaire par l'intermédiaire du facteur de transcription  $\sigma^S$  en milieu L. Dans un contexte *fur*<sup>-</sup> le gène *bfr* est moins transcrit à cause d'un retard de croissance qui réduit l'accumulation de  $\sigma^S$ . En effet, le mutant *fur* croît plus lentement que la souche sauvage et atteint des densités cellulaires finales inférieures à celles de la souche sauvage. La protéine Fur pourrait aussi en plus contrôler directement ou indirectement l'expression du gène *rpoS*. Cependant il n'est pas exclu que la protéine Fur contrôle la transcription du gène *bfr* car une boîte Fur assez bien conservée est présente dans la phase codante du gène *bfr*. De plus, l'expression du gène *bfr* au cours de la croissance en milieu minimum Tris apparaît être fonction de la biodisponibilité en fer. Néanmoins, dans ces conditions l'implication directe de la protéine Fur reste à démontrer.



## VII- Pouvoir pathogène des mutants *bfr* $\Omega$ et *fnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$

Le pouvoir pathogène des mutants *bfr* $\Omega$  et *fnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  a été analysé sur plantes entières de saintpaulia et sur feuilles d'endives. Sur saintpaulias, les deux mutants sont aussi virulents que la souche sauvage. Nous n'observons pas de retard d'apparition de symptômes et le nombre de réponses systémiques est identique à celui provoqué par la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 (données non présentées). En revanche, sur endives, les mutants *bfr* $\Omega$  et *fnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présentent un retard significatif dans l'apparition des symptômes de macération. Cependant, ces deux mutants sont capables de macérer la feuille d'endive comme la souche sauvage (fig. 107 et 108).



Souche WT

Mutant *bfr* $\Omega$

Figure 107 : Symptômes sur feuilles d'endives après 48 h d'inoculation avec la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *bfr* $\Omega$ .



Souche WT

Mutant *fnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$

Figure 108 : Symptômes sur feuilles d'endives après 24 h d'inoculation avec la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *fnA* $\Omega$ *bfr* $\Omega$ .

# Chapitre IV

La protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937

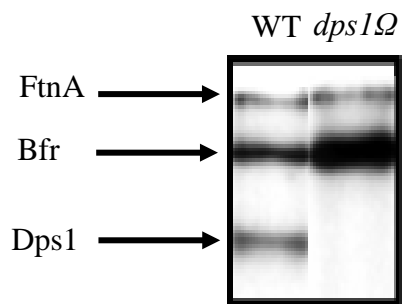


Figure 109 : Contenu en protéines à fer de la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* et du mutant *dps1* $\Delta$ . Les souches bactériennes ont été cultivées en milieu L jusqu'à  $DO_{600} = 0,5$  à laquelle ont été ajoutés  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{59}\text{Cl}_3$ . Des extraits cellulaires totaux ont été préparés après 45 min de marquage et ont été analysés par électrophorèse en conditions non dénaturantes. La figure montre un autoradiogramme du gel séché après une exposition de 24 h.

Au cours de ce travail, nous avons commencé à étudier le rôle de la protéine Dps1 dans l'homéostasie du fer chez *E. chrysanthemi* 3937. Nous avons réalisé quelques analyses préliminaires qui sont présentées dans ce court chapitre.

## I- Construction d'un mutant *dps1*Ω

Après avoir identifié par une analyse bioinformatique deux gènes codant des protéines Dps, homologues au gène *dps* d'*E. coli* et d'autres entérobactéries, nous avons inactivé dans un premier temps le gène *dps1* dans la souche 3937 d'*Erwinia chrysanthemi* afin d'évaluer sa fonction physiologique. Nous avons procédé en remplaçant le gène chromosomique parental par une copie du gène *dps1* interrompue par un interposon Ω. Pour cela, nous avons amplifié par PCR avec les amorces *dps1s* et *dps1r* un fragment d'environ 1,5 kb contenant le gène *dps1* en position centrale (annexe 6). Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T Easy et la construction plasmidique résultante a été préalablement séquencée. Le gène *dps1* a ensuite été récupéré par digestion de la construction plasmidique précédente par les enzymes de restriction *ApaI* et *SpeI*, puis cloné dans le plasmide multicopie pBC-SK<sup>+</sup> linéarisé par les mêmes enzymes. Pour inactiver le gène *dps1*, l'interposon Ω*specR* conférant la résistance à la spectinomycine a été récupéré par digestion du plasmide pHP45 par *SmaI* et introduit dans le gène *dps1* au niveau du site de restriction unique *EcoRV*. La construction résultante a été introduite par électroporation dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* où elle a été recombiniée dans le chromosome. Les clones résistants à la spectinomycine ont été sélectionnés et vérifiés par PCR et Southern-blot.

## II- Vérification de l'absence de la protéine Dps1 dans le mutant *dps1*Ω

Le mutant *dps1*Ω et la souche sauvage d'*Erwinia chrysanthemi* 3937 ont été cultivés en milieu L jusqu'à DO<sub>600</sub> = 0,5 à laquelle a été ajouté 1 μM de Fe<sup>59</sup>Cl<sub>3</sub>. Des extraits cellulaires totaux ont été préparés après 45 min de marquage et ont été analysés par électrophorèse en conditions non dénaturantes. L'analyse du contenu des extraits cellulaires totaux en protéines marquées au Fe<sup>59</sup> révèle la présence de trois bandes dans la souche sauvage. Dans le mutant *dps1*Ω, la bande inférieure disparaît (fig. 109). Cette bande doit correspondre à la protéine Dps1. En conclusion, la protéine Dps1 est bien absente dans le mutant *dps1*Ω. Par ailleurs, elle est capable de fixer le fer apporté (fig. 109).

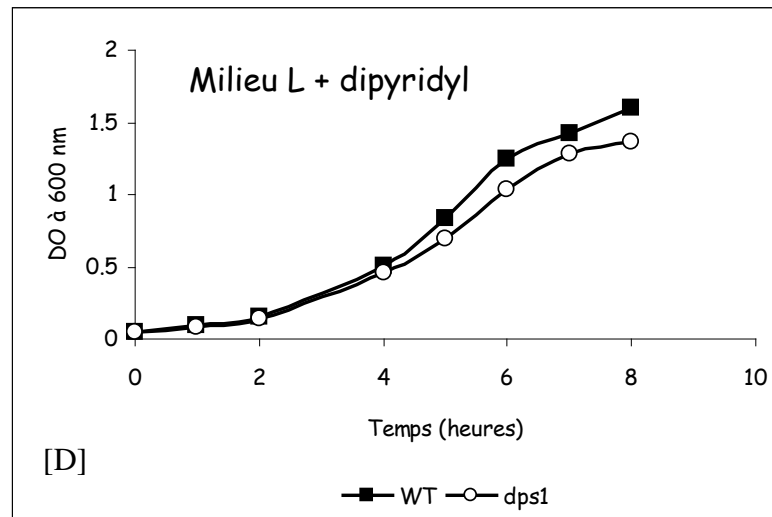
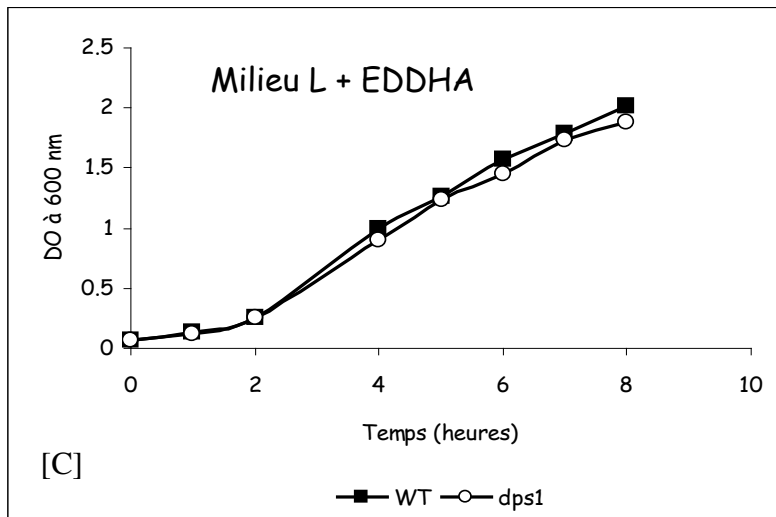
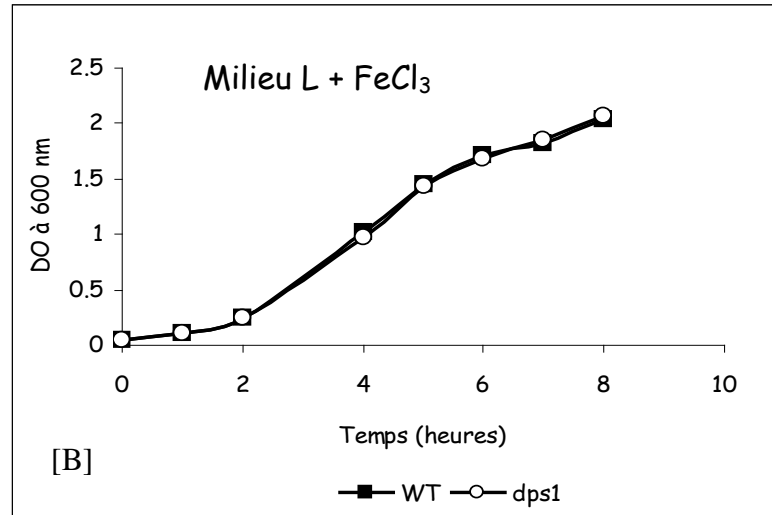
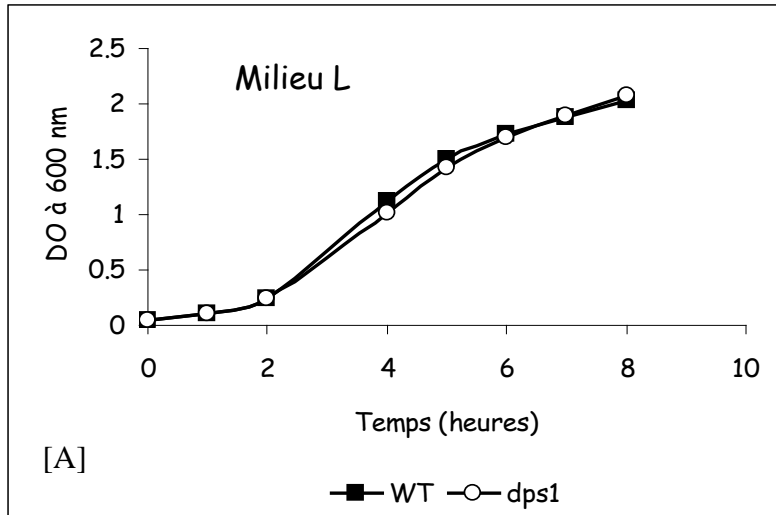
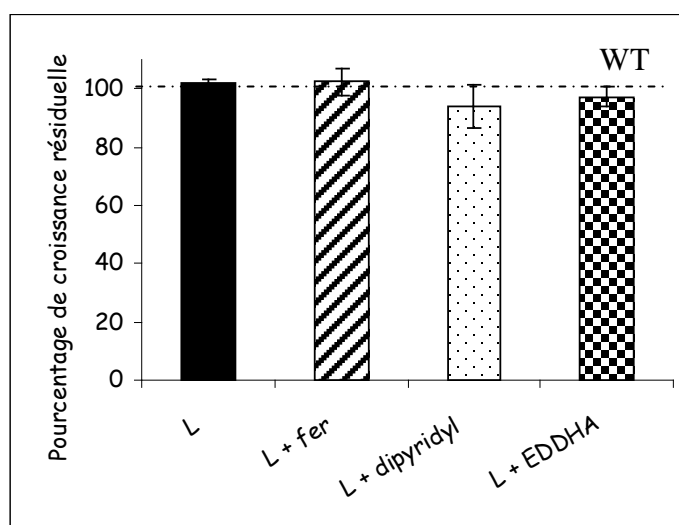


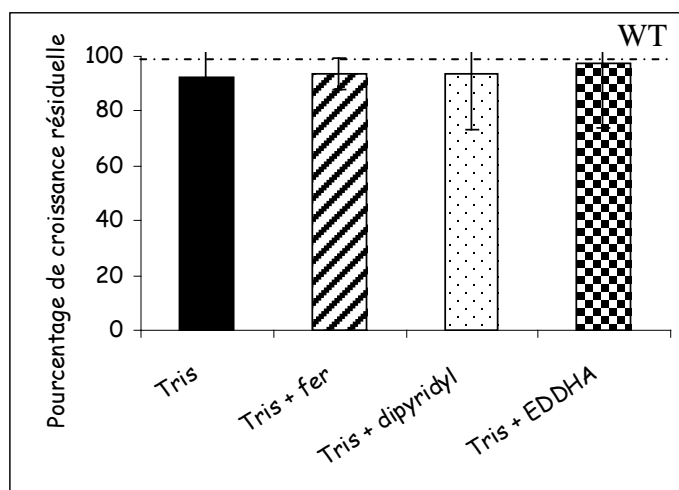
Figure 111 : Propriétés de croissance du mutant *dps1Ω* en milieu L [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], EDDHA (100 μM) [C] et 2,2'-dipyridyl (200 μM) [D].

### III- Propriétés de croissance du mutant *dps1Ω*

Nous avons analysé les propriétés de croissance du mutant *dps1Ω* dans différentes conditions. Comme montré par les histogrammes A et B de la figure 110 ci-dessous, ce mutant n'est pas affecté pour ses propriétés de croissance en milieu riche ou minimum en comparaison à la souche sauvage (fig. 111 et 112). Une carence en fer provoquée par le 2,2'-dipyridyl ou l'EDDHA n'affecte pas plus le mutant *dps1Ω* que la souche sauvage. De même, une addition de fer stimule autant la croissance du mutant *dps1Ω* que celle de la souche sauvage.



[A] Milieu L



[B] Milieu Tris

Figure 110 : Histogramme récapitulatif représentant les propriétés de croissance du mutant *dps1Ω* en milieu L [A] et Tris [B] en absence (noir) ou en présence de fer (hachuré), 2,2'-dipyridyl (pointillé) et EDDHA (damier) normalisées par rapport à la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Le pourcentage de croissance résiduelle a été déterminé à partir des valeurs de  $DO_{600}$  après 8 h 30 de croissance pour le mutant *dps1Ω* rapportées sur celles de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937 dans les mêmes conditions.

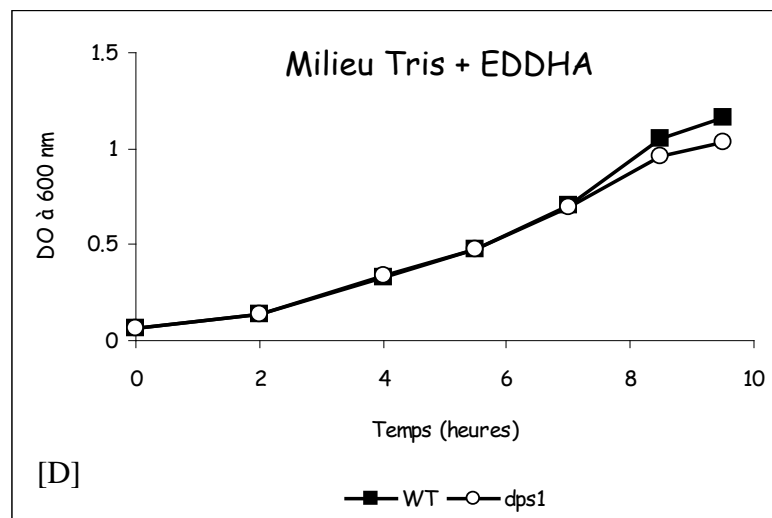
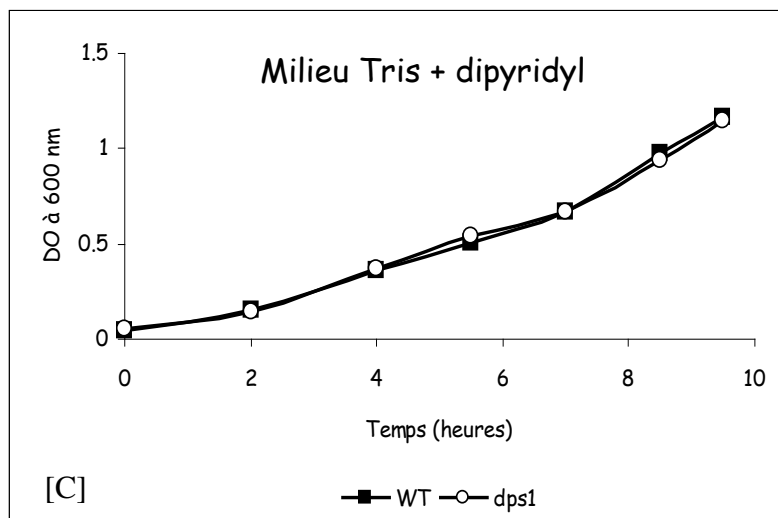
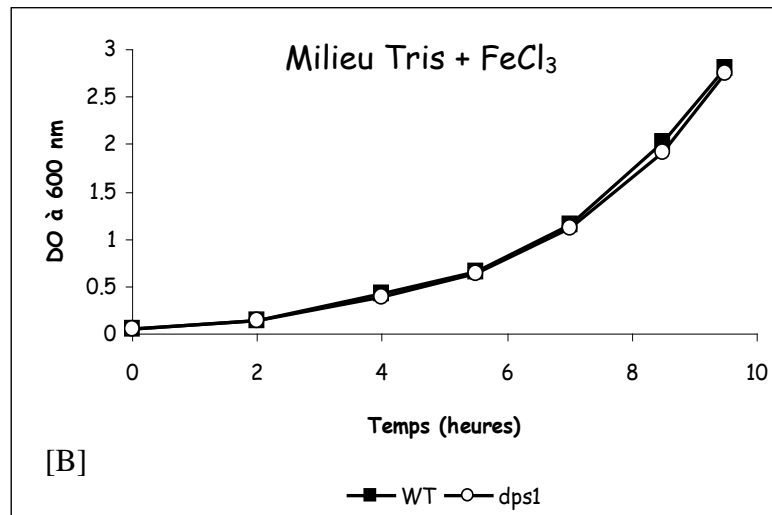
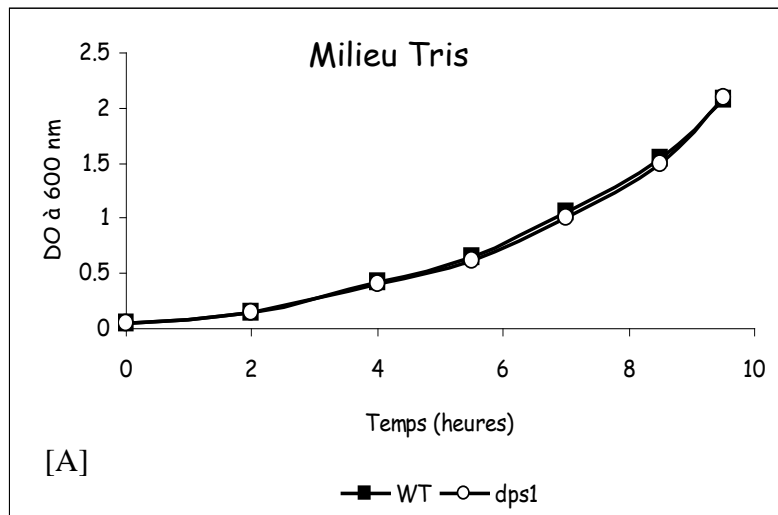


Figure 112 : Propriétés de croissance du mutant *dps1* en milieu Tris [A], en présence de FeCl<sub>3</sub> (30 μM) [B], 2,2'-dipyridyl (100 μM) [C] et EDDHA (37 μM) [D]

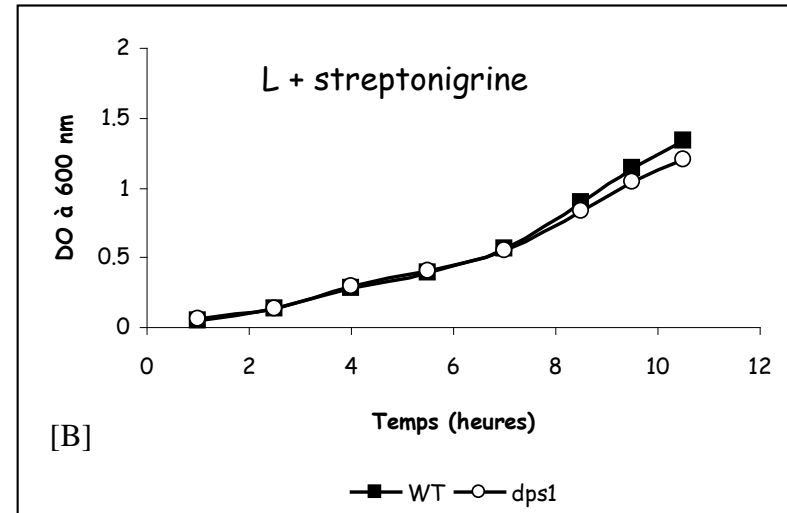
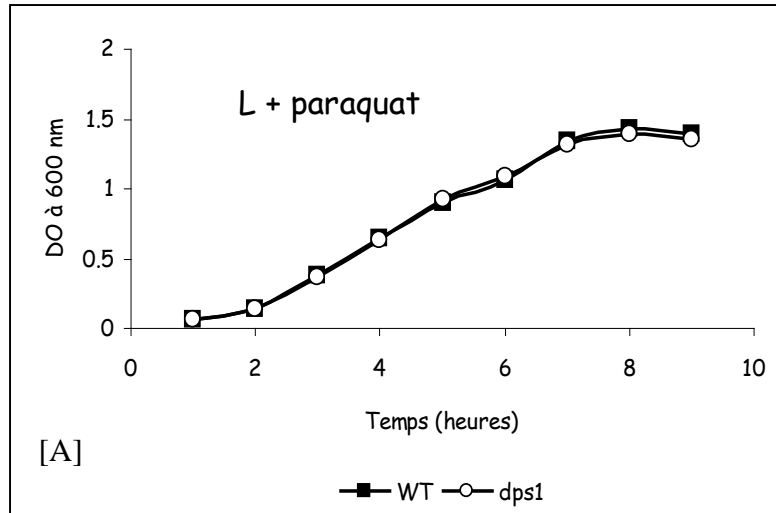


Figure 113 : Sensibilité au paraquat (6  $\mu$ M) [A] et à la streptonigrine (1,5  $\mu$ g/mL) [B] du mutant *dps1* $\Omega$  et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.



Ces résultats indiquent que la protéine Dps1 ne semble pas indispensable au stockage intracellulaire du fer chez *E. chrysanthemi* 3937. Toutefois, il existe un second gène codant une autre protéine Dps. Par ailleurs, il reste à analyser le contenu en fer total et la distribution intracellulaire en fer du mutant *dps1*Δ.

#### IV- Sensibilité au stress oxydant du mutant *dps1*Δ

Bien que le mutant *dps1*Δ ne soit pas affecté par une carence en fer, nous avons étudié son comportement vis-à-vis du stress oxydant comme pour les autres mutants. Le mutant *dps1*Δ n'est significativement pas plus sensible que la souche sauvage au paraquat ou à la streptonigrine (fig. 113). La protéine Dps1 ne semble pas être impliquée dans la résistance au stress oxydant généré par le paraquat ou la streptonigrine. En revanche, nous avons observé que le mutant *dps1*Δ présente une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène en comparaison à la souche sauvage avec environ 4% de croissance résiduelle après 8 h de culture (fig.114). Ces données suscitent l'idée que la résistance au peroxyde d'hydrogène conférée par la protéine Dps1 n'est pas la conséquence directe de sa propriété à séquestrer du fer car en effet un mutant *dps1*Δ n'est pas plus sensible au paraquat ou à la streptonigrine.

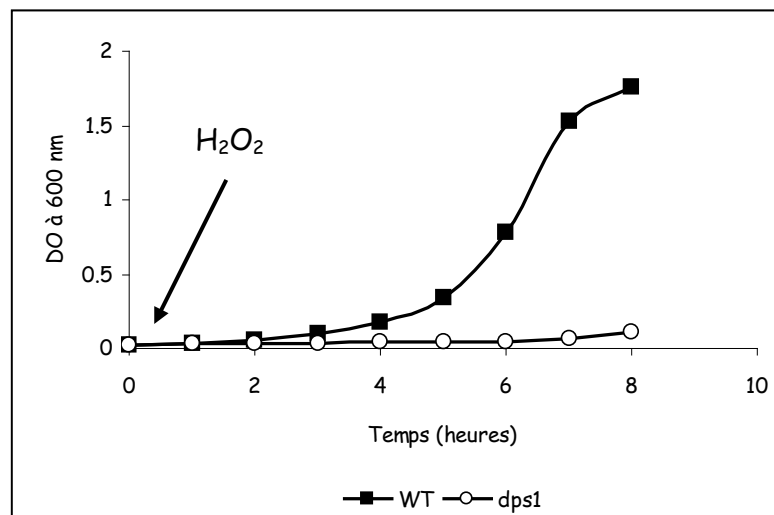


Figure 114 : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) du mutant *dps1*Δ et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

Pour exclure la possibilité que la résistance au peroxyde d'hydrogène conférée par la protéine Dps1 n'est pas liée à sa capacité à fixer du fer, il serait intéressant de regarder si l'addition d'un chélateur du fer ne supprime pas la sensibilité au peroxyde d'hydrogène du mutant *dps1Ω*. L'hypothèse que l'on peut avancer est que la protéine Dps1 confère la résistance au peroxyde d'hydrogène en consommant ce dernier pour constituer son centre ferrique.

Néanmoins, cette hypersensibilité au peroxyde d'hydrogène n'est observée que si le peroxyde d'hydrogène est ajouté dans le milieu de culture dès l'inoculation. En effet, nous constatons que le peroxyde d'hydrogène n'a aucune incidence sur la croissance du mutant *dps1Ω* si il est ajouté en milieu de phase exponentielle, c'est-à-dire à  $DO_{600}$  0,7 (fig. 115). Selon l'état physiologique des bactéries, c'est-à-dire en phase stationnaire ou en phase exponentielle de croissance, le peroxyde d'hydrogène n'a pas le même effet. Le mutant *dps1Ω* et la souche sauvage sont peu sensibles au peroxyde d'hydrogène en phase exponentielle car les cellules ont un métabolisme qui peut le consommer et éliminer ce composé oxygéné. L'explication que l'on peut apporter est que le métabolisme bactérien est très ralenti en phase stationnaire (ici visualisé pendant la phase de latence) et par conséquent le peroxyde d'hydrogène s'accumule dans la bactérie. Dans ces conditions, la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937 est importante pour résister au peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la protéine Dps1 est sans doute exprimée dès l'entrée en phase stationnaire de croissance.

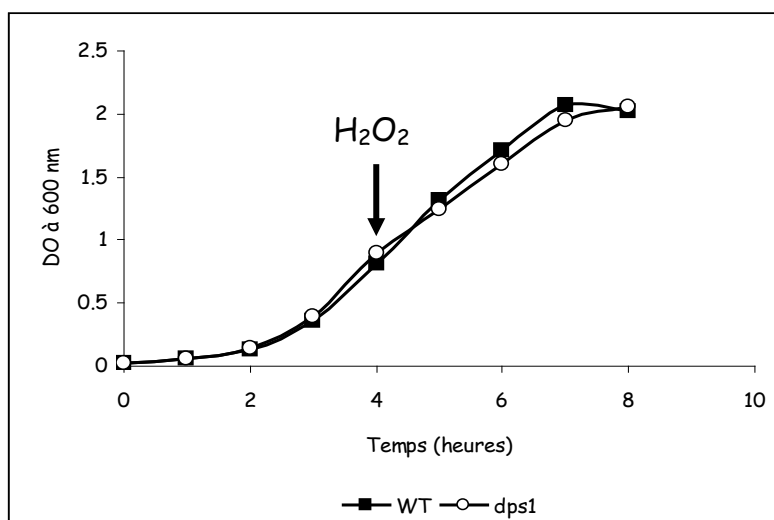


Figure 115 : Sensibilité au peroxyde d'hydrogène (0,3 mM) du mutant *dps1Ω* et de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Le peroxyde d'hydrogène a été ajouté en cours de croissance à  $DO_{600} \sim 0,7$ . La densité optique à 600 nm a été suivie au cours du temps.

Lorsque la culture en présence de peroxyde d'hydrogène est diluée dans du milieu « frais », la croissance bactérienne du mutant *dps1*Ω reprend. Par ailleurs, nous avons constaté que lorsque le peroxyde d'hydrogène est épuisé dans le milieu la croissance du mutant *dps1*Ω reprend. Ces résultats suggèrent que le peroxyde d'hydrogène a un effet bactériostatique et non bactéricide. En effet des cellules en phase stationnaire du mutant incubées en présence de 0,5 mM de peroxyde d'hydrogène restent viables (données non présentées).

En conclusion, nous pouvons vraisemblablement expliquer cette hypersensibilité au peroxyde d'hydrogène du mutant *dps1*Ω par un rôle direct de la protéine Dps1 dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène dans la bactérie. Elle pourrait l'utiliser pour oxyder le fer ferreux lors de la constitution de son centre ferrique. Des travaux réalisés par Ueshima et al. (2003) suggèrent fortement que la protection contre le peroxyde d'hydrogène conférée par Dps de *P. gingivalis* ne peut être attribuée à la séquestration du fer. En effet, un double mutant *dps ftn* est aussi sensible qu'un mutant *dps* au peroxyde d'hydrogène, de plus la protéine Dps ne contribue pas au stockage intracellulaire du fer chez cet organisme. Par ailleurs, Zhao et al. (2002) ont montré que la protéine Dps d'*E. coli* utilise préférentiellement le peroxyde d'hydrogène à l'oxygène pour oxyder le fer ferreux au niveau de son centre ferroxidase. Il faut souligner qu'il existe un second gène *dps2* dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937. Cette redondance de protéines Dps peut expliquer l'absence de sensibilité aux agents oxydants (paraquat et streptonigrine) du mutant *dps1*Ω. Nous devons construire un mutant *dps2*Ω et le double mutant *dps1*Ω *dps2*Ω pour pouvoir conclure.

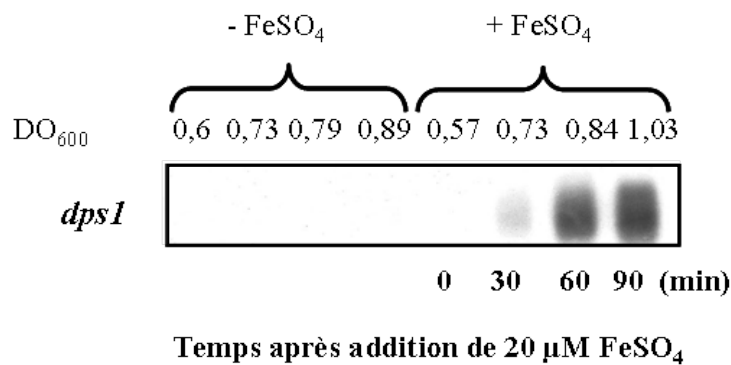


Figure 116 : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris jusqu'à une densité optique d'~ 0,6, à laquelle ont été ajoutés ou non 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels ont été extraits les ARNs.

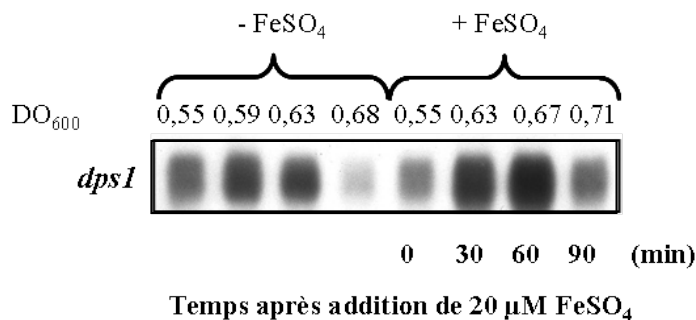


Figure 117 : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir du mutant *furΩ* d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu Tris jusqu'à une densité optique d'~ 0,5, à laquelle ont été ajoutés 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits.

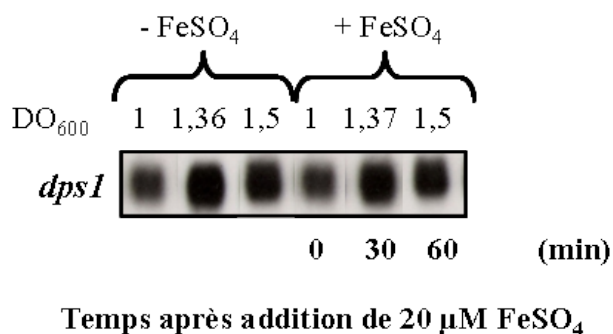


Figure 118 : Accumulation de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique d'~ 1, à laquelle ont été ajoutés ou non 20 μM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits.

## V- Régulation de l'expression du gène *dps1*

Si la ferritine Dps1 remplit une fonction de stockage du fer, l'expression du gène *dps1* devrait être modulée en fonction de la concentration en fer et par le régulateur global du métabolisme du fer, Fur (**F**erric **U**ptake **R**epressor). Or pour une raison inconnue, nous ne sommes pas parvenu à recombinaison des fusions transcriptionnelles *dps1::uidA* KmR et *dps1::uidA* CmR dans le chromosome d'*E. chrysanthemi* 3937. Nous avons donc analysé par Northern-blot l'expression du gène *dps1* au cours de la croissance bactérienne en milieu Tris avec ou sans fer ajouté. En absence de fer, nous ne détectons pas de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne de la souche sauvage en milieu Tris. Une heure après l'ajout de fer dans le milieu minimum Tris, on observe une forte accumulation de transcrits *dps1* (fig. 116). Il s'avère que l'expression du gène *dps1* est modulée en fonction de la disponibilité en fer dans le milieu minimum Tris. Nous supposons alors que l'induction par le fer du gène *dps1* en milieu Tris est dépendante de la protéine Fur. Nous n'avons pas identifié de boîte Fur dans la région promotrice du gène *dps1*, c'est pourquoi nous formulons l'hypothèse d'une régulation indirecte par Fur. Dans le mutant *fur* $\Omega$ , nous observons une accumulation importante de transcrits *dps1* au cours de la croissance bactérienne même en absence de fer (fig. 117). Le niveau d'expression du gène *dps1* dans le mutant *fur* $\Omega$  est même plus important que celui de la souche sauvage et plus précoce au cours de la croissance bactérienne (fig. 117). En effet, en absence de Fur, l'expression du gène *dps1* est quasiment « constitutive » : il y a dé-répression du gène *dps1*. De plus, nous remarquons que la quantité de transcrits *dps1* décline drastiquement à  $DO_{600} \sim 0,7$  dès l'entrée en phase stationnaire de croissance dans le mutant *fur* $\Omega$ , ce qui n'est pas le cas avec la souche sauvage (fig. 117). Ceci laisse supposer que dans le mutant *fur* $\Omega$  en phase stationnaire, le taux de transcription du gène *dps1* et/ou la stabilité de son messager diminue.

L'ensemble de ces données, montrant peu d'expression en milieu carencé en fer dans la souche sauvage, une constitutivité de l'expression dans le mutant *fur* $\Omega$  et un effet de la phase stationnaire, indique la mise en œuvre de différents niveaux de régulation impliquant vraisemblablement plusieurs effecteurs.

Nous avons alors étudié la transcription du gène *dps1* en milieu L. Dans ce milieu, la quantité de transcrits *dps1* s'accroît au cours de la croissance bactérienne de la souche sauvage indépendamment de l'ajout de fer. On observe une accumulation de transcrits *dps1* particulièrement en phase stationnaire de croissance (fig. 118).

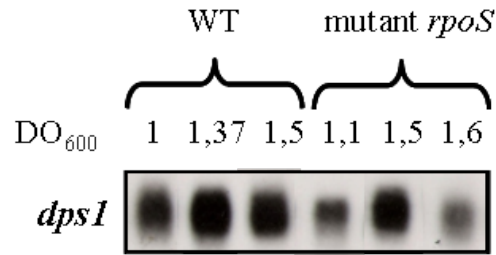


Figure 119 : Accumulation de transcrits *dpsI* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *rpoS* d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique d'~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20 µM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits.

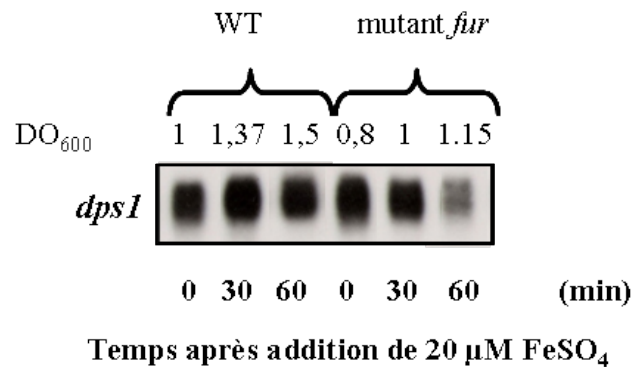


Figure 120 : Accumulation de transcrits *dpsI* au cours de la croissance bactérienne en milieu L détectée par Northern-blot sur des ARNs totaux isolés à partir de la souche sauvage et du mutant *fur* d'*E. chrysanthemi* 3937. Les bactéries ont été cultivées à 30°C en milieu L jusqu'à une densité optique d'~ 1, à laquelle ont été ajoutés 20 µM de FeSO<sub>4</sub>. Des prélèvements ont été effectués toutes les 30 min à partir desquels les ARNs ont été extraits.

L'induction d'un certain nombre de gènes en phase stationnaire de croissance est dépendante du facteur de transcription  $\sigma^S$ . En effet, nous observons que la quantité de transcrits *dps1* est significativement diminuée dans le mutant *rpoS* cultivé en milieu L surtout à DO<sub>600</sub> environ 1,5 en comparaison à la souche sauvage (fig. 119). Il semble donc que le gène *dps1* soit contrôlé par le facteur de transcription  $\sigma^S$ . De plus, l'analyse de la séquence du gène *dps1* et une expérience d'extension d'amorce ont montré la présence d'un promoteur avec un site -10 étendu de séquence TGCTATAAT susceptible d'être contrôlé par  $\sigma^S$ . Il faut souligner que chez *E. coli*, la protéine Dps est contrôlée par  $\sigma^S$  en phase stationnaire de croissance (Altuvia et al., 1994).

En milieu L, nous constatons que la quantité de transcrits *dps1* dans le mutant *fur* $\Omega$  diminue aussi en phase stationnaire (fig. 120) comme en milieu Tris. On sait que dans le mutant *fur* $\Omega$ , il y a un retard dans l'accumulation d'ARNm *rpoS* (chapitre III, fig. 101 et 102 [A]) qui peut donc conduire à une baisse de la transcription du gène *dps1*.

En conclusion, le gène *dps1* d'*E. chrysanthemi* est induit par la présence de fer en milieu minimum Tris, mais il n'est pas évident que cette régulation passe par la protéine Fur. En effet, dans le mutant *fur* $\Omega$  il y a expression du gène *dps1* indépendamment d'un apport de fer. Notre explication est que la concentration intracellulaire en fer est plus importante dans le mutant *fur* $\Omega$ . En effet, dans le mutant *fur* $\Omega$ , les systèmes de transport du fer via l'achromobactine et la chrysobactine sont déréprimés et le fer s'accumule alors dans la bactérie. L'augmentation de la concentration de fer intracellulaire dans le mutant *fur* $\Omega$  pourrait être impliquée dans l'induction du gène *dps1* suite à l'activation d'un ou plusieurs régulateurs impliqués dans la réponse au stress oxydant. On peut penser à des effecteurs appartenant à la famille LysR intervenant au niveau transcriptionnel tels OxyR ou PerR même si *E. chrysanthemi* ne possède pas de véritable PerR. Nous observons dans un mutant *fur* $\Omega$  une diminution significative de la quantité de transcrits *dps1* en phase stationnaire par rapport à la souche sauvage. On sait que dans le mutant *fur* $\Omega$ , il y a un retard dans l'accumulation d'ARNm *rpoS* (chapitre III) qui peut donc conduire à une baisse de la transcription du gène *dps1*. Cependant, nous proposons en plus l'hypothèse que la stabilité de l'ARNm *dps1* est réduite dans le mutant *fur* $\Omega$  en fin de croissance par un mécanisme à préciser. Enfin en milieu L, le gène *dps1* est exprimé au cours de la croissance bactérienne de la souche sauvage indépendamment de l'ajout de fer et sans doute sous le contrôle du facteur de transcription  $\sigma^S$ .

## V- Pouvoir pathogène du mutant *dps1*Δ

En ce qui concerne le pouvoir pathogène, la protéine Dps1 ne semble pas jouer un rôle majeur. Assurément, un mutant *dps1*Δ est aussi virulent que la souche sauvage sur feuilles d'endives (fig. 121) et sur plantes saintpaulia (données non présentées).



Souche WT

Mutant *dps1*Δ

Figure 121 : Symptômes sur feuilles d'endives après 50 h d'inoculation avec la souche sauvage de *E. chrysanthemi* 3937 et le mutant *dps1*Δ.

Toutefois, la présence des protéines Dps2 et FtnA pourrait compenser l'absence de la protéine Dps1. Pour conclure sur le rôle de la protéine Dps1 dans le pouvoir pathogène, il faudrait étudier la virulence des mutants *dps2*, *dps1 dps2*, *ftnA dps1*, et *ftnA dps1 dps2*.



# **Discussion et perspectives**

Durant l'infection, les cellules d'*E. chrysanthemi* 3937 se disséminent au niveau de l'apoplasme du végétal où elles doivent s'adapter à des conditions de stress oxydant et une faible disponibilité en fer. Comme le fer est essentiel à la croissance bactérienne, la bactérie doit se prémunir d'une carence en cet élément en constituant des réserves intracellulaires. Paradoxalement, le fer peut générer des radicaux hydroxyles hautement toxiques via la réaction de Fenton, c'est pourquoi la bactérie doit maintenir ce métal sous forme non réactive. Une régulation fine de la concentration intracellulaire en fer est donc primordiale pour la bactérie dans ces conditions. Ce contrôle est assuré par les ferritines qui séquestrent le fer sous forme non réactive et biodisponible. L'objectif de mon travail a été de caractériser l'équipement en ferritines d'*E. chrysanthemi* 3937, de déterminer leurs rôles respectifs dans l'homéostasie du fer et leur implication dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Je vais discuter ci-dessous les résultats de mes travaux en les intégrant à l'ensemble des données de la littérature. Une partie de ces résultats est incluse dans une première publication parue dans *Biometals* (annexe 10).

## **I- Ferritines : acteurs du stockage intracellulaire du fer chez *E. chrysanthemi* 3937**

A partir de la séquence complète du génome d'*E. chrysanthemi* 3937, nous avons dressé un inventaire des gènes codant des ferritines potentielles. Nous avons ainsi identifié parmi la centaine de gènes dédiés au métabolisme du fer quatre gènes codant des ferritines potentielles qui appartiennent aux trois familles définies, une ferritine de type eucaryote FtnA, une bactérioferritine Bfr et deux protéines Dps. Les ferritines FtnA et Bfr d'*E. chrysanthemi* sont très homologues à celles d'*E. coli* et de *Y. pestis*, ou d'autres espèces appartenant au groupe des entérobactéries. La protéine Dps1 est proche de celle d'*E. coli* ou de *Y. pestis*, alors que la protéine Dps2 présente plus d'identité de séquence avec celle de *V. cholerae* ou *B. fragilis*. L'analyse des séquences protéiques des polypeptides de chacune de ces ferritines montre que leurs centres ferroxidases sont conservés à l'intérieur d'une même sous-classe chez différents organismes. Les résidus impliqués dans la fixation du fer au niveau des sites ferroxidases des maxi-ferritines FtnA et Bfr sont identiques à ceux trouvés pour les autres maxi-ferritines.

Mutant		<i>ftnA</i> Δ	<i>bfr</i> Δ	<i>dps1</i> Δ
<b>Sensibilité</b>	Carence en fer	Oui	Non	Non
	Paraquat	Oui	Non	Non
	Streptonigrine	Oui	Non	Non
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oui	Non	Oui
<b>Pouvoir pathogène</b>	saintpaulia	Retard	+	+
	endive	Retard	Retard	+

Tableau 7 : Récapitulatif des phénotypes des différents mutants *ftnA*Δ, *bfr*Δ et *dps1*Δ d'*E. chrysanthemi* 3937. Le signe + indique que le mutant se comporte comme la souche sauvage.

De même, les centres ferroxidases des polypeptides Dps1 et Dps2 sont conservés avec ceux des mini-ferritines Dps. Les résidus impliqués dans le centre ferroxidase et la localisation du centre ferroxidase des mini-ferritines Dps1 et Dps2 sont différents de ceux trouvés dans les maxi-ferritines FtnA et Bfr. Alors que le centre ferroxidase des maxi-ferritines est formé de résidus histidine, glutamate, glutamine et tyrosine et se trouve localisé au centre de la sous-unité, le centre ferroxidase des mini-ferritines Dps est formé de résidus histidine, aspartate et glutamate et est localisé à l'interface de deux sous-unités. La maxi-ferritine Bfr possède le résidu méthionine localisé en position 52 de la séquence protéique conservé qui serait impliqué dans la fixation de l'hème de type b. La fonction des groupements hème n'est pas encore connue (Chasteen, 1998 ; Romao et *al.*, 2000). Néanmoins l'hème n'est pas requis à l'entrée et au stockage du fer dans la bactérioferritine chez *E. coli* et l'hème serait impliqué dans la réduction du coeur ferrique et dans la sortie du fer (Andrews et *al.*, 1995 ; 1998).

La multiplicité des ferritines au sein d'*E. chrysanthemi* nous amène à nous interroger sur leurs fonctions physiologiques respectives chez cet organisme d'autant que de nombreuses espèces bactériennes ne possèdent pas ces différents types de ferritines. Quel est l'intérêt de la bactérie à posséder toutes ces ferritines si ce n'est qu'elles remplissent des rôles distincts et qu'elles interviennent dans des conditions différentes. Pour apporter des éléments de réponse concernant les fonctions physiologiques des différentes ferritines FtnA, Bfr et Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937, nous avons inactivé les gènes chromosomiques *ftnA*, *bfr* et *dps1* dans la souche 3937 d'*E. chrysanthemi* par génétique inverse. Puis nous avons caractérisé physiologiquement les mutants simples *ftnA* $\Omega$ , *bfr* $\Omega$ , *dps1* $\Omega$  et le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ . Les résultats obtenus au cours de ce travail sont résumés dans le tableau 7.

Les mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  affichent un défaut de croissance lorsqu'ils sont cultivés en milieu minimum Tris ou milieu riche L. D'une façon générale, ils sont davantage affectés en présence de chélateurs du fer. Il faut souligner que le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présente un phénotype intermédiaire entre celui de la souche sauvage et le mutant *ftnA* $\Omega$ . En revanche, les mutants *bfr* $\Omega$  et *dps1* $\Omega$  se comportent comme la souche sauvage en carence en fer. La ferritine FtnA semble donc être critique pour la bactérie surtout en conditions de carence en fer contrairement aux ferritines Bfr et Dps1. La ferritine FtnA serait donc la réserve de fer privilégiée chez *E. chrysanthemi* 3937 lorsque la disponibilité en fer dans l'environnement devient restreinte. La capacité de la ferritine FtnA à fixer du fer a d'ailleurs été démontrée par marquage au Fe<sup>59</sup>. A contrario la bactérioferritine Bfr et la protéine Dps1 semblent jouer un rôle mineur dans le stockage intracellulaire à long terme du fer. Toutefois, la bactérioferritine et la protéine Dps1 sont capables de fixer du fer comme le montre

l'analyse des protéines marquées au Fe<sup>59</sup>. La bactéroferritine Bfr ne peut pas remplacer fonctionnellement la ferritine FtnA chez *E. chrysanthemi* 3937. Pour recadrer nos données, nous rappelons ici que chez *E. coli*, une mutation *ftnA* résulte en une sensibilité accrue en présence de chélateurs du fer seulement lorsque les bactéries sont pré-cultivées avec d'abondantes quantités en fer alors qu'une mutation *bfr* n'affecte pas la croissance bactérienne dans ces conditions, comme chez *E. chrysanthemi* (Abdul-Tehrani et al., 1999). En revanche, il existe des microorganismes où la bactéroferritine possède une fonction dans la sensibilité à la carence en fer. Ainsi, des mutants *bfrA*<sup>-</sup>, *bfrB*<sup>-</sup> et *bfrA*<sup>-</sup> *bfrB*<sup>-</sup> de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 sont affectés pour leur croissance en conditions limitantes en fer (Keren et al., 2004). De plus, le mutant de régulation *pfsR*, où le gène codant la bactéroferritine est très fortement exprimé, est moins sensible à la carence en fer en faible intensité lumineuse que la souche sauvage (Jantaro et al., 2006). De même, la croissance du mutant *bfrB* de *N. gonorrhoeae* est réduite en carence en fer par rapport à la souche sauvage (Chen et Morse, 1999). Il faut néanmoins souligner que ces microorganismes ne possèdent pas d'autres types de maxi-ferritines contrairement à *E. chrysanthemi* ou *E. coli*. Ainsi, la bactéroferritine constituerait la source de fer exclusive chez ces microorganismes.

Nous avons étudié si l'absence des maxi-ferritines FtnA et Bfr perturbe les voies de transport du fer à haute affinité dépendant des sidérophores chez *E. chrysanthemi* 3937. En absence de ferritine, l'accumulation de fer à l'intérieur de la bactérie peut en effet ralentir ou abaisser la production de ces sidérophores pour limiter l'entrée de ce métal et éviter que sa concentration ne soit trop importante. Nous supposons un rétrocontrôle du système exercé par le répresseur transcriptionnel Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulator) qui constitue en quelque sorte une soupape de sécurité. En effet si la concentration intracellulaire en fer réactif Fe<sup>2+</sup> augmente en absence de ferritine FtnA, la protéine Fur pourrait en effet réprimer ces voies même en absence de fer exogène ajouté. Or la mutation *ftnA* n'influence pas la transcription des gènes des systèmes achromobactine et chrysobactine chez *E. chrysanthemi* 3937. Nous soupçonnons que le pool de fer libéré à partir de la ferritine FtnA n'est pas perçu par le répresseur transcriptionnel Fur car en carence en fer ce métal doit être probablement directement pris en charge par d'autres protéines. Pour des raisons de résistance croisée, nous n'avons pas construit de mutants présentant une fusion transcriptionnelle *fct::lacZ* ou *acs::lacZ* dans un contexte *bfr*<sup>-</sup>. Il faudra construire ces mutants pour analyser l'influence d'une mutation *bfr*<sup>-</sup> sur l'expression des gènes *fct* et *acs*. De manière inattendue, nous avons remarqué que la mutation *ftnA*<sup>-</sup> n'affecte pas la croissance bactérienne en milieu Tris dans un mutant affecté dans ses systèmes d'acquisition du fer. Une explication possible est une diminution de la concentration intracellulaire en fer lorsque les systèmes de transport du fer à

haute affinité dépendant de la chrysobactine et de l'achromobactine sont abolis résultant en une sensibilité réduite du mutant *ftnA $\Omega$*  dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que le défaut de croissance du mutant *ftnA $\Omega$*  est lié à une accumulation intracellulaire de fer réactif. Afin de vérifier nos dires, nous devons inspecter la sensibilité des mutants *ftnA fct* et *ftnA acs* au stress oxydant et la distribution intracellulaire du fer dans ces mutants. Par ailleurs, les mutants *ftnA* et *bfr* produisent la même quantité de ces deux sidérophores que la souche sauvage en carence en fer. Toutefois, il conviendrait de quantifier les cinétiques de transport pour s'assurer que la vitesse d'entrée des ferri-sidérophores n'est pas modifiée dans les mutants *ftnA $\Omega$*  ou *bfr $\Omega$* . Il conviendrait de faire la même étude pour le double mutant *ftnA $\Omega$  bfr $\Omega$* . Une autre hypothèse à envisager est l'éventuel effet de ces mutations sur des systèmes d'efflux du fer comme par exemple la protéine FieF (**Ferrous Iron Efflux**).

## II- Ferritines : protection contre la toxicité du fer et de l'oxygène ?

Si les protéines FtnA, Bfr et Dps1 remplissent une fonction dans l'homéostasie du fer, leur absence devrait modifier la concentration intracellulaire en fer ferreux réactif et par conséquent la sensibilité au stress oxydant. Or seuls les mutants *ftnA $\Omega$*  et *ftnA $\Omega$  bfr $\Omega$*  sont plus sensibles au stress oxydant et nitrosylant chez *E. chrysanthemi*. Le double mutant *ftnA $\Omega$  bfr $\Omega$*  est affecté par le paraquat, la streptonigrine ou la spermine NONOate, mais de manière intermédiaire entre la souche sauvage peu sensible et le mutant *ftnA $\Omega$*  qui est très sensible à ces composés. La ferritine FtnA en séquestrant le fer prévient les effets toxiques de ce métal : en effet la surexpression de la ferritine FtnA restaure la croissance du mutant *sufC*, altéré dans la biosynthèse des centres [Fe-S], en présence de streptonigrine alors que la surexpression de la bactéroferritine Bfr ne supprime pas la sensibilité du mutant *sufC* à la streptonigrine. A l'inverse de la ferritine FtnA, la bactéroferritine Bfr ne semble pas participer à la résistance au stress oxydant et nitrosylant. L'ensemble des résultats conforte l'hypothèse formulée précédemment à savoir que la bactéroferritine Bfr contribue au stockage intracellulaire du fer de façon mineure.

Des travaux réalisés chez *E. coli* montrent que des mutants *ftnA* et *bfr* ne sont pas plus sensibles à l'oxyde nitrique NO, à l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> et au peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Par contre lorsque le gène *fur* est inactivé, des mutants *ftnA*, *bfr* et *ftnA bfr* présentent une sensibilité accrue au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à l'hydroperoxyde de cumène en comparaison au mutant *fur*. Dans un contexte *fur*<sup>+</sup>, ces mutants ne sont pas plus sensibles que la souche sauvage à ces composés (Abdul-Tehrani et al., 1999). De même, le mutant *bfr* de *B. melitensis* se comporte comme la souche sauvage en présence de paraquat et de peroxyde d'hydrogène (Denoel et al.,

1997). Toutefois, le mutant *bfrB* de *N. gonorrhoeae* ou *bfrA* de *P. aeruginosa* sont plus sensibles au stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et/ou paraquat) en comparaison à la souche sauvage, suggérant un rôle de la bactérioferritine dans la résistance au stress oxydant chez ces organismes (Chen et Morse, 1999 ; Ma et al., 1999). Il faut souligner que ces microorganismes ne possèdent pas de ferritine de type eucaryote, ce qui expliquerait les différences de phénotype d'un microorganisme à un autre. La bactérioferritine joue un double rôle ici en constituant un réservoir de fer et en conférant la résistance au stress oxydant de manière indirecte en empêchant le fer de participer à la réaction de Fenton et de produire des radicaux hydroxyles.

La surexpression du gène *fnA* réduit la sensibilité du mutant *fur recA* d'*E. coli* au stress oxydant, plus exactement à l'oxygène. Dans le mutant *fur recA*, la concentration en fer réactif est plus importante que dans la souche sauvage d'*E. coli* suggérant que la surproduction de ferritine FtnA permet d'abaisser les quantités de fer ferreux réactif alors que la surexpression du gène *bfr* ne compense pas la sensibilité du même mutant à l'oxygène (Touati et al., 1995). De plus, l'activité ferroxidase de la ferritine FtnA consomme l'oxygène et empêche ainsi la formation d'espèces actives de l'oxygène. Bou-Abdallah et al. (2002) ont démontré qu'en présence de bactérioferritine, la production de radicaux hydroxyles à partir de l'oxydation de fer ferreux par le peroxyde d'hydrogène est considérablement diminuée chez *E. coli*. En effet, la bactérioferritine utiliserait préférentiellement le peroxyde d'hydrogène comme oxydant pour constituer son centre ferrique, mais est capable de réaliser la réaction avec de l'oxygène toutefois plus lentement que la ferritine Ftn. Un autre rôle est ainsi attribué aux maxi-ferritines, celui de limiter la toxicité de l'oxygène, en l'incorporant et le concentrant au même titre que le fer dans leur cavité centrale.

Un mutant *dps1*Ω d'*E. chrysanthemi* 3937 n'est pas affecté à un stress oxydant généré par le paraquat et la streptonigrine; en revanche il est extrêmement sensible au peroxyde d'hydrogène en phase stationnaire de croissance. Toutefois, il est peu affecté par le peroxyde d'hydrogène en phase exponentielle de croissance au même titre que la souche sauvage. Les bactéries sont dans des états physiologiques distincts selon qu'elles sont en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance. En effet, le métabolisme bactérien est considérablement ralenti en phase stationnaire et le peroxyde d'hydrogène n'est plus consommé et s'accumule donc intracellulairement occasionnant des dommages irréversibles. La protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937 serait donc importante en phase stationnaire de croissance pour résister au peroxyde d'hydrogène. Une analyse complète de la régulation de l'expression du gène *dps1* pourra nous éclairer en confirmant que la protéine Dps1 est exprimée dès l'entrée en phase stationnaire de croissance et en déterminant les régulateurs mis

en jeu. Les mutants *dps* d'*E. coli*, de *P. gingivalis* et de *C. jejuni* sont également plus sensibles au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage en phase stationnaire (Ueshima et al., 2003, Ishikawa et al., 2003 ; Almiron et al., 1992).

Mais comment la protéine Dps1 peut conférer la résistance au peroxyde d'hydrogène ? Deux hypothèses non exclusives peuvent être avancées : i) la fixation du fer ferreux par la protéine Dps1 et ii) la consommation du peroxyde d'hydrogène par son centre ferroxidase.

Le fer ferreux est capable de produire en présence de peroxyde d'hydrogène des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton, c'est pourquoi l'aptitude à fixer du fer serait importante dans la résistance au stress oxydant. En absence de Dpr, les cellules de *S. suis* sont plus sensibles à la streptonigrine et à l'inverse une surexpression de Dpr rend les cellules plus résistantes à la streptonigrine (Pulliainen et al., 2005). D'ailleurs, l'absence de Dpr réduit la quantité totale de Fe<sup>55</sup>Cl<sub>3</sub> emmagasinée par les cellules, par contre la surexpression de Dpr augmente la quantité totale de Fe<sup>55</sup>Cl<sub>3</sub> (Pulliainen et al., 2005). Des travaux par spectrométrie ESR réalisés par Yamamoto et al. (2004) montrent qu'un mutant *dpr* de *S. mutans* accumule plus de fer libre intracellulairement que la souche sauvage. L'addition de la protéine Dpr purifiée de *S. mutans* inhibe *in vitro* la formation de radicaux hydroxyles en présence de fer ferreux et d'oxygène (Yamamoto et al., 2002). Un mutant *dpr* de *S. mutans* est extrêmement sensible à l'oxygène. La protéine Dpr contribue à la tolérance à l'oxygène sans doute par son aptitude à fixer le fer (Yamamoto et al., 2000). Chez *S. mutans*, l'expression du gène *dpr* complémente la sensibilité à l'hydroperoxyde de cumène d'un mutant *ahpCF*. Un mutant *napA* contient une quantité de fer libre intracellulaire supérieure à celle de la souche sauvage de *H. pylori* et est plus sensible au stress oxydant et à l'oxygène (Wang et al., 2006). Ces données de la bibliographie attestent de la capacité des protéines Dps à fixer du fer. L'aptitude à fixer du fer des protéines Dps pourrait conférer la résistance au stress oxydant. Nous nous interrogeons sur le fait que ces mutants ne sont pas seulement sensibles au peroxyde d'hydrogène, mais de manière générale au stress oxydant. Une proposition avancée est que ces souches bactériennes n'ont pas d'autres ferritines. Or, *H. pylori* possède une ferritine de type eucaryote Pfr en plus de la protéine NapA.

Cependant, nos données suscitent l'idée que la résistance au peroxyde d'hydrogène conférée par Dps1 n'est pas directement liée à sa propriété de fixer du fer comme pour la ferritine FtnA. En effet, la croissance du mutant *dps1Ω* n'est pas affectée par d'autres composés tels que le paraquat et la streptonigrine, antibiotique dont la toxicité est fonction de la concentration intracellulaire en fer. On suppose donc que l'inactivation du gène *dps1* d'*E. chrysanthemi* 3937 ne provoque pas d'augmentation de la quantité de fer réactif dans la bactérie. Pour exclure cette possibilité, il faudrait vérifier que l'addition d'un chélateur du fer



ne supprime pas la sensibilité au peroxyde d'hydrogène du mutant *dps1Ω* ou encore tester si un mutant *dps1Ω tonB* ou *dps1Ω fct acr*, où le transport de fer dépendant des sidérophores est aboli et la concentration intracellulaire en fer diminuée, est encore sensible au peroxyde d'hydrogène comme le mutant *dps1Ω*. Pour répondre à cette interrogation, nous pourrions également analyser la distribution intracellulaire du fer dans un mutant *dps1Ω* par spectrométrie Mössbauer et démontrer que le ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  reste inchangé par rapport à la souche sauvage. Nous proposons aussi de construire un double mutant *ftnAΩ dps1Ω* afin de déterminer s'il est plus sensible au stress oxydant que le mutant *ftnAΩ*. Il serait intéressant de surexprimer la protéine Dps1 dans les mutants *ftnAΩ* et *sufC*, et d'étudier le comportement de ces mutants en conditions de stress oxydant. Des travaux réalisés par Ueshima et al. (2003) montrent que la protection à l'encontre du peroxyde d'hydrogène procurée par la protéine Dps de *P. gingivalis* ne peut être attribuée à la séquestration du fer. Effectivement, le mutant *dps* n'est pas plus sensible que la souche sauvage à une carence en fer suggérant que la protéine Dps ne contribue pas au stockage intracellulaire du fer chez ce microorganisme. D'autre part, le double mutant *dps ftn* de *P. gingivalis* est aussi sensible au peroxyde d'hydrogène que le mutant *dps* ; la mutation *ftn* n'exacerbe donc pas la sensibilité à cet élément dans un contexte *dps*.

L'hypothèse que nous privilégions est que la protéine Dps1 confère la résistance au peroxyde d'hydrogène en consommant cette molécule pour constituer son centre ferrique. La ferritine FtnA, quant à elle, consomme une molécule d'O<sub>2</sub> pour réaliser la même réaction et ne confère donc pas une telle tolérance au peroxyde d'hydrogène. D'ailleurs, Zhao et al. (2002) et Su et al. (2005) ont montré que les protéines Dps d'*E. coli* et de *L. innocua* utilisent préférentiellement une molécule de peroxyde d'hydrogène pour oxyder deux atomes de fer ferreux au niveau de leur centre ferroxidase empêchant la formation de radicaux hydroxyles. Des mutations au niveau des résidus du site ferroxidase de la protéine Dps de *L. innocua* affectent la tolérance au peroxyde d'hydrogène (Ilari et al., 2005). De même, la bactérioferritine d'*E. coli* préfère également le peroxyde d'hydrogène pour réaliser la réaction de ferroxidation et contribue à inhiber la réaction de Fenton (Bou-Abdallah et al., 2002 ; Yang et al., 2000).

Dans la littérature, de nombreuses protéines Dps sont décrites comme ayant la propriété de se fixer à l'ADN de manière non spécifique en polymérisant autour de la double hélice d'ADN en période de stress, formant ainsi des couches superposées successives où s'intercale l'ADN (Wolf et al., 1999). Cette structure particulière permettrait de protéger l'ADN génomique de divers stress, stress oxydant, lumière UV, choc thermique ou acide, dégradation par des nucléases, apportant ainsi une nouvelle explication quant au rôle de

protection exercé par la protéine Dps qui n'est pas incompatible avec les théories précédentes de séquestration du fer et de consommation du peroxyde d'hydrogène (Martinez et Kolter, 1997 ; Nair et Finkel, 2004 ; Choi et *al.*, 2000). En effet, il a été montré *in vitro* que la forme de Dps de *H. hepaticus* ou de NapA de *H. pylori* chargée en fer présente une meilleure aptitude à se fixer à l'ADN que la forme native (Hong et *al.*, 2006 ; Wang et *al.*, 2006). Nous ne savons rien sur le mécanisme par lequel l'ADN s'intègre dans la structure cristalline. Toutefois, il apparaît que le mécanisme de formation de la structure cristalline est réversible dès lors que le stress est levé. D'autres travaux laissent penser que la fixation de la protéine Dps à l'ADN n'est pas à l'origine de la protection contre le stress oxydant car en effet le mutant *dps* de *P. gingivalis* n'est pas plus sensible que la souche sauvage à des agents endommageant l'ADN tels que la mitomycine C ou le metronidazole ; pourtant la protéine Dps de *P. gingivalis* est capable de se fixer à l'ADN (Ueshima et *al.*, 2003). Il serait intéressant de purifier la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937 et d'étudier ses propriétés catalytiques et son aptitude à se fixer à l'ADN. On peut en effet se poser la question de savoir si la protéine Dps qui forme la structure cristalline est identique à celle qui est native et dodécamérique.

Chez *E. chrysanthemi*, l'absence des ferritines FtnA ou Bfr n'apparaît pas peser sur le contenu en fer total en phase stationnaire comme l'a montré l'analyse par ICP-AES. Quant au double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ , il est en cours d'analyse. Il faudra continuer les investigations en ce qui concerne les protéines Dps. Des mutants *ftnA* et *ftnA bfr* d'*E. coli* présentent une concentration cellulaire en fer réduite de 50% par rapport à celle de la souche sauvage en phase stationnaire de croissance. En phase exponentielle, la concentration intracellulaire en fer est identique pour ces mutants et la souche sauvage. Cependant, un mutant *bfr* d'*E. coli* présente un contenu intracellulaire en fer comparable à celui de la souche sauvage, suggérant que la bactérioferritine Bfr est dispensable au stockage intracellulaire du fer lors de la croissance (Abdul-Tehrani et *al.*, 1999). Des travaux ont montré que moins de 1% du fer total est attribué à la bactérioferritine Bfr chez *E. coli* (Bauminger et *al.*, 1980). Au contraire, chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 environ 50% du fer intracellulaire est contenue dans la bactérioferritine, ferritine exclusive de l'organisme. Des cultures des mutants  $\Delta$ *bfrA*,  $\Delta$ *bfrB* et  $\Delta$ *bfrA*  $\Delta$ *bfrB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 voient leur contenu en fer baisser de manière dramatique lorsque les cellules en fin de phase exponentielle sont traitées à l'EDTA (Keren et *al.*, 2004).

Bien qu'aucune différence dans le contenu en fer n'ait été détecté par ICP-AES dans les mutants de ferritine *ftnA* $\Omega$  et *bfr* $\Omega$  chez *E. chrysanthemi*, l'analyse par spectrométrie Mössbauer révèle une répartition différentielle du fer au sein de la bactérie. En effet, le fer est principalement à l'état ferreux dans les mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  d'*E. chrysanthemi* contrairement à la souche sauvage et au mutant *bfr* $\Omega$  où ce métal est principalement à l'état ferrique. Les mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présentent respectivement 62 et 66 % de fer ferreux, alors que la proportion de fer ferreux par rapport à celle de fer ferrique est beaucoup moins importante dans la souche sauvage et le mutant *bfr* $\Omega$  avec un ratio de 30/70. Il semblerait que le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présente moins de fer d'après les spectres Mössbauer, mais ce résultat est à mettre au conditionnel et demande à être renforcé par une expérience quantitative. Ce résultat permet d'expliquer pourquoi paradoxalement le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  est moins sensible au stress oxydant que le mutant *ftnA* alors qu'il présente un ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  de 66% équivalent à celui du mutant *ftnA*. Ainsi, nos résultats confirment que la ferritine FtnA séquestre le fer sous forme ferrique et contribue pour une part importante au stockage intracellulaire du fer chez *E. chrysanthemi* 3937 contrairement à la bactérioferritine Bfr dont l'influence dans le stockage intracellulaire reste limitée. La sensibilité accrue des mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  au stress oxydant est cohérente avec l'augmentation d'un facteur 2 de la concentration de fer ferreux par rapport à celle de fer ferrique chez ces mutants par rapport à la souche sauvage ou au mutant *bfr* $\Omega$ . L'indifférence du mutant *bfr* $\Omega$  vis-à-vis d'agents générant du stress oxydant est logique d'après le ratio  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  identique à celui de la souche sauvage. Chez *E. coli*, la proportion de fer ferreux mesurée par spectrométrie Mössbauer augmente un peu dans les mutants *ftnA* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  par rapport à celle de la souche sauvage et la quantité totale de fer diminue de moitié en phase stationnaire expliquant pourquoi les mutants ne sont pas plus sensibles au stress oxydant que la souche sauvage (Abdul-Tehrani et al., 1999).

### **III- Ferritines et leur contribution au pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* 3937**

La mutation du gène *ftnA* affecte la virulence d'*E. chrysanthemi* 3937 sur feuilles d'endive et sur saintpaulia. Toutefois, il s'agit seulement d'un retard de développement de symptômes qui est compensé après quelques temps. En effet, le mutant *ftnA* $\Omega$  est capable de provoquer une infection systémique comme la souche sauvage. Ce retard au cours des premières étapes de l'infection peut être attribué à la sensibilité au stress oxydant et à la carence en fer du mutant *ftnA* $\Omega$ .

Nous avons montré que l'absence de ferritine FtnA influence la production de pectate lyase qui est un déterminant majeur du pouvoir pathogène chez *E. chrysanthemi* 3937. En effet, en carence en fer, l'activité pectate lyase est beaucoup plus importante dans le mutant *ftnA* $\Omega$  que dans la souche sauvage, ce qui explique pourquoi le retard initial est finalement compensé.

De même, les mutants *bfr* $\Omega$  et *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$  présentent un retard de développement des symptômes sur endives. Bien que la bactérioferritine ne confère pas de résistance au stress oxydant et n'est pas essentielle lors d'une carence en fer, son absence affecte la virulence de la bactérie notamment lors des premières étapes de l'infection sur endive. Par contre, la virulence du mutant *bfr* $\Omega$  n'est pas diminuée sur saintpaulia. Ces résultats démontrent l'implication des ferritines FtnA et Bfr dans le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi*. Un stockage fonctionnel, ainsi qu'une bonne répartition de ce métal permettrait à la bactérie de se multiplier de façon efficace au début de l'infection. Il faudra tester sur saintpaulia le double mutant *ftnA* $\Omega$  *bfr* $\Omega$ . En revanche, une mutation *dps1* n'affecte pas le pouvoir pathogène d'*E. chrysanthemi* sur endives et sur saintpaulia, ce qui est surprenant étant donné la sensibilité de ce mutant au peroxyde d'hydrogène. D'ailleurs, il est montré que du peroxyde d'hydrogène est produit par la plante et constitue une réaction de défense de la plante en réponse à l'infection. Toutefois, le mutant *dps1* $\Omega$  est affecté par le peroxyde d'hydrogène uniquement en phase stationnaire. En effet pour les raisons évoquées précédemment, le mutant *dps1* $\Omega$  n'est pas plus sensible que la souche sauvage au peroxyde d'hydrogène en phase exponentielle et peut donc se multiplier *in planta*. Par ailleurs, le mutant *dps1* $\Omega$  n'est pas sensible à la carence en fer, condition rencontrée au site de l'infection *in planta*. Nous ne pouvons pas conclure quant à l'importance de la protéine Dps1 dans la virulence d'*E. chrysanthemi* car cette dernière possède une seconde protéine Dps qui pourrait compenser l'absence de la première. Il faudra donc construire le mutant *dps2* et le double mutant *dps1* *dps2* et étudier leur phénotype.

Nos données obtenues en étudiant les mutants perdant la capacité de produire les différentes ferritines a permis d'apporter des informations concernant leur rôle respectif chez *E. chrysanthemi* 3937. Si l'on compare nos données à ce qui est décrit chez d'autres bactéries, on souligne que les phénotypes des mutants « ferritine » ne sont donc pas semblables et varient d'une espèce à une autre en fonction de leur équipement en protéines de cette famille et de leur écologie.

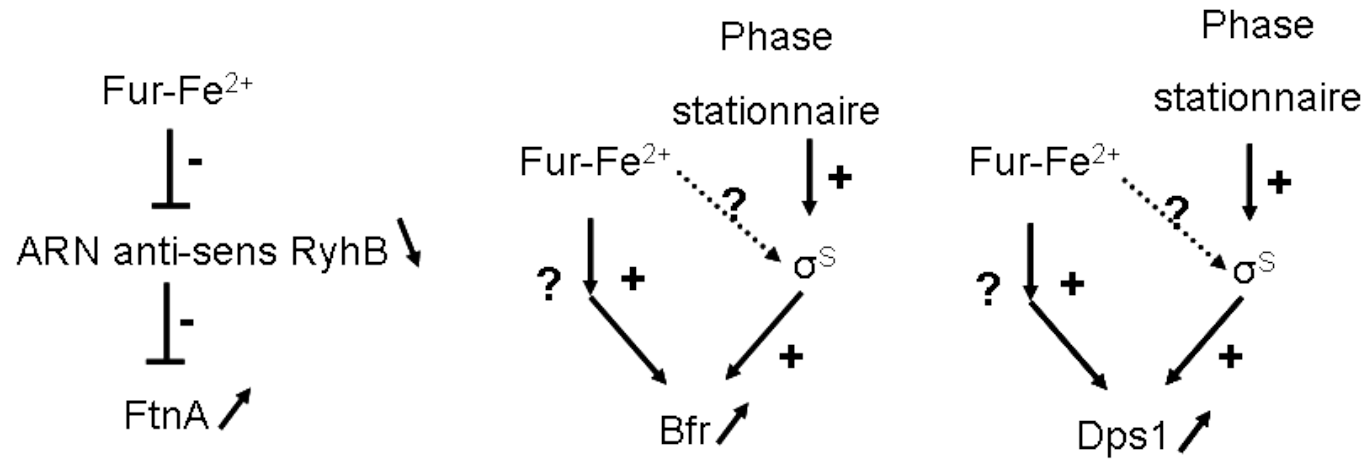


Figure 122 : Régulation de l'expression des ferritines d'*E. chrysanthemi* 3937.

#### IV- Régulation différentielle de l'expression des ferritines chez *E. chrysanthemi* 3937

Comme pouvait le laisser supposer la fonction des ferritines, nous avons montré que l'expression des gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1* est contrôlée en fonction de la biodisponibilité en fer et par le répresseur transcriptionnel Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulator). Toutefois, ces gènes sont régulés différemment au cours de la croissance bactérienne.

Le gène *ftnA* est induit par l'apport exogène de fer et est réprimé par la carence en fer en milieu riche L ou minimum Tris. Nous avons montré que dans un mutant *fur*, le gène *ftnA* est transcrit faiblement et n'est plus induit par l'ajout de fer. Ce faible taux de transcription du gène *ftnA* dans un mutant *fur* est dû à l'ARN anti-sens RyhB qui s'apparie avec l'extrémité 3' de l'ARNm *ftnA*. Cet appariement résulte sans doute en la dégradation du messenger *ftnA* et/ou au blocage de sa traduction. Nous avons clairement mis en évidence une région d'appariement entre RyhB et le transcrit *ftnA*. De plus, nous avons identifié une boîte Fur dans la région promotrice du gène *ryhB* suggérant que le gène *ryhB* est contrôlé négativement par la protéine Fur. Dans un mutant *fur*, il y a sans doute accumulation de l'ARN RyhB qui va provoquer une diminution de la transcription du gène *ftnA*. Le mécanisme de contrôle post-transcriptionnel par RyhB requiert probablement la protéine Hfq et l'endonucléase RNaseE comme décrit chez *E. coli*. L'analyse du génome d'*E. chrysanthemi* 3937 a révélé la présence d'une ORF codant une protéine Hfq potentielle (ABF 15209) présentant 80% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* et une ORF codant une enzyme RNaseE potentielle (ABF 14584) présentant 60% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* (annexe 11). Le rôle respectif des deux protagonistes reste à être précisé chez *E. chrysanthemi* 3937. Il faudrait envisager de vérifier la stabilité de l'ARN RyhB dans un mutant *fur* et montrer expérimentalement la fixation de Fur sur la région promotrice du gène *ryhB* par un essai de retard sur gel et une expérience d'empreinte à la DNaseI (footprinting). Nous pourrions aussi analyser l'expression du gène *ryhB* au niveau transcriptionnel en absence du répresseur Fur et en présence de fer.

Chez *E. coli*, un mutant *fur* exprime beaucoup moins le gène codant la ferritine FtnA confirmant que Fur contrôle positivement l'expression du gène *ftnA* (Abdul-Tehrani et al., 1999). Plus récemment, une expérience de RT-PCR a mis en évidence une répression du gène *ftnA* d'*E. coli* par une carence en fer ou une mutation *fur* (Mc Hugh et al., 2003). Des travaux réalisés chez *E. coli* et *V. cholerae* ont démontré que le gène *ryhB* est induit par une carence en fer et l'absence de Fur (Gottesman et al., 1999 ; Davis et al., 2005 ; Mey et al., 2005b).

Toutefois, l'absence de Fur chez *V. cholerae* n'abolit pas complètement la régulation par le fer du gène *ryhB*, ce qui suggère qu'un autre régulateur répondant au fer intervient. Par ailleurs, des travaux préliminaires ont montré que le gène *fnA* d'*E. chrysanthemi* 3937 n'est pas induit par un stress oxydant généré par le paraquat ou la streptonigrine (Thierry Franza, communication personnelle).

Le gène *bfr* d'*E. chrysanthemi* est exprimé en phase stationnaire de croissance en milieu L indépendamment de l'apport en fer et se trouve sous le contrôle de  $\sigma^S$  comme le montrent nos études de fusions transcriptionnelles *bfr::uidA* et de Northern-blot dans un mutant *rpoS*<sup>-</sup>. En effet, l'augmentation de la quantité de transcrits *bfr* et de l'activité transcriptionnelle du gène de fusion *bfr::uidA* n'ont plus lieu dans un mutant *rpoS*<sup>-</sup>. D'ailleurs, nous avons identifié par extension d'amorce un promoteur avec une séquence -10 étendue pour le gène *bfr* caractéristique des promoteurs  $\sigma^S$ -dépendant. Dans un contexte *fur*, le gène *bfr* est moins transcrit et ceci semble dû à un retard de croissance qui réduit l'accumulation de  $\sigma^S$ . En effet, le mutant *fur* croît plus lentement que la souche sauvage et atteint des densités cellulaires finales inférieures à celles de la souche sauvage. On ne peut cependant pas exclure que la protéine Fur puisse aussi contrôler indirectement la transcription du gène *rpoS* car aucune boîte Fur n'a été identifiée dans la région promotrice de l'opéron *nlpD-rpoS*, ou éventuellement la stabilité de son ARN messager. Ce mécanisme ferait intervenir un effecteur de la cascade de régulation du facteur  $\sigma^S$  dont la nature est à déterminer. Le rôle de la protéine Fur reste à être précisé. Il faudra tester la stabilité de l'ARNm *rpoS* dans un contexte *fur*<sup>+</sup> et *fur*<sup>-</sup>. En effet, la stabilité du messager peut être diminuée en fonction du taux de transcription. De même chez *E. coli*, le gène de la bactéroferritine Bfr est exprimé en phase stationnaire de croissance sous le contrôle du facteur  $\sigma^S$  (Andrews, 1998 ; Lacour et al., 2004). Par ailleurs, le gène *bfr* d'*E. chrysanthemi* est induit par l'apport de fer au cours de la croissance en milieu Tris par un mécanisme indirect qui impliquerait la protéine Fur, mais à l'inverse du gène *fnA* ce mécanisme est indépendant du petit ARN RyhB. Ce mécanisme fait probablement intervenir un autre petit ARN ou une protéine régulé(e) négativement par Fur et réprimant le gène *bfr*. De même chez *V. cholerae*, le gène *bfr* et le gène *fn* ne semblent pas être régulés par RyhB (Davis et al., 2005 ; Mey et al., 2005 b).

Chez *E. coli*, le taux de transcription du gène *bfr* dépend de la concentration en fer et de la protéine Fur (Hantke, 2001 ; McHugh et al., 2003) : l'induction par le fer via Fur ferait intervenir l'ARN anti-sens RyhB d'après les travaux de Massé et Gottesman (2002). Cependant, ces résultats restent à confirmer. Des travaux récents réalisés chez *Synechocystis* PCC 6803 montrent que les gènes *bfrA* et *bfrB* sont exprimés de manière constitutive dans un mutant *pfsR* quelle que soit l'intensité de lumière alors que dans la souche sauvage ils sont induits par une lumière de forte intensité (Jantaro et al., 2006). Il semblerait que PfsR (**P**hotosynthesis, **F**e homeostasis and **s**tress-response **R**egulator) soit un régulateur transcriptionnel qui réprime les gènes *bfrA* et *bfrB* en conditions de lumière de faible intensité, contrôlant ainsi la concentration intracellulaire en fer.

Quant au gène *dps1* d'*E. chrysanthemi*, il est induit indépendamment de l'ajout de fer en phase stationnaire au cours de la croissance bactérienne en milieu L. Or, nous avons observé que la protéine Dps1 conférait la résistance au peroxyde d'hydrogène justement en phase stationnaire de croissance et pas en phase exponentielle, ce qui coïncide avec le profil d'expression du gène *dps1*. L'induction du gène *dps1* en phase stationnaire en milieu L semble dépendre du facteur de transcription  $\sigma^S$ . La quantité de transcrits *dps1* est moins importante en phase stationnaire dans un mutant *rpoS* en comparaison à la souche sauvage. De même, un mutant *fur* accumule moins de transcrits *dps1* en phase stationnaire que la souche sauvage. Les hypothèses, à savoir un retard d'accumulation de transcrits *rpoS* dans un mutant *fur* et une régulation indirecte de la transcription du gène *rpoS* par Fur, peuvent être avancées. D'ailleurs, tout comme pour le gène *bfr*, nous avons repéré en amont du gène *dps1* par extension d'amorce la présence d'un promoteur susceptible d'être contrôlé par  $\sigma^S$  avec un site -10 étendu caractéristique d'une reconnaissance par le facteur de transcription  $\sigma^S$ . Chez *E. coli*, l'expression du gène *dps* est également contrôlée positivement par  $\sigma^S$  en phase stationnaire (Altuvia et al., 1994 ; Lacour et al., 2004). Des travaux rapportent une induction du gène *dps* par le facteur de transcription IHF en phase stationnaire chez *E. coli* (Altuvia et al., 1994, Ohniwa et al., 2006). Par ailleurs, nous avons observé qu'en milieu Tris, le gène *dps1* d'*E. chrysanthemi* est induit par l'apport de fer sans doute de manière Fur-dépendante. Or curieusement, nous avons constaté que le niveau d'expression du gène *dps1* est plus important dans le mutant *fur* que dans la souche sauvage.



Des expériences de marquage au Fe<sup>59</sup> réalisées par Dominique Expert appuient ces observations : en effet dans le mutant *fur*, il y a beaucoup plus de protéine Dps1 chargée en fer que dans la souche sauvage. La dé-répression du gène *dps1* est probablement une conséquence indirecte de l'inactivation du gène *fur*. En effet, l'augmentation de la concentration de fer intracellulaire dans le mutant *fur* pourrait être impliquée dans l'induction du gène *dps1*. En effet, dans le mutant *fur*, les systèmes de transport du fer via l'achromobactine et la chrysobactine sont dé-réprimés et le fer s'accumule alors dans la bactérie. Ce stress pourrait activer un ou plusieurs régulateurs qui induisent le gène *dps1*. On peut penser à des effecteurs de la réponse au stress oxydant tels que PerR ou OxyR qui appartiennent à la famille LysR intervenant au niveau transcriptionnel. Une augmentation de la concentration intracellulaire en fer réactif peut exacerber le stress oxydant, c'est pourquoi une induction de l'expression de la protéine Dps1 semble vraisemblable d'autant plus que nous avons évoqué le rôle de cette ferritine dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Nous avons tenté en vain de faire une fusion transcriptionnelle *uidA* dans le gène *dps1* avec deux cassettes différentes. Il faudrait opter pour un autre type de fusion.

Pour vérifier notre hypothèse et attribuer à Fur l'induction par le fer, il faudra étudier l'expression du gène *dps1* dans un double mutant *fur tonB* pour lequel les systèmes de transport du fer à haute affinité sont abolis. Dans la littérature, le gène *dps* est décrit comme induit en réponse au stress oxydant par l'intermédiaire de différents facteurs de transcription (Morikawa et al., 2006). L'un d'eux est OxyR qui est présent chez les protéobactéries  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  comme *E. coli*. Un gène homologue au gène *oxyR* d'*E. coli* est présent dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 (ABF 20420) dont le produit présente plus de 85% d'identité de séquence avec la protéine OxyR d'*E. coli*. D'ailleurs les cystéines en positions 199 et 208 impliquées dans l'activation de la protéine OxyR d'*E. coli* sont conservées chez la protéine d'*E. chrysanthemi* (annexe 7). Cependant aucun gène homologue au gène *oxyS* n'a été mis en évidence. Dans un premier temps, nous devons vérifier la présence de la séquence consensus de fixation de OxyR dans la région promotrice du gène *dps*. Un autre facteur de transcription communément décrit est PerR qui est présent chez les protéobactéries  $\alpha$ , les firmicutes, certaines cyanobactéries, bactéries hyperthermophiles.... Un gène peu homologue au gène *perR* de *B. subtilis* a été identifié dans le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 (ABF15124). La séquence déduite de la protéine PerR d'*E. chrysanthemi* présente seulement 30 et 15 % d'identité avec celles d'*E. coli* et de *B. subtilis* respectivement (annexes 8 et 9).

Contrairement à la protéine PerR de *B. subtilis*, celle d'*E. chrysanthemi* 3937 possède le motif hélice-tour-hélice de la famille de régulateurs LysR et une extension à l'extrémité C-terminale d'environ 150 acides aminés. Elle ne présente pas les caractéristiques des régulateurs de la famille Fur et les résidus histidine impliqués dans la coordination du fer. On peut supposer que la protéine Dps1 joue un rôle dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (sensibilité du mutant *dps1 $\Omega$*  au peroxyde d'hydrogène) et en conséquence serait régulé en fonction de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il faudrait envisager de vérifier si le gène *dps1* est induit par le peroxyde d'hydrogène et d'étudier l'expression du gène *dps1* dans un mutant *oxyR* d'*E. chrysanthemi* 3937. D'ailleurs, chez *E. coli*, la transcription du gène *dps* est induite par le peroxyde d'hydrogène de manière OxyR-dépendante en phase exponentielle de croissance (Altuvia et al., 1994 ; Ohniwa et al., 2006). Chez *B. subtilis* la protéine MrgA est également induite par le peroxyde d'hydrogène, mais selon un mécanisme dépendant du répresseur transcriptionnel PerR (Fuangthong et al., 2002 ; Herbig et al., 2001).

En conclusion, nous avons étudié la régulation des ferritines au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais il paraît indispensable d'analyser la stabilité des différents messagers dans les différentes conditions étudiées. De même, nous devons s'assurer de la durée de vie des différentes ferritines par immuno-marquage. Les ferritines pourraient en effet être régulées au niveau post-translationnel par protéolyse. En effet, le turn-over des ferritines pourrait varier selon les conditions rencontrées. Nous avons pu constater que les gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1* sont régulés par le fer au cours de la croissance bactérienne mais selon des mécanismes distincts qu'il faudra à l'avenir mieux comprendre. Par ailleurs des conditions de stress peuvent influencer l'expression de ces gènes via des régulateurs spécifiques qu'il faudra également identifier.

## **V- Autres acteurs du métabolisme du fer : ferrédoxine Bfd, machinerie Suf, ...**

Nous avons constaté que le gène *bfr* est organisé en opéron avec le gène *bfd* (**Bfr** associated **ferredoxin**) chez *E. chrysanthemi* 3937 et que cette organisation est conservée dans la plupart des microorganismes. Très peu d'études se sont focalisées sur la protéine Bfd. Elle est apparentée au domaine central de la sous-unité de la protéine NifU contenant un cluster [2Fe-2S] qui participe à la formation des clusters [Fe-S] de la nitrogénase. Dans la littérature, il est proposé que ce cluster Fe-S de NifU ait une fonction redox et ne soit pas un précurseur pour la maturation de la nitrogénase. De la même manière, nous pouvons imaginer que la protéine Bfd fonctionne comme un transporteur d'électrons aboutissant à la réduction du fer

ferrique en fer ferreux et à sa libération à partir de la bactéroferritine. D'ailleurs les propriétés redox des clusters [2Fe-2S] des deux protéines NifU et Bfd sont semblables avec un faible potentiel redox (Quail et *al.*, 1996 ; Agar et *al.*, 2000). La protéine Bfd pourrait agir comme une réductase intervenant dans la libération du fer à partir de la bactéroferritine en conditions de carence en fer. Elle est justement induite chez *E. coli* par une carence en fer (Quail et *al.*, 1996). Nous pourrions envisager que la protéine Bfd module l'expression du gène *bfr*. Elle possède un centre [2Fe-2S] au même titre que des régulateurs transcriptionnels qui sont impliqués dans la réponse au stress oxydant ou la carence en fer modulant l'expression génique tels que SoxR ou OxyR. Toutefois, la protéine Bfd ne possède pas d'homologie avec de tels régulateurs. Une étude phénotypique préliminaire du mutant *bfd* révèle qu'il se comporte comme la souche sauvage lorsqu'il est cultivé en milieu riche L. Par contre, sa croissance est légèrement affectée lorsqu'il est cultivé en milieu Tris et davantage en présence de chélateurs du fer. Il n'est pas plus sensible que la souche sauvage au stress oxydant (données personnelles de Thierry Franza). Ces premiers résultats suggèrent que la ferrédoxine Bfd est impliquée dans l'adaptation à la carence en fer, mais ne confère pas de résistance au stress oxydant. Bien qu'organisés en opéron, les gènes *bfd* et *bfr* pourraient être régulés de manière différentielle par la protéine Fur d'*E. chrysanthemi*. La présence d'une boîte Fur assez bien conservée dans la phase codante du gène *bfr* suggère que Fur pourrait contrôler directement dans certaines conditions le gène *bfr*. Ainsi l'arrêt de la transcription de l'opéron *bfd-bfr* au gène *bfr* par Fur permettrait de moduler leur expression.

Pour démontrer la fixation de Fur à cette boîte, il faudrait faire dans un premier temps une expérience de retard sur gel et dans un second temps une expérience d'empreinte sur gel. Pour comprendre le rôle de la protéine Bfd dans l'homéostasie du fer, il paraît indispensable d'analyser le mutant *bfd* non polaire par spectrométrie Mössbauer. Il faudra terminer de caractériser le mutant *bfd*, notamment son pouvoir pathogène sur plante. Le peu de données de la littérature soutient l'idée que les protéine Bfd et Bfr soient partenaires et interagissent ensemble, notamment un travail de Garg et *al.* (1996) montrant par chromatographie d'affinité que les protéines Bfd et Bfr forment un complexe. Il serait intéressant de montrer clairement une éventuelle interaction entre ces deux protagonistes par une approche de double hybride ou par la technique de TAP-TAG, ce qui permettrait d'identifier d'autres partenaires.

Des cinétiques réalisées après marquage des cellules au Fe<sup>59</sup> au laboratoire par Dominique Expert montrent que dans le mutant *bfd*, la bactéroferritine Bfr se charge en fer mais ne se décharge plus au cours du temps lorsque le fer est retiré du milieu de culture (Dominique Expert, données personnelles).

En absence de Bfd, la protéine Bfr accumulerait le fer et serait donc incapable de le relarguer. Ces résultats viennent étayer l'hypothèse selon laquelle Bfd serait impliquée dans le relarguage du fer à partir de la bactérioferritine. Les mécanismes par lesquels le fer est libéré à partir des ferritines n'ont pas encore été élucidés. Néanmoins, une étape de réduction du fer en fer ferreux est nécessaire pour libérer le fer des ferritines. La nature de l'agent réducteur n'est pas connue. Dans le mutant *sufC*, la bactérioferritine accumule le fer, mais ne le décharge pas ultérieurement. Des données chez *E. coli* montrent qu'une bactérioferritine dépourvue d'hème accumule beaucoup plus de fer que la forme sauvage suggérant que l'hème est essentiel à la libération du fer de la bactérioferritine. Nous avançons l'hypothèse que l'absence d'hème modifierait le potentiel redox de la bactérioferritine et donc sa capacité à être réduite ou son taux de réduction. On peut supposer que les protéines Bfd et SufC qui est une ATPase agissent ensemble en fournissant le centre Fe-S nécessaire à une protéine impliquée dans la formation d'hème. Cette protéine serait la ferrochélatase qui catalyse l'incorporation du fer dans la protoporphyrine IX formant ainsi l'hème b justement important pour la décharge en fer de la bactérioferritine chez *E. coli* (Andrews et al., 1995). Pour confirmer l'hypothèse que l'hème est important dans la libération du fer de la bactérioferritine et que le défaut serait lié à une perturbation de la biosynthèse d'hème, il faudrait s'assurer que l'addition d'hème exogène aux mutants *bfd* et *sufC* suffit à restaurer l'aptitude de la bactérioferritine à redistribuer son stock de fer. Il serait intéressant de mutagéniser la bactérioferritine sur la méthionine en position 52 impliquée dans la fixation de l'hème et de refaire des cinétiques dans le mutant correspondant. Nous pourrions également analyser la répartition du fer dans un tel mutant par spectrométrie Mössbauer.

D'autres données montrent que dans les mutants *sufABD* marqués au  $Fe^{59}$ , Bfr ne se charge pas en fer suggérant que la machinerie Suf serait impliquée dans la formation d'une protéine comportant un centre [Fe-S] qui permet l'entrée du fer dans la bactérioferritine. Nous présumons qu'il existe des interactions entre les protéines Suf et Bfd d'une part et les protéines Bfr et Bfd d'autre part que nous pourrions mettre en évidence par double hybride ou TAP-TAG. Par ailleurs, nous savons que la machinerie Suf intervient dans la biosynthèse des centres [Fe-S] en conditions de stress oxydant et/ou de carence en fer. Elle contribuerait ainsi à abaisser la concentration intracellulaire en fer en réparant les protéines à centres [Fe-S] endommagés. Des travaux de Nachin et al. (2003) montrent que la machinerie Suf est importante au « relarguage » du fer à partir de la ferrichrysobactine sans doute en mettant en place le centre [Fe-S] de la réductase de la ferrichrysobactine non identifiée à ce jour.

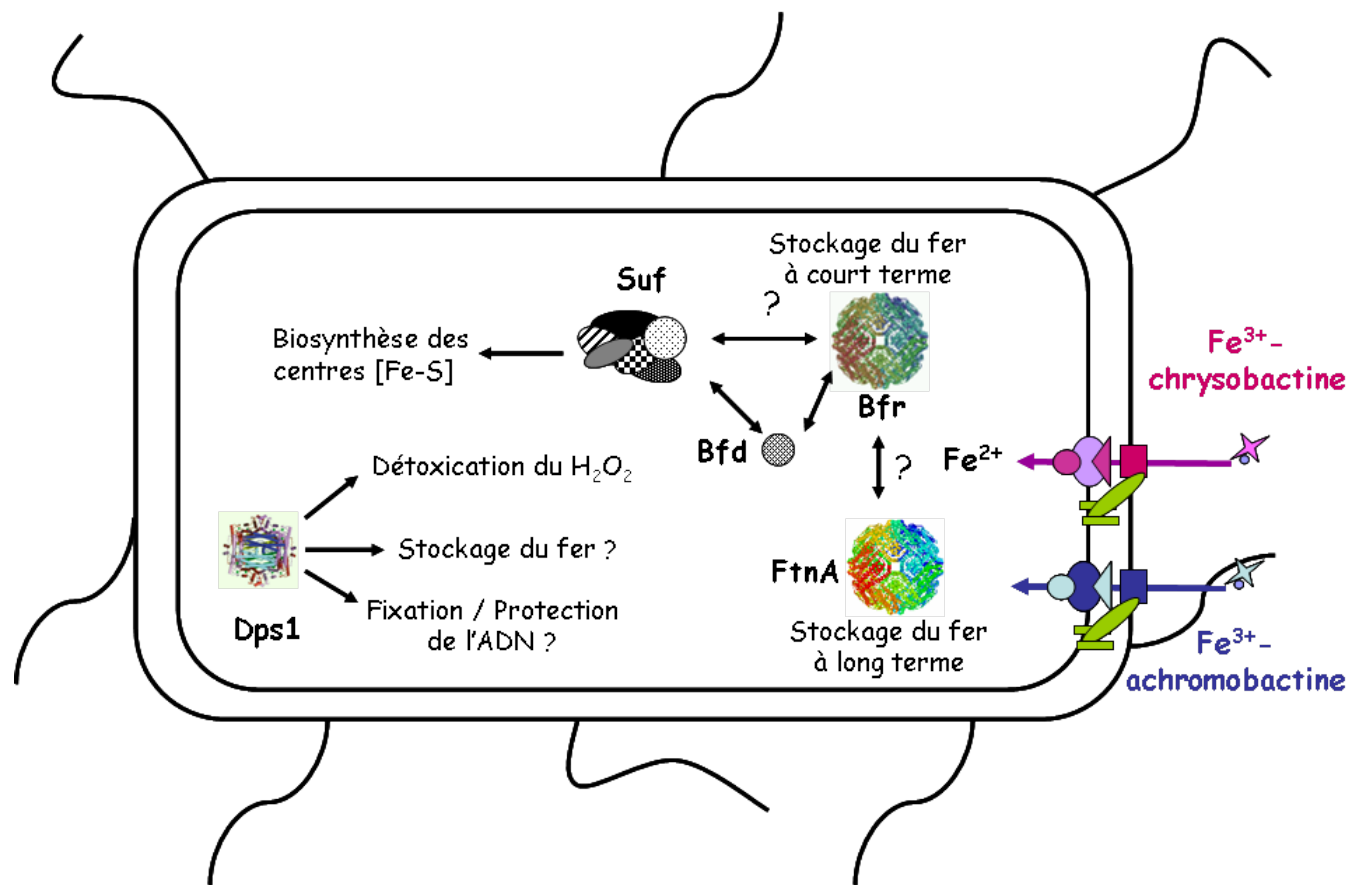


Figure 123 : Modèle hypothétique de distribution intracellulaire du fer en carence en fer chez *E. chrysanthemi* 3937.

L'ensemble de ce travail met en évidence la complexité du système qui permet d'assurer l'homéostasie du fer chez *E. chrysanthemi* 3937, non seulement par le nombre des ferritines (quatre), mais aussi par leurs fonctions physiologiques distinctes. Nous proposons un modèle de distribution intracellulaire du fer en carence en fer chez *E. chrysanthemi* 3937 sur la figure 123. Les ferritines ne se cantonnent pas seulement à séquestrer le fer, mais interviennent dans la réponse au stress oxydant. Nos données viennent étayer notre sentiment quant à la fonction de la bactérioferritine qui constituerait un pool de fer labile destiné aux protéines à fer telles que des enzymes à centre [Fe-S],... Elle distribuerait le fer aux protéines qui le requièrent et serait en quelque sorte une navette. Cela permettrait d'éviter tout gaspillage du fer qui serait distribué à bon escient. En ce qui concerne la ferritine FtnA, elle serait responsable du stockage du fer à long terme à proprement dit en engrangeant des réserves lorsque les conditions le permettent. La ferritine FtnA serait la source de fer privilégiée lorsque le fer du milieu extracellulaire vient à s'épuiser. La protéine Dps1, quant à elle, aurait une capacité de stockage du fer limitée (cela reste à confirmer par spectrométrie Mössbauer) et interviendrait en réponse au stress oxydant et en phase stationnaire notamment en détoxiquant le peroxyde d'hydrogène.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## A

---

**ABDUL-TEHRANI H., HUDSON A.J., CHANG Y.S., TIMMS A.R., HAWKINS C., WILLIAMS J.M., HARRISON P.M., GUEST J.R. et ANDREWS S.C.** Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, p. 1415-1428.

**AGAR J.N., YUVANIYAMA P., JACK R.F., CASH V.L., SMITH A.D., DEAN D.R. et JOHNSON M.K.** Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, vol. 5, n°2, p. 167-177.

**AITKEN-ROGERS H., SINGLETON C., LEWIN A., TAYLOR-GEE A., MOORE G.R. and LE BRUN N.E.** Effect of phosphate on bacterioferritin-catalysed iron(II) oxidation. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, vol. 9, n°2, p. 161-170.

**ALMIRON M., LINK A.J. et FURLONG D.** A novel DNA binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 1992, vol. 6, p. 2646-2654.

**ALTHAUS E. W., OUTTEN C. E., OLSON K. E., CAO H., O'HALLORAN T. V.** The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, n° 20, p. 6559-6569.

**ALTUVIA S., ALMIRON M., HUISMAN G., KOLTER R. et STORZ G.** The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 1994, vol. 13, 265-272.

**ALTUVIA S., WEINSTEIN-FISCHER D., ZHANG A., POSTOW L, et STORZ G.** A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell.*, 1997, vol. 90, n° 1, p. 43-53.

**ALTUVIA S, ZHANG A, ARGAMAN L, TIWARI A, et STORZ G.** The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J.*, 1998 vol.17, n°20, p. 6069-6075

**ANDREWS S.C., HARRISON P.M. and GUEST J.R.** Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (*bfr*) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.*, 1989, vol. 171, n°7, p. 3940-3947.

**ANDREWS S.C., SMITH J.M., YEWDALL S.J., GUEST J.R., HARRISON P.M.** Bacterioferritins and ferritins are distantly related in evolution. Conservation of ferroxidase-centre residues. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 293, n°1-2, p.164-168

**ANDREWS S.C., LE BRUN N.E., BARYNIN V., THOMSON A.J., MOORE G.R., GUEST J.R. et HARRISON P.M.** Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme free variants. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 23268-23274

**ANDREWS S.C.** Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Phys.*, 1998, vol. 40, p. 281-351.

**ANDREWS S.C., ROBINSON A.K. et RODRIGUEZ-QUINONES F.** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 27, n° 2-3, p. 215-237.

**ARGAMAN L. et ALTUVIA S.** FhlA repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 300, n°5, p.1101-1112



**ARNOW L.E.** Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J. Biol. Chem.*, 1937, vol. 118, p. 531-537.

**AYMERIC J.L., GUISEPPI A., PASCAL M.C. et CHIPPAUX M.** Mapping and regulation of the *cel* genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Gen. Genet.*, 1988, vol. 211, n°1, p. 95-101.

## **B**

---

**BAAGHIL S., LEWIN A., MOORE G.R. and LE BRUN N.E.** Core formation in *Escherichia coli* bacterioferritin requires a functional ferroxidase center. *Biochemistry*, 2003, vol. 42, n°47, p. 14047-14056.

**BAGG A. et NEILANDS J.B.** Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, p. 5471-5477.

**BAICHOON N. et HELMANN J.D.** Recognition of DNA by Fur : a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.*, 2002, vol. 184, n°21, p. 5826-5832.

**BARDONNET N. et BLANCO C.** *uidA*-antibiotic resistance cassettes for insertion mutagenesis, gene fusions and genetic constructions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, vol. 93, p. 243-248.

**BARNARD A.M. et SALMOND G.P.** Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal Bioanal Chem.*, 2007, vol. 387, n°2, p. 415-423.

**BARRAS F., LOISEAU L. et PY B.** How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins. *Adv Microb Physiol.*, 2005, vol. 50, p. 41-101.

**BARTH M., MARSCHALL C., MUFFLER A., FISCHER D. et HENGGE-ARONIS R.** A role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of  $\sigma^S$  and many  $\sigma^S$ -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1995. Vol. 177, p. 3455-3464.

**BAUER D. W., WEI Z. M., BEER S. V., et COLLMER A.** *Erwinia chrysanthemi* HarpinEch: An Elicitor of the Hypersensitive Response that Contributes to Soft-Rot Pathogenesis. *MPMI*, 1995, vol. 8, n° 4, p. 484-491.

**BAUMINGER E. R., COHEN S. G., DICKSON D. P., LEVY A., OFER S. et YARIV J.** Mossbauer spectroscopy of *Escherichia coli* and its iron-storage protein. *Biochim Biophys Acta.* 1980, vol. 623, n°2, p. 237-242.

**BEAULIEU C., et VAN GIJSEGEM F.** Identification of Plant-Inducible Genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bact.*, 1990, p. 1569-1575

**BEAULIEU C., BOCCARA M., et VAN GIJSEGEM F.** Pathogenic behaviour of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* , 1993, vol. 6, p.197-202.

**BERESWILL S., GREINER S., VAN VLIET A.H., WAIDNER B., FASSBINDER F., SCHILTZ E., KUSTERS J.G. et KIST M.** Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J. Bact.*, 2000, vol. 182, n°21, p. 5948-5953.

**BJARNASON J., SOUTHWARD C.M. and SURETTE M.G.** Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* by high-throughput screening of a random promoter library. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, n°16, p. 4973-4982.

**BIJLSMA J.J.E., WAIDNER B., VAN VLIET A.H.M. et 7 other authors.** The Ferric Uptake Regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori* is involved in acid resistance. *Infect Immun.* 2002, vol. 70, p. 606-611.

**BIVILLE F., CWERMAN H., LETOFFE S., ROSSI M. S., DROUET V., GHIGO J. M. et WANDERSMAN C.** Haemophore-mediated signalling in *Serratia marcescens* : a new mode of regulation for an extra cytoplasmic function (ECF) sigma factor involved in haem acquisition. *Mol Microbiol.* 2004, vol. 53, n° 4, p. 1267-1277.

**BOCCARA M., AYMERIC J-L et CAMUS C.** Role of Endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 Virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bact.* 1994, p.1524-1526

**BOCCARA M., MILLS C.E., ZEIER J., C. ANZI C., LAMB C., POOLE R.K. et DELLEDONNE M.** Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *The Plant Journal*, 2005, vol. 43, n° 2, p. 226

**BOONJAKUAKUL J.K., CANFIELD D.R. et SOLNICK J.V.** Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression in vitro and in the Rhesus macaque. *Infect. Immun.* 2005, vol. 73, n°8, p. 4895-904.

**BOU-ABDALLAH F., LEWIN A.C., LE BRUN N. E., MOORE G.R. et CHASTEEN N.D.** Iron detoxification properties of *Escherichia coli* bacterioferritin. Attenuation of oxyradical chemistry. *J. Biol. Chem.* 2002, vol. 277, p. 37064-37069.

**BOZZI M., MIGNOGNA G., STEFANINI S., BARRA D., LONGHI C., VALENTI P. and CHIANCONE E.** A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, n°6, p. 3259-3265.

**BRAUN V. et KILLMANN H.** Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci.* 1999, vol. 24, n° 3, p. 104-109.

**BRAUN V., MAHREN S. et OGIERMAN M.** Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol.* 2003, vol. 6, n° 2, p. 173-180.

**BRAUN V., MAHREN S. et SAUTER A.** Gene regulation by transmembrane signaling. *Biometals*, 2006, vol. 19, n° 2, p. 103-113.

**BROWN L. et ELLIOTT T.** Mutations that increase expression of the *rpoS* gene and decrease its dependence on *hfq* function in *Salmonella typhimurium*. *J. Bact.* 1997, vol. 179, n°3, p. 656-6562

**BUCHANAN S.K., SMITH B.S., VENKATRAMANI L., XIA D., ESSER L., PALNITKAR M., CHAKRABORTY R., VAN DER HELM D. et DEISENHOFER J.** Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 1999, vol. 6, p. 56-63.

**BURKHOLDER W.H., MACFADDEN L.H. et DIMOCK A.H.** A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology.* 1953, vol. 43, p. 522-525.

## **C**

---

**CALDERWOOD S.B. et MEKALANOS J.J.** Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bact.*, 1987, vol. 169, p. 4759-4764.

**CARRONDO M.A.** Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *EMBO J.* 2003, vol. 22, n°9, p. 1959-1968.

**CECI P., ILARI A., FALVO E. et CHIANCONE E.** The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA, but protects it towards oxidative cleavage. X-ray crystal structure, iron binding and hydroxyl-radical scavenging properties. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 20319-20326.

**CHAPON V., JZEK M., EL HASSOUNI M., PY B., JUY M. et BARRAS F.** Type II Protein Secretion in Gram-negative Pathogenic Bacteria: The Study of the Structure/Secretion Relationships of the Cellulase Cel5 (formerly EGZ) from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* 2001, vol. 310, p. 1055-1066.

**CHASTEEN N.D.** Ferritin. Uptake, storage, and release of iron. *Met. Ions Biol. Syst.*, 1998, vol. 35, p. 479-514.

**CHASTEEN N.D. et HARRISON P.M.** Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* 1999, vol. 126, p. 182-194.

**CHEN L., JAMES L.P., HELMANN J.D.** Metalloregulation in *Bacillus subtilis* : isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. *J. Bact.*, 1993, vol. 175, n°17, p. 5428-5437.

**CHEN L. et HELMANN J.D.** *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps (PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 18, n°2, p. 295-300.

**CHEN C.Y. et MORSE S.A.** *Neisseria gonorrhoeae* bacterioferritin : structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress. *Microbiology*, 1999, vol. 145, n° 10, p. 2967-2975.

**CHOI S.H., BAUMLER D.J. et KASPAR C.W.** Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, p. 3911-3916

**CLARKE, T.E., KU, S.Y., DOUGAN, D.R., VOGEL, H.J. et TARI, L.W.** The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. *Nat. Struct. Biol.* 2000, vol. 7, p. 287-291.

**CLARKE T.E., BRAUN V., WINKELMANN G., TARI L.W. et VOGEL H.J.** X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 13966-13972.

**COBESSI D., HUANG L.S., BAN M., PON N.G., DALDAL F. et BERRY E.A.** The 2.6 Å resolution structure of *Rhodobacter capsulatus* bacterioferritin with metal-free dinuclear site and heme iron in a crystallographic 'special position'. *Acta Crystallogr.*, 2002, vol. 58, p. 29-38.

**COBESSI D, CELIA H, FOLSCHWEILLER N, SCHALK IJ, ABDALLAH MA, PATTUS F.** The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 347, n°1, p. 121-134.

**CONDEMINE G., CASTILLO A., PASSERI F. et ENARD C.** The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1999, vol. 12, p. 45-52.

**COOKSLEY C., JENKS P.J., GREEN A., COCKAYNE A., LOGAN R.P. et HARDIE K.R.** NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 52, p. 461-469.

**CROSA J.H. et WALSH C.T.** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002, vol. 66, n°2, p. 223-249.

**CURTIS A.R., FEY C., MORRIS C.M., BINDOFF L.A., INCE P.G., CHINNERY P.F., COULTHARD A., JACKSON M.J., JACKSON A.P., MCHALE D.P., HAY D., BARKER W.A., MARKHAM A.F., BATES D., CURTIS A. and BURN J.** Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat. Genet.*, 2001, vol. 28, n°4, p. 350-354.

**CWERMAN H., WANDERSMAN C. et BIVILLE F.** Heme and a five-amino-acid hemophore region form the bipartite stimulus triggering the *has* signaling cascade. *J Bacteriol.*, 2006, vol. 188, n° 9, p. 3357-3364.

## D

---

**DAHLER G.S., BARRAS F., et KEEN N.T.** Cloning of Genes Encoding Extracellular Metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bact.* 1990, p. 5803-5815

**DASHPER S.G., BUTLER C.A., LISSEL J.P., PAOLINI R.A., HOFFMANN B., VEITH P.D., O'BRIEN-SIMPSON N.M., SNELGROVE S.L., TSIROS J.T. et REYNOLDS E. C.** A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation. *J Biol Chem.*, 2005, vol. 280, n° 30, p. 28095-28102.

**DAUTANT A, MEYER J.B, YARIV J., PRECIGOUX G., SWEET R.M., KALB A.J., FROLOW F.** Structure of a monoclinic crystal form of cytochrome b1 (Bacterioferritin) from *E. coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 1998, vol.54, n° 1, p.16-24.

**DAVIS B.M., QUINONES M., PRATT J., DING Y. et WALDOR M.K.** Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, n°12, p. 4005-4014.

**DELANY I., SPOHN G., RAPPUOLI R. et SCARLATO V.** The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 42, p. 1297-1309.

**DELANY I., RAPPUOLI R. et SCARLATO V.** Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.*, 2004, vol. 52, n°4, p. 1081-1090.

**DE LORENZO V., WEE S., HERRERO M. et NEILANDS J.B.** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bact.*, 1987, vol. 169, n° 6, p. 2624-2630.

**DE LORENZO V., GIOVANNINI F., HERRERO M. et NEILANDS J.B.** Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 203, p. 875.

**DENOEL P.A., CRAWFORD R.M., ZYGMUNT M.S., TIBOR A., WEYNANTS V.E., GODFROID F., HOOVER D.L. et LETESSON J.J.** Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* , 1997, vol. 65, p. 4337-4340.

**DING H. et DEMPLE B.** *In vivo* kinetics of a redox-regulated transcriptional switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1997, vol. 94, 16, n° 8445-8449.

**DING H et DEMPLE B.** Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000, vol. 97, n°10, p. 5146-5150

**DING H. et CLARK R.J.** Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem. J.*, 2004, vol. 379, p. 433-440.

**DING H., CLARK R.J. et DING B.** IscA mediates iron delivery for assembly of Iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, p. 37499-37504.

**DOIG P., AUSTIN J.W., TRUST T.J.** The *Helicobacter pylori* 19.6-kilodalton protein is an iron-containing protein resembling ferritin. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, n° 2, p.557-560.

**DOUGLAS T. et RIPOLI D.R.** Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin. *Protein Sci.*, 1998, vol. 7, p.1083-1091.

**DUBRAC S. et TOUATI D.** Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli* : functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, p. 3802-3808.

**DUNDON W.G., POLENGHI A., DEL GUIDICE G., RAPPUOLI R. et MONTECUCCO C.** Neutrophil-activating protein (HP-NAP) versus ferritin (Pfr): comparison of synthesis in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett.*, 2001, vol. 199, n°1, p. 143-149.

**DUSSURGET O., DUMAS E., ARCHAMBAUD C., CHAFSEY I., CHAMBON C., HEBRAUD M., COSSART P.** *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 250, n°2, p. 253-261.

## **E**

---

**ENARD C., DIOLEZ A., et EXPERT D.** Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J Bacteriol* , 1988, vol. 170, p. 2419-2426.

**ENARD C. et EXPERT D.** Characterization of a *tonB* mutation in *Erwinia chrysanthemi* 3937: TonB(Ech) is a member of the enterobacterial TonB family. *Microbiology*, 2000, vol. 146, p. 2051-2058.

**ERNST J.F., BENNETT R.L. et ROTHFIELD L.I.** Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1978, vol.135, p. 928.

**ESCOLAR L., PEREZ-MARTIN J. et DE LORENZO V.** Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 283, p. 537-547.

**ESCOLAR L., PEREZ-MARTIN J. et DE LORENZO V.** Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.*, 1999, vol.181, p. 6223-6229.

**EXPERT D., ENARD C., et MASCLAUX C.** The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.*, 1996, vol. 6, p. 232-237.

**EXPERT D., RAUSCHER L. et FRANZA T.** *Erwinia*, a plant pathogen. In J.-H. Crosa, A. R. Mey and S. M. Payne (eds.), *Iron transport in Bacteria*, ASM Press, Washington D.C., USA, 2004, p. 402-412.

## **F**

---

**FAVEY S., LABESSE G., VOUILLE V. et BOCCARA V.** Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology*, 1995, vol.141, p. 863-871.

**FELLAY R., FREY J. et KRISCH H.** Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene*, 1987, vol. 52, n°2-3, p. 147-154.

**FERGUSON A.D., HOFMANN E., COULTON J.W., DIEDERICHS K. et WELTE W.** Siderophore-mediated iron transport : Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, 1998, vol. 282, p. 2215-2220.

**FERGUSON A.D., CHAKRABORTY R., SMITH B.S., ESSER L., VAN DER HELM D. et DEISENHOFER J.** Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science*, 2002, vol. 295, 1715-1719.

**FERREIRA C, BUCCHINI D, MARTIN ME, LEVI S, AROSIO P, GRANDCHAMP B, BEAUMONT C.** Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, n°5, p. 3021-3024.

**FOSTER J.W. et HALL H.K.** Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bact.* 1992, vol. 174, n° 13, p. 4317-4323.

**FRANZA T., ENARD C., VAN GIJSEGEM F. et EXPERT D.** Genetic analysis of the *Erwinia chrysanthemi* 3937 chrysobactin iron transport system: Characterisation of a gene cluster involved in uptake and biosynthetic pathway. *Mol. Microbiol.* 1991 a, vol. 5, n° 1319-1329.

**FRANZA T. et EXPERT D.** The virulence-associated chrysobactin iron uptake system of *Erwinia chrysanthemi* 3937 involves an operon encoding transport and biosynthetic functions. *J. Bacteriol.* 1991 b, vol. 173, p.6874-6881.

**FRANZA T., SAUVAGE C. et EXPERT D.** Iron Regulation and Pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937 : Role of the Fur Repressor Protein. *MPMI*, 1999, vol. 12, n°2, p. 119-128.

**FRANZA T., MAHÉ B. et EXPERT D.** *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology*. 2005, vol. 55, n° 1, p. 261-275

**FRANZE DE FERNANDEZ M.T., EOYANG L. et AUGUST J.T.** Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q $\beta$ -RNA. *Nature*, 1968, vol. 219, p. 588-590.

**FRAZIER B.A., PFEIFER J.D., RUSSELL D.G., FALK P., OLSEN A.N., HAMMAR M., WESTBLOM T.U., NORMARK S.J.** Paracrystalline inclusions of a novel ferritin containing non heme iron, produced by the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*: evidence for a third class of ferritins. *J Bact.*, 1993, vol.175, n°4, p.966-972

**FRAZZON J. et DEAN D.R.** Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001, vol. 98, n° 26, p. 14895-14900.

**FRIDOVICH I.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, vol.64, p. 97-112.

**FROLOW F., KALBA J. et YARIV J.** Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nat. Struct. Biol.*, 1994, vol. 1, p. 453-460.

**FUANGTHONG M., HERBIG A.F., BSAT N. et HELMANN J.D.** Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bact.*, 2002, vol. 184, n° 12, p. 3276-3286.

**FUANGTHONG M. et HELMANN J.D.** Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 2003, vol. 185, n° 21, p. 6348-6357.

## G

---

**GALLOIS B., D'ESTAINOT B.L., MICHAUX M.-A., DAUTANT A., GRANIER T., PRECIGOUX G., SORUCO J.-A., ROLET F., CHAVAS-ALBA O., HERBAS A. et al.** X-ray structure of recombinant horse L-chain apoferritin at 2.0 Å resolution: Implications for stability and function. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1997, vol. 2, p. 360-367.

**GARG R.P., VARGO C.J., CUI X.Y. et KURTZ D.M.** A [2Fe-2S] protein encoded by an open reading frame upstream of the *Escherichia coli* bacterioferritin gene. *Biochemistry*, 1996, vol.35, p. 6297-6301.

**GARIBALDI J.A. et NEILANDS J.B.** Formation of iron-binding compounds by micro-organisms. *Nature*, 1956, vol.177, p. 526.

**GAUDU P., DUBRAC S. et TOUATI D.** Activation of SoxR by overproduction of desulfoferrodoxin: multiple ways to induce the *soxRS* regulon. *J. Bact.* 2000, vol.182, n°6, p.1761-1763

**GEISSMANN T.A. et TOUATI D:** Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J.*, 2004, vol.23, p. 396-405.

**GENTRY D.R., HERNANDEZ V.J., Nguyen L.H., JENSEN D.B., et CASHEL M.** Synthesis of the stationary phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bact.*, 1993, vol. 175, p. 7982-7989.

**GLASNER J. D., LISS P., PLUNKETT G. 3rd, DARLING A., PRASAD T., RUSCH M., BYRNES A., GILSON M., BIEHL B., BLATTNER F. R., et PERNA N. T.** ASAP, a systematic annotation package for community analysis of genomes. *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31, n°1, p. 147-151.

**GONZALEZ-FLECHA B. et DEMPLE B.** Transcriptional regulation of the *Escherichia coli oxyR* gene as a function of cell growth. *J Bact.*, 1997, vol. 179, n° 19, p. 6181-6186.

**GONZALEZ DE PEREDO A., SAINT-PIERRE C., LATOUR J.M., MICHAUD-SORET I. et FOREST E.** Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding, first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 310, n° 1, p. 83-91.

**GRANT R.A., FILMAN D.J., FINKEL S.E., KOLTER R. et HOGLE J.M.** The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol.*, 1998, vol. 5, p. 294-303.

**GRASS G., OTTO M., FRICKE B., HANEY C.J., RENSING C., NIES D.H., MUNKELT D.** FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch. Microbiol.*, 2005, vol. 183, n° 1, p. 9-18.

**GRANIER T, COMBERTON G, GALLOIS B, D'ESTAINOT BL, DAUTANT A, CRICHTON RR, PRECIGOUX G.** Evidence of new cadmium binding sites in recombinant horse L-chain ferritin by anomalous Fourier difference map calculation. *Proteins*, 1998, vol. 31, n°4, p. 477-485

**GRENIER A.M., DUPORT G., PAGÈS S., CONDEMINE G. et RAHBÉ Y.** The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. *Appl Environ Microbiol.* 2006, vol. 72, n°3, p. 1956-1965.

**GUISEPPI A., AYMERIC J.L., CAMI B., BARRAS F. et CREUZET N.** Sequence analysis of the cellulase-encoding *celY* gene of *Erwinia chrysanthemi*: a possible case of interspecies gene transfer. *Gene*. 1991 Sep 30;106(1):109-114.

**GUPTA S. et CHATTERJI D.** Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* Dps. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 278, p. 5235-5241.

## H

---

**HALSEY T.A., VAZQUEZ-TORRES A., GRAVDAHL D.J., FANG F.C. and LIBBY S.J.** The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* oxidative stress resistance and virulence. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, n°2, p. 1155-1158.

**HANTKE K.** Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet*, 1981, vol. 182, p. 288.

**HANTKE K.** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12 : *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, vol. 210, p. 135-139.

**HARRISON P.M. et AROSIO P.** The ferritins : molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.*, 1996, vol. 1275, n°3, p. 161-203.

**HASSOUNI M.E., CHAMBOST J.P., EXPERT D., VAN GIJSEGEM F. et BARRAS F.** The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, vol. 96, p. 887-892.

**HELMANN J.D.** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.*, 2002, vol. 46, p. 47-110.

**HEMPSTEAD PD, YEWDALL SJ, FERNIE AR, LAWSON DM, ARTYMIUK PJ, RICE DW, FORD GC, HARRISON PM.** Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 268, n°2, p. 424-448.



**HENGGE-ARONIS R.** Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 4, p. 341-346.

**HERBIG A.F. et HELMANN J.D.** Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 41, p. 849-859.

**HEUMANN W., Young D. et GOTTLICH C.** Leucoindigoidine formation by an *Arthrobacter* species and its oxidation to indigoidine by other micro-organisms. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)*, 1968, vol. 156, n° 2, p. 429-431.

**HIDALGO E., DING H. et DEMPLE B.** Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem Sci.*, 1997a, vol. 22, n°6, p. 207-210.

**HIDALGO E., DING H. et DEMPLE B.** Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell*, 1997b, vol. 88, n°1, p. 121-129.

**HIRSCH M. et ELLIOTT T.** Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J Bact.*, 2002, vol. 184, p. 5077-5087.

**HONG Y., WANG G. et MAIER R.J.** *Helicobacter hepaticus* Dps protein plays an important role in protecting DNA from oxidative damage. *Free Radic Res.*, 2006, vol. 40, n°6, p. 597-605.

**HORSBURGH M.J., CLEMENTS M.O., CROSSLEY H., INGHAM E. et FOSTER S.J.** PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, p. 3744-3754

**HUDSON A.J., ANDREWS S.C., HAWKINS C., WILLIAMS J.M., IZUHARA M, MELDRUM F.C., MANN S, HARRISON P.M., GUEST J.R.** Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin. *Eur J Biochem.*, 1993, vol. 218, n°3 p.985-995.

**HUGOUIVIEUX-COTTE-PATTAT N., CONDEMINÉ G., NASSER W. et REVERCHON S.** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, vol. 50, p. 213-257.

## **I**

---

**IMBERT M., et BLONDEAU R.** On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol.*, 1998, vol. 37, n° 1, p. 64-66.

**IMLAY J.A.** Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2003, vol. 57, p. 395-418

**ILARI A., STEFANINI S., CHIANCONE E. et TSERNOGLOU D.** The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. *Nat. Struct. Biol.*, 2000, vol. 7, p. 38-43.

**ILARI A., LATELLA M.C., CECI P., RIBACCHI F., SU M., GIANGIACOMO L., STEFANINI S., CHASTEEN N.D. et CHIANCONE E.** The unusual intersubunit ferroxidase center of *Listeria innocua* Dps is required for hydrogen peroxide detoxification but not for iron uptake. A study with site-specific mutants. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, n°15, p. 5579-5587.

**ISHIHAMA A.** Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol.*, 2000, vol. 54, p. 499-518.

**ISHIKAWA T., MIZUNOE Y., KAWABATA S., TAKADE A., HARADA M., WAI S.N. et YOSHIDA A.S.** The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 2003, vol. 185, p. 1010-1017.

**IZADI-PRUNEYRE N., HUCHE F., LUKAT-RODGERS G.S., LECROISEY A., GILLI R., RODGERS K.R., WANDERSMAN C. et DELEPELAIRE P.** The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, n° 35, p. 25541-25550.

**IZUHARA M., TAKAMUNE K. et TAKATA R.** Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* K12 gene which encodes a polypeptide having similarity to the human ferritin H subunit. *Mol Gen Genet.*, 1991, vol. 225, n° 3, p.510-513.

## J

---

**JACQUAMET L., ABERDAM D., ADRAIT A., HAZEMANN J.L., LATOUR J.M. et MICHAUD-SORET I.** X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, p. 2564-2571.

**JACQUES J.F., JANG S., PREVOST K., DESNOYERS G., DESMARAIS M., IMLAY J., MASSE E.** RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 2006, vol. 62, n° 4, p. 1181-1190.

**JANTARO S., ALI Q., LONE S. et HE Q.** Suppression of the lethality of high light to a quadruple HLI mutant by the inactivation of the regulatory protein PfsR in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem.*, 2006, vol. 281, n° 41, p. 30865-30874.

**JEONG K.C., BAUMLER D.J., KASPAR C.W.** *dps* expression in *Escherichia coli* O157:H7 requires an extended -10 region and is affected by the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta*. 2006, vol.1759, n° 1-2, p.51-59.

**JIN Q., HU W., BROWN I., MCGHEE G., HART P., JONES A.L. et HE S.Y.** Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, 2001, vol. 40, n° 5, p. 1129.

**JONES T., SPENCER R. and WALSH C.** Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, n°19, p. 4011-4017.

## K

---

**KAMMLER M., SCHON C. et HANTKE K.** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, p. 6212-6219.

**KEREN N., AURORA R. et PAKRASI H.B.** Critical roles of bacterioferritins in iron storage and proliferation of *cyanobacteria*. *Plant Physiol.*, 2004, vol. 135, n° 3, p. 1666-1673.

**KIM Y.C., MILLER C.D. and ANDERSON A.J.** Identification of adjacent genes encoding the major catalase and a bacterioferritin from the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas putida*. *Gene*, 1997, vol. 199, p. 1-2, p. 219-224.

**KING K.Y., HORENSTEIN J.A. et CAPARON M.G.** Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, n° 19, p. 5290-5299.

**KUHN R., STARR M.P., KUHN D.A., BAUER H., et KNACKMUSS. H.-J.** Indigoidine and other bacterial pigments related to 3,3'-bipyridyl. *Arch. Mikrobiol.*, 1965, vol. 51, p. 71-84.

## L

---

**LACOUR S. et LANDINI P.** SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli* : function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bact.*, 2004, vol. 186, n° 21, p. 7186-7195.

**LANGE R., FISCHER D. et HENGGE-ARONIS R.** Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 1995, vol. 177, n° 16, p. 4676-4680.

**LARSEN R.A., FOSTER-HARTNETT D., MCINTOSH M.A. et POSTLE K.** Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for *in vivo* physical interactions. *J. Bact.* 1997, vol. 179, n°10, p. 3213-3221.

**LAVRRAR J.L. et MC INTOSH M.A.** Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol.*, 2003, vol. 185, n° 7, p. 2194-2202.

**LAYER G., OLLAGNIER-DE CHOUDENS S., SANAKIS Y. et FONTECAVE M.** Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CyaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, n° 24, p. 16256-16263.

**LE BRUN N.E., WILSON M.T., ANDREWS S.C., GUEST J.R., HARRISON P.M., THOMSON A.J. and MOORE G.R.** Kinetic and structural characterization of an intermediate in the biomineralization of bacterioferritin. *FEBS Lett.*, 1993, vol. 333, n°1-2, p. 197-202.

**LEE J.W. et HELMANN J.D.** The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 2006, vol. 440, n° 7082, p. 363-367.

**LETOFFE S., NATO F., GOLDBERG M.E. et WANDERSMAN C.** Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol.*, 1999, vol. 33, n° 3, p. 546-555.

**LEVI S., LUZZAGO A., FRANCESCHINELLI F., SANTAMBROGIO P., CESARENI G. and AROSIO P.** Mutational analysis of the channel and loop sequences of human ferritin H-chain. *Biochem. J.*, 1989, vol. 264, n°2, p. 381-388.

**LIU X. et THEIL E.C.** Ferritin reactions: direct identification of the site for the diferric peroxide reaction intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2004, vol. 101, n°23, p. 8557-8562.

**LOEWEN P.C.** Isolation of catalase-deficient *Escherichia coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J Bacteriol.*, 1984, vol. 157, n° 2, p. 622-626.

**LOEWEN P.C., SWITALA J., TRIGGS-RAINE B.L.** Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985, vol. 243, n°1, p. 144-149.

**LOEWEN P.C., HU B., STRUTINSKY J. et SPARLING R.** Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 1998, vol. 44, p. 707-717.

**LOISEAU L., OLLAGNIER-DE CHOUDENS S., NACHIN L., FONTECAVE M. et BARRAS F.** Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system, SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 38352-38359.

## M

---

**MA J.F., OCHSNER U.A., KLOTZ M.G., NANAYAKKARA V.K., HOWELL M.L., JOHNSON Z., POSEY J.E., VASIL M.L., MONACO J.J. et HASSETT D.J.** Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, p. 3730-3742.

**MACEDO S., ROMAO C.V., MITCHELL E., MATIAS P.M., LIU M.Y., XAVIER A.V., LEGALL J., TEIXEIRA M., LINDLEY P. and CARRONDO M.A.** The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, vol. 10, n° 4, p. 285-290.

**MC HUGH J.P., RODRIGUEZ-QUINONES F., ABDUL-TEHRANI H., SVISTUNENKO D.A., POOLE R. K., COOPER C.E. et ANDREWS S.C.** Global iron dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 29478-29486.

**MAHÉ B., MASCLAUX C., RAUSCHER L., ENARD C. et EXPERT D.** Differential expression of two siderophore dependent-iron acquisition pathways in *Erwinia chrysanthemi* 3937: characterization of a novel ferrisiderophore permease of the ABC transporter family. *Mol Microbiol.*, 1995, vol. 18, p. 33-43.

**MARTIN R.G. et ROSNER J.L.** The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol.*, 2001, vol. 4, n° 2, p. 132-137.

**MARTINEZ A. et KOLTER R.** Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bact.*, 1997, vol. 179, p. 5188-5194.

**MASCLAUX C. et EXPERT D.** Signalling potential of iron in plant-microbe interactions: the pathogenic switch of iron transport in *Erwinia chrysanthemi*. *Plant J.*, 1995, vol. 7, p. 121-128.

**MASCLAUX C., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N. et EXPERT D.** Iron is a triggering factor for differential expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pectate lyases during pathogenesis of African violets. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1996, vol. 9, p. 198-205.

**MASSE E. et GOTTESMAN S.** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2002, vol. 99, p. 74620-4625.

**MASSE E., ESCORCIA F.E. et GOTTESMAN S.** Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 2003, vol. 17, n° 19, p. 2351-2355.

**MASSE E., VANDERPOOL C.K., GOTTESMAN S.** Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 2005, vol. 187, n° 20, p. 6962-6971.

**MATZANKE B.F., ANEMULLER S., SCHUNEMANN V., TRAUTWEIN A.X. and HANTKE K.** FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, n°5, p. 1386-1392.

**MENARD R., SANSONETTI P.J. et PARSOT C.** Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bact.* 1993, vol. 175, n°18, p. 5899-5906.

**MEY A.R., WYCKOFF E.E., KANUKURTHY V., FISHER C.R. and PAYNE S.M.** Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infect. Immun.*, 2005 a, vol. 73, n°12, p. 8167-8178.

**MEY A.R., CRAIG S.A. and PAYNE S.M.** Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB : the RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect Immun.*, 2005 b, vol. 73, n°9, 5706-5719.

**MIGUEL E., POZA-CARRIÓN C., LÓPEZ-SOLANILLA E., AGUILAR I., LLAMA-PALACIOS A., GARCÍA-OLMEDO F. et RODRÍGUEZ-PALENZUELA P.** Evidence Against a Direct Antimicrobial Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Infection of Plants by *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI*, 2000, vol. 13, n° 4, p. 421-429.

**MILA I., SCALBERT A. et EXPERT D.** Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry*, 1996, vol. 42, n°6, p. 1551-1556.

**MILLER C.D., KIM Y.C., WALSH M.K. and ANDERSON A.J.** Characterization and expression of the *Pseudomonas putida* bacterioferritin alpha subunit gene. *Gene*, 2000, vol. 247, n°1-2, p. 199-207.

**MOLL I., LEITSCH D., STEINHAUSER T. et BLÄSI U.** RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO*, 2003, vol. 4, p. 284-289.

**MØLLER T., FRANCH T., HØJRUP P., KEENE DR., BÄCHINGER H.P., BRENNAN R.G., VALENTIN-HANSEN P.** Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*, 2002, vol. 9, p. 23-30.

**MORIKAWA K., OHNIWA RL, KIM J, MARUYAMA A, OHTA T, TAKEYASU K.** Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes Cells.*, 2006, vol. 11, n°4, p. 409-423.

**MUFFLER A., TRAUlsen D.D., FISCHER D., LANGE R., HENGGE-ARONIS R.** The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 1997, vol. 179, p. 297-300.

**MÜNZINGER M., BUDZIKIEWICZ H., EXPERT D., ENARD C., et MEYER J.M.** Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Z. Naturforsch [C]*, 2000, vol. 55, p. 328-332.

## **N**

---

**NACHIN L., EL HASSOUNI M., LOISEAU L., EXPERT D. et BARRAS F.** SoxR dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*, the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 39, p. 960-972.

**NACHIN L., LOISEAU L., EXPERT D. et BARRAS F.** SufC, an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.*, 2003, vol. 22, p. 427-437.

**NAIR S. et FINKEL S.E.** Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, n°13, p. 4192-4198.

**NASSER W., REVERCHON S., CONDEMINE G. et ROBERT-BAUDOY J.** Specific Interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR Repressor with Different Operators of Genes Involved in Pectinolysis. *Journal of Molecular Biology*, 1994, vol. 236, n° 2, p. 427-440.

**NASSER W., ROBERT-BAUDOY J. et REVERCHON S.** Antagonistic effect of CRP and KdgR in the transcription control of the *Erwinia chrysanthemi* pectinolysis genes. *Mol Microbiol.*, 1997, vol. 26, n° 5, p. 1071-1082.

**NASSER W., BOUILLANT M.L., SALMOND G. et S. REVERCHON.** Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology*, 1998, vol. 29, n° 6, p. 1391.

**NASSER W., REVERCHON S., VEDEL R. et BOCCARA M.** PecS and PecT coregulate the synthesis of HrpN and pectate lyases, two virulence determinants in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol Plant Microbe Interact.*, 2005, vol. 18, n°11, p. 1205-1214.

**NEEMA C., LAULHÈRE J.-P., et EXPERT D.** Iron deficiency induced by chrysobactin in *Saintpaulia ionantha* leaves inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.*, 1993, vol. 102, p. 967-973.

**NEILANDS J.B.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 26723-26726.

**NIES D.H.** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, vol. 27, n°2-3, p. 313-339.

**NIVEN D.F. et EKINS A.** Iron content of *Streptococcus suis* and evidence for a *dpr* homologue. *Can. J. Microbiol.*, 2001, vol. 47, n°5, p. 412-416.

## O

---

**OGLESBY A.G., MURPHY E.R., IYER V.R. et PAYNE S.M.** Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and *ydeP*. *Mol Microbiol.*, 2005, vol. 58, n° 5, p. 1354-1367.

**OHNIWA RL, MORIKAWA K, KIM J, OHTA T, ISHIHAMA A, WADA C, TAKEYASU K.** Dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *EMBO J.*, 2006, vol. 25, n°23, p. 5591-5602.

**OKINAKA Y., YANG C.H., PERNA N.T. et KEEN N.T.** Microarray Profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Genes That are Regulated During Plant Infection. *MPMI*, 2002, vol. 15, n° 7, p. 619-629.

**OLLAGNIER S.** Les protéines fer-soufre. Regard sur la biochimie, 1998, vol. 1, p. 35-56.

**OLLAGNIER-DE CHOUDENS S., SANAKIS Y. et FONTECAVE M.** SufA/IscA, reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2004, vol. 9, p. 828-838.

**OLCZAK A.A., OLSON J.W. et MAIER R.J.** Oxidative-stress resistance mutants of *Helicobacter pylori*. *J. Bact.*, 2002, vol. 184, n°12, p. 3186-3193.

**OLSEN K.N., LARSEN M.H., GAHAN C.G., KALLIPOLITIS B., WOLF X.A., REA R., HILL C. et INGMER H.** The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology*, 2005, vol. 151, p. 925-933.

**OUTTEN F.W., WOOD M.J., MUNOZ F.M. et STORZ G.** The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulphur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 45713-45719.

**OUTTEN F.W., DJAMAN O. et STORZ G.** A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 2004, vol. 52, n° 3, p. 861-872.

## **P**

---

**PAPINUTTO E., DUNDON W.G., PITULIS N., BATTISTUTTA R., MONTECUCCO C., ZANOTTI G.** Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 15093-15098.

**PATZER S.I. et HANTKE K.** SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, p. 3307-3309.

**PEACOCK RS, ANDRUSHCHENKO VV, DEMCOE AR, GEHMLICH M, LU LS, HERRERO AG, VOGEL HJ.** Characterization of TonB interactions with the FepA cork domain and FecA N-terminal signaling domain. *Biometals*, 2006, vol. 19, n°2, p. 127-142.

**PERSMARK M., EXPERT D. et NEILANDS J.B.** Isolation, characterization and synthesis of chrysobactin, a compound with a siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, p. 3187-3193.

**PERSMARK M. et NEILANDS J.B.** Iron(III) complexes of chrysobactin, the siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Biometals*, 1992, Spring, vol. 5, n°1, p. 29-36.

**PESSOLANI M.C., SMITH D.R., RIVOIRE B., MC CORMICK J., HEFTA S.A., COLE S.T., BRENNAN P.J.** Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, n°1, p. 319-327.

**PISSAVIN C., ROBERT-BAUDOY J. et HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N.** Regulation of *pelZ*, a gene of the *pelB-pelC* cluster encoding a new pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bact.*, 1996, vol. 178, n°24, p. 7187-7196.

**POLIDORO M., BIASE D., DE MONTAGNINI B., GUARRERA L., CAVALLO S., VALENTI P., STEFANINI S. et CHIANCONE E.** The expression of the dodecameric ferritin in *Listeria* spp. is induced by iron limitation and stationary growth phase. *Gene*, 2002, vol. 296, p. 121-128.

**POOLE L.B. et ELLIS H.R.** Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry.*, 1996, vol. 35, n° 1, p. 56-64.

**POSEY J.E. et GHERARDINI F.C.** Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science.*, 2000, vol. 288, n° 5471, p. 1651-1653.

**POSTLE K.** Aerobic regulation of the *Escherichia coli tonB* gene by changes in iron availability and the *fur* locus. *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, n° 5, p. 2287-2293.

**POSTLE K. et KADNER R.J.** Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol.*, 2003, vol. 49, n°4, p. 869-882.

**PRENTKI P. et KRISCH H.M.** *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene*, 1984, vol. 29, n°3, p. 303-313.

**PRINCE R.W., COX C.D. et VASIL M.L.** Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, n° 9, p. 2589-2598.

**PULLIAINEN A.T., HAATAJA S., KAHKONEN S. et FINNE J.** Molecular basis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance mediated by streptococcal Dpr. Demonstration of the functional involvement of the putative ferroxidase center by site-directed mutagenesis in *Streptococcus suis*. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 7996-8005.

**PULLIAINEN A.T., KAUKO A., HAATAJA S., PAPAGEORGIOU A.C. et FINNE J.** Dps/Dpr ferritin-like protein: insights into the mechanism of iron incorporation and evidence for a central role in cellular iron homeostasis in *Streptococcus suis*. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 57, n°4, p. 1086-1100.

## Q

---

**QUAIL M.A., JORDAN P., GROGAN J.M., BUTT J.N., LUTZ M., THOMSON A.J., ANDREWS S.C. et GUEST J.R.** Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, vol. 229, p. 635-642.

## R

---

**RATNAYAKE D.B., WAI S.N., SHI Y., AMAKO K., NAKAYAMA H. et NAKAYAMA K.** Ferritin from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* : purification, gene cloning and mutant studies. *Microbiology*, 2000, vol. 146, p. 1119-1127.

**RAUSCHER L., EXPERT D., MATZANKE B.F. et TRAUTWEIN A.X.** Chrysobactin-dependent Iron Acquisition in *Erwinia chrysanthemi*, FUNCTIONAL STUDY OF A HOMOLOG OF THE *ESCHERICHIA COLI* FERRIC ENTEROBACTIN ESTERASE. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, n° 4, p. 2385-2395.

**RÉSIBOIS A., COLET M., FAELEN M., SCHOONEJANS E. et TOUSSAINT A.** Phi-EC2 a new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi*. *Virology*, 1984, vol. 137, p. 102-112.

**REVERCHON S., EXPERT D., ROBERT-BAUDOUIY J. et NASSER W.** The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, n°11, p. 3500-3508.

**REVERCHON S., ROUANET C., EXPERT D. et NASSER W.** Characterization of Indigoidine Biosynthetic Genes in *Erwinia chrysanthemi* and Role of This Blue Pigment in Pathogenicity. *J. Bact.*, 2002, vol. 184, n° 3, p. 654-665.

**ROCHA E.R., ANDREWS S.C., KEEN J.N., BROCK J.H.** Isolation of a ferritin from *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992, vol. 74, n°2-3, p.207-212.

**ROCHA E.R. et SMITH C.J.** Transcriptional regulation of the *Bacteroides fragilis* ferritin gene (*ftnA*) by redox stress. *Microbiology*, 2004, vol. 150, p. 2125-2134.

**ROCHA E.R., OWENS G. JR. and SMITH C.J.** The redox-sensitive transcriptional activator OxyR regulates the peroxide response regulon in the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J. Bact.*, 2000, vol. 182, n°18, p. 5059-5069.



**ROETTO A., BOSIO S., GRAMAGLIA E., BARILARO M.R., ZECCHINA G., CAMASCHELLA C.** Pathogenesis of hyperferritinemia cataract syndrome. *Blood Cells Mol Dis.*, 2002, vol. 29, n°3, p. 532-535.

**ROJAS C.M., HYUN HAM J., DENG W.L., DOYLE J.J. et COLLMER A.** HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *PNAS*, 2002, vol. 99, n° 20, p. 13142-13147.

**ROMAO C.V., REGALLA M., XAVIER A.V., TEIXEIRA M., LIU M.Y. et LE GALL J.** A bacterioferritin from the strict anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, p. 6841-6849.

**ROMAO C.V., MITCHELL E.P. and MCSWEENEY S.** The crystal structure of *Deinococcus radiodurans* Dps protein (DR2263) reveals the presence of a novel metal centre in the N terminus. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, vol. 11, n°7, p. 891-902.

**ROY S., GUPTA S., DAS S., SEKAR K., CHATTERJI D. et VIJAYAN M.** X-ray analysis of *Mycobacterium smegmatis* Dps and a comparative study involving other Dps and Dps-like molecules. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 339, n°5, p. 1103-1113.

## **S**

---

**SAITO T. et WILLIAMS R.** The binding of the ferric uptake regulation protein to a DNA fragment. *J. Eur J Biochem.*, 1991, vol. 197, n° 1, p. 43-47.

**SAMBROOK J., FRITSCH E. F. et MANIATIS T.A.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

**SAMSON R., LEGENDRE J.B., CHRISTEN R., FISCHER-LE SAUX M., ACHOUAK W. et GARDAN L.** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2005, vol. 55, p. 1415-1427

**SANTOS R., FRANZA T., LAPORTE M.-L., SAUVAGE C., TOUATI D. et EXPERT D.** Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *MPMI*, 2001, vol. 14, p. 758-767.

**SAUVAGE C., FRANZA T. et EXPERT D.** Analysis of the *Erwinia chrysanthemi* Ferrichrysoferritin Receptor Gene: Resemblance to the *Escherichia coli* *fepA-fes* Bidirectional Promoter Region and Homology with Hydroxamate Receptors. *J. Bact.*, 1996, p. 1227-1231.

**SCHOONEJANS E., EXPERT D. et TOUSSAINT A.** Characterization and Virulence Properties of *Erwinia chrysanthemi* Lipopolysaccharide-Defective, pEC2-Resistant Mutants. *J. Bact.*, 1987, p. 4011-4017

**SCHRETTL M., WINKELMANN G. et HAAS H.** Ferrichrome in *Schizosaccharomyces pombe*--an iron transport et iron storage compound. *Biometals*, 2004, vol. 17, n°6, p. 647-654.

**SCHWARTZ C.J., GIEL J.L., PATSCHKOWSKI T., LUTHER C., RUZICKA F.J., BEINERT H. et KILEY P.J.** IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2001, vol. 98, n° 26, p. 14751-14753.

**SCHWEDER T., LEE K.H., LOMOVSKAYA O. et MATIN A.** Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor ( $\sigma^S$ ) by ClpXP protease. *J. Bact.*, 1996, vol. 178, p. 470-476.

**SCHWYN B. et NEILANDS J.B.** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.*, 1987, vol. 160, p. 47-56.

**SHEVCHIK V.E., BOCCARA M., VEDEL R. et HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N.** Processing of the pectate lyase Peli by extracellular proteases of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology*, 1998, vol. 29, n° 6, p.1459.

**SMITH A. D., AGAR J.N., JOHNSON K.A., FRAZZON J., AMSTER I.J., DEAN D. R. et JOHNSON M.K.** Sulfur transfer from IscS to IscU : the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, vol. 123, n° 44, p. 11103-11104.

**STARR M.P., COSENS G. et KNACKMUSS H.J.** Formation of the Blue Pigment Indigoidine by Phytopathogenic *Erwinia*. *Appl. Microbiol.*, 1966, vol. 14, n° 6, p. 870-872.

**STEPHANI K., WEICHART D. et HENGGE R.** Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2003, vol. 49, n°6, p. 1605-1614.

**STIEFEL E.I. et WATT G.D.** *Azotobacter* cytochrome b557.5 is a bacterioferritin. *Nature*, 1979, vol. 279, n°5708, p. 81-83.

**STILLMAN T.J., HEMPSTEAD P.D., ARTYMIUK P.J., ANDREWS S.C., HUDSON A.J., TREFFRY A., GUEST J.R. et HARRISON P.M.** The high-resolution X-ray crystallographic structure of the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*, comparison with human H ferritin (HuHF) and the structures of the Fe<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup> derivatives. *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 307, p. 587-603.

**STILLMAN T.J., CONNOLLY P.P., LATIMER C.L., MORLAND A.F., QUAIL M.A., ANDREWS S.C., TREFFRY A., GUEST J.R., ARTYMIUK P.J., HARRISON P.M.** Insights into the effects on metal binding of the systematic substitution of five key glutamate ligands in the ferritin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, n°28, p. 26275-26286.

**STOJILJKOVIC I., BAUMLER A.J. et HANTKE K.** Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 236, p. 531-545.

**STOJILJKOVIC I., COBELJIC M. et HANTKE K.** *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, vol. 108, n° 1, p. 111-115.

**STORZ G., JACOBSON F.S., TARTAGLIA L.A., MORGAN R.W., SILVEIRA L.A., AMES B.N.** An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bact.*, 1989, vol. 171, n°4, p. 2049-2055.

**STORZ G. et IMLAY J.A.** Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, vol. 2, n° 2, p. 188-194.

**SU M., CAVALLO S., STEFANINI S., CHIANCONE E. et CHASTEEN N.D.** The so-called *Listeria innocua* ferritin is a Dps protein. Iron incorporation, detoxification, and DNA protection properties. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, n°15, p. 5572-5578.

## T

---

**TAKAGI H., SHI D., HA Y., ALLEWELL N.M. et THEIL E.C.** Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, n°30, p. 18685-18688.

**TARDY F., NASSER W., ROBERT-BAUDOY J. et HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N.** Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J. Bact.*, 1997, vol. 179, n° 8, p. 2503-2511.

**TONELLO F., DUNDON W.G., SATIN B., MOLINARI M., TOGNON G., GRANDI G., DEL GIUDICE G., RAPPUOLI R. et MONTECUCCO C.** The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 34, n°2, p. 238-246.

**TOUATI D., JACQUES M., TARDAT B., BOUCHARD L. et DESPIED S.** Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in  $\Delta fur$  mutants of *Escherichia coli* : Protective role of superoxide dismutase. *J. Bact.*, 1995, vol. 177, p. 2305-2314.

**TOUATI D.** Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli* – how many ways are there to trigger *soxRS* response? *Redox Report*, 2000, vol. 5, n° 5, p. 287-293.

**TREFFRY A., BAUMINGER E.R., HECHEL D., HODSON N.W., NOWIK I., YEWDALL S.J. et HARRISON P.M.** Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin: a study aided by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.*, 1993, vol. 296, n°3, p. 721-728.

**TSUI H.C., FENG G. et WINKLER M.E.** Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.*, 1997, vol. 179, p. 7476-7487.

## U

---

**UESHIMA J., SHOJI M., RATNAYAKE D. B., ABE K., YOSHIDA S., YAMAMOTO K. et NAKAYAMA K.** Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.*, 2003, vol. 71, n°3, p. 1170-1178.

**URBINA H.D., SILBERG J.J., HOFF K.G., et VICKERY L.E.** Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, n° 48, p. 44521-44526.

## V

---

**VAN DELDEN C., COMTE R. et BALLY A.M.** Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density- dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.*, 2001, vol. 183, p. 5376-5384.

**VAN VLIET A.H., STOOFF J., VLASBLOM R., WAINWRIGHT S.A., HUGHES N.J., KELLY D.J., BERESWILL S., BIJLSMA J.J., HOOGENBOEZEM T., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M., KIST M., KUIPERS E.J. et KUSTERS J.G.** The role of the Ferric Uptake Regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *HELICOBACTER*. 2002, vol. 7, n°4, p. 237-244.

**VAN VLIET A.H., BAILLON M.L., PENN C.W., KETLEY J.M.** *Campylobacter jejuni* contains two *fur* homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, n° 20, p. 6371-6.

**VELAYUDHAN J., HUGHES N.J., MCCOLM A.A. , BAGSHAW J., CLAYTON C.L., ANDREWS S.C. et KELLY D.J.** Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori* : a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol.*, 2000, vol. 37, n° 2, p. 274-86.

**VIJAYAKUMAR S.R., KIRCHHOF M.G., PATTEN C.L. et SCHELLHORN H.E.** RpoS-regulated genes of *Escherichia coli* identified by random *lacZ* fusion mutagenesis. *J Bact.*, 2004, vol. 186, n°24, p. 8499-8507.

## **W**

---

**WADE V.J., LEVI S., AROSIO P., TREFFRY A., HARRISON P.M. and MANN S.** Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 221, n°4, p. 1443-1452.

**WAI S.N., TAKATA T., TAKADE A., HAMASAKI N. et AMAKO K.** Purification and characterization of ferritin from *Campylobacter jejuni*. *Arch. Microbiol.*, 1995, vol. 164, n°1, p. 1-6.

**WAI S.N., NAKAYAMA K., UMENE K., MORIYA T. et AMAKO K.** Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni* : Contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 20, p.1127-1134.

**W Aidner B., Greiner S., Odenbreit S. et 11 autres auteurs.** Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun*, 2002, vol. 70, p. 3923-3929.

**WALDO G.S., WRIGHT E., WHANG Z.H., BRIAT J.F., THEIL E.C. et SAYERS D.E.** Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 109, n°3, p. 797-802.

**WANDERSMAN C. et STOJILJKOVIC I.** Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores *Curr Opin Microbiol*, 2000, vol. 3, p. 215-220.

**WANDERSMAN C. et DELEPELAIRE P.** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.*, 2004, vol. 58, p. 611-647.

**WANG G., HONG Y., OLCZAK A., MAIER S.E. et MAIER R.J.** Dual Roles of *Helicobacter pylori* NapA in inducing and combating oxidative stress. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, n°12, p. 6839-6846.

**WEI Z.M., LABY R.J., ZUMOFF C.H., BAUER D.W., HE S.Y., COLLMER A. et BEER S.V.** Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, vol. 257, p. 85-88.

**WEI Y. et FU D.** Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the *Escherichia coli* metal transporter YiiP (FieF). *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, n° 40, p. 33716-33724.

**WEINBERG E.D.** The Lactobacillus anomaly : total iron abstinence. *Perspect Biol Med.* 1997, vol. 40, n° 4, p. 578-583.

**WILDERMAN P.J., SOWA N.A., FITZGERALD D.J., FITZGERALD P.C., GOTTESMAN S., OCHSNER U.A. et VASIL M.L.** Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad. Sci. U S A.*, 2004, vol. 101, n° 26, p. 9792-9797.

**WOLF S.G., FRENKIEL D., ARAD T., FINKEL S.E., KOLTER R. et MINSKY A.** DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature*, 1999, vol. 400, p. 83-85.

**WU G.W. et POOLE R.K.** Microbial globins. *Adv. Microb. Physiol.*, 2003, vol. 47, p. 255-310.

**WU J., DUNHAM W.R. et WEISS B.** Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, n°17, p. 10323-10327.

## **y**

---

**YAMAMOTO Y., HIGUCHI M., POOLE L.B. et KAMIO Y.** Role of the *dpr* product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.*, 2000, vol. 182, n° 13, p. 3740-3747.

**YAMAMOTO Y., POOLE L.B., HANTGAN R.R. et KAMIO Y.** An iron binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron dependent hydroxyl radical formation *in vitro*. *J Bacteriol.* 2002, vol. 184, p. 2931-2939.

**YAMAMOTO Y., FUKUI K., KOUJIN N., OHYA H., KIMURA K. et KAMIO Y.** Regulation of the intracellular free iron pool by Dpr provides oxygen tolerance to *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, n°18, p. 5997-6002.

**YAMASHINO T., UEGUCHI C. et MIZUNO T.** Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, n°3, p. 594-602.

**YANG X., LE BRUN N.E., THOMSON A.J., MOORE G.R., CHASTEEN N.D.** The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, n°16, p. 4915-4923.

**YANG X., CHEN-BARRETT Y., AROSIO P. et CHASTEEN N.D.** Reaction paths of iron oxidation and hydrolysis in horse spleen and recombinant human ferritins. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, n°27, p. 9743-9750.

**YANG C.-H., GAVILANES-RUIZ M., OKINAKA Y., VEDEL R., BERTHUY I., BOCCARA M., CHEN J.W.T., PERNA N.T. et KEEN N.T.** *hrp* genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *MPMI*, 2002, vol. 15, n° 5, p. 472-480.

**YANG S., PERNA N.T., COOKSEY D.A., OKINAKA Y., LINDOW S. E., IBEKWE A. M., KEEN N.T. et YANG C.H.** Genome-Wide Identification of Plant-Upregulated Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Using a GFP-Based IVET Leaf Array. *MPMI*, 2004, vol. 17, n° 9, p. 999-1008.

**YOUNG G.M. et POSTLE K.** Repression of *tonB* transcription during anaerobic growth requires Fur binding at the promoter and a second factor binding upstream. *Mol Microbiol.* 1994, vol. 11, n° 5, p. 943-954.

## Z

---

**ZANOTTI G., PAPINUTTO E., DUNDON W., BATTISTUTTA R., SEVESO M., GIUDICE G., RAPPUOLI R. et MONTECUCCO C.** Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *J. Mol. Biol.* 2002, vol. 323, n°1, p. 125-130.

**ZHANG A., WASSARMAN K.M., ORTEGA J., STEVEN A.C. et STORZ G.** The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol. Cell.*, 2002, vol. 9, n° 1, p. 7-8.

**ZHANG A., ALTUVIA S., TIWARI A., ARGAMAN L., HENGGE-ARONIS R. et STORZ G.** The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J.*, 1998, vol. 17, n°20, p. 6061-6068.

**ZHAO G.H., CECI P., ILARI A., GIANGIACOMO L., LAUE T.M., CHIANCONE E. et CHASTEEN N.D.** Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells - A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 27689-27696.

**ZHENG L., CASH V.L., FLINT D.H. et DEAN D.R.** Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 1998a, vol. 273, n°21, p. 13264-72.

**ZHENG M., DOAN B., SCHNEIDER T.D. et STORZ G.** OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, p. 4639-4643.

**ZHENG M. et STORZ G.** Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, vol. 59, n° 1, p. 1-6.

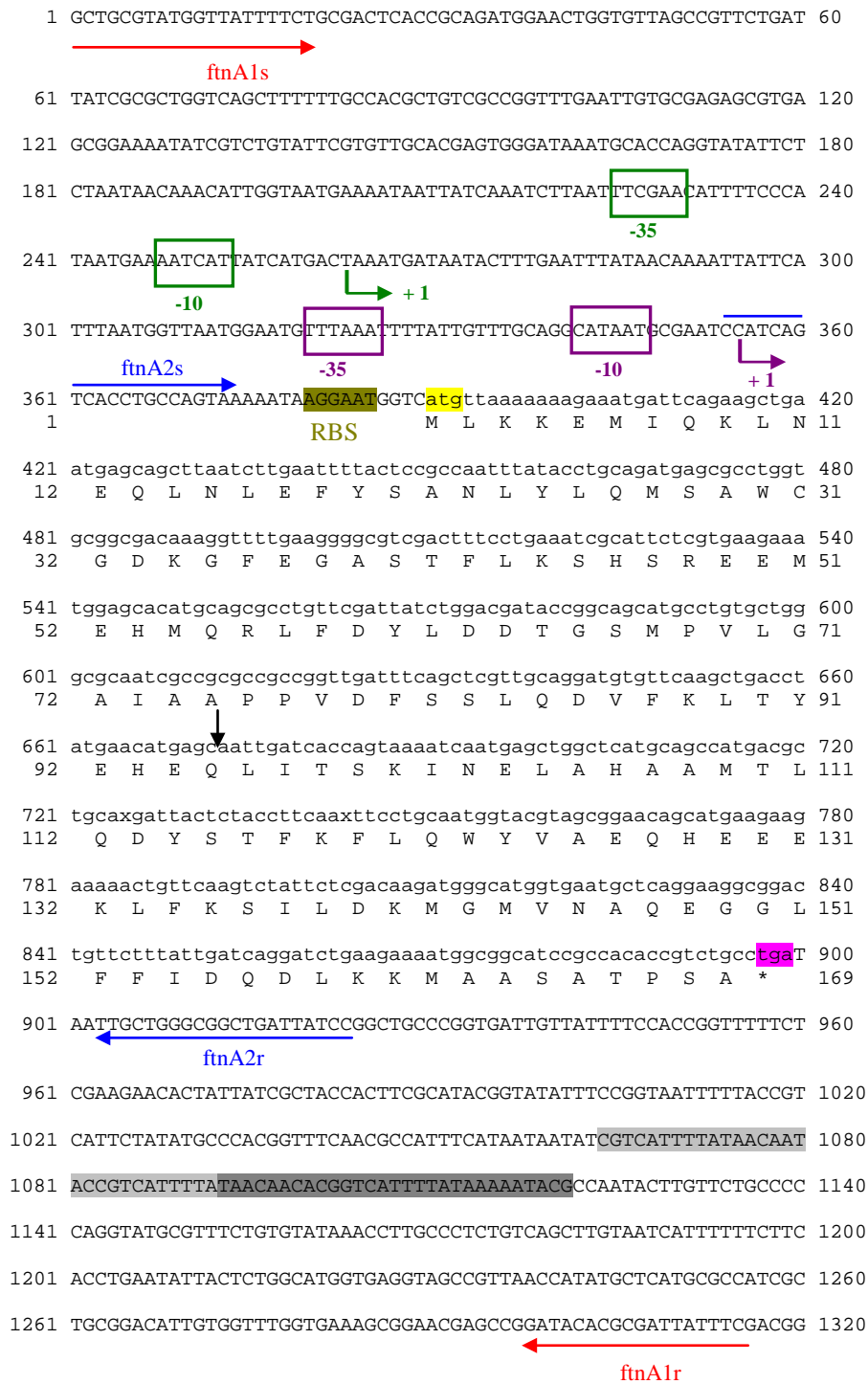
**ZHENG M., WANG X., TEMPLETON L.J., SMULSKI D.R., LAROSSA R.A. et STORZ G.** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.*, 2001 a, vol. 183, n° 15, p. 4562-4570.

**ZHENG M., WANG X., DOAN B., LEWIS K.A., SCHNEIDER T.D. et STORZ G.** Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2001 b, vol. 183, n° 15, p. 4571-4579.

**ZHENG M., ASLUND F. et STORZ G.** Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 1998, vol. 279, n° 5357, p. 1718-1721.

# ANNEXES

---



**Annexe 1** : Séquences nucléique et protéique de la ferritine FtnA d'*E. chrysanthemi* 3937.

Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les deux sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par une expérience d'extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TGA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). La flèche verticale désigne le site de restriction *MunI* où l'interposon  $\Omega$  a été inséré pour construire un mutant *fnmA $\Omega$* .



1 TCGAAGACGTATTCTCCATCTCCGGCCGTGGTACCGTAGTAACCGGTCGTGTAGAGCGCG 60  
Bfr1s

61 GCATCGTCAAAGTGGGTGAAGAAGTAGAAATCGTGGGTATCAAAGACACCACGAAAACCA 120  
→

121 CCTGTACTGGTGTGAAATGTTCCGCAAACCTGCTGGACGAAGGCCGTGCGGGGAGAAACG 180  
181 TCGGCGTCTGTGCTGCGTGGTACCAAGCGTGATGAAGTTGAGCGTGGTCAGGTTCTGGCCA 240  
241 AGCCGGGCTCCATCAAGCCGCACACTCAGTTCGAATCTGAAGTGTATATCTGAGCAAAG 300  
301 ACGAAGGCGGCCGTCACTACTCCGTTCTTCAAAGGCTACCGTCCGCAGTCTACTTCCGTA 360  
361 CTACTGACGTGACAGGCACCATCGAACTGCCGGAAGGCGTAGAAATGGTCATGCCGGGCG 420  
421 ACAACATCAAGATGGTCGTAACCTGATCGCGCCGATCGCGATGGACGACGGTCTGCGTT 480  
481 TCGCTATCCGTGAAGGCGCCGTACTGTAGGCGCCGGCGTGGTTGCCAAAGTTATCGCTT 540  
541 AATTGCGGATAGCTAAAGTAAAGAAAAGGGTACTTCGGTGCCTTTTTTTATCCCCCA 600

601 GAGAAGAAATTGAAAATAAAAACCATTCTTATTACAAATGCGTTTAATTGGTTAAAAAATGA 660  
1 Bfds -35 -10 +1 +1 RBS +1 ATGA 2 P1, P2

661 GTTATCCGCATatgatgtctgtctgtgcaatgccgtttccgataaagtatttcgacagg 720  
3 M Y V C L C N A V S D K V I R Q V 22

721 tcgttcgtcagcaccagcctcagtcgctgaaacaattaagcaatttgcggttgga 780  
23 V R Q H Q P Q S L K Q L K Q F V P V G T 42

781 cggaaatggtgtaaatgcatccgtcaggccaggctgatcctggaagaagaacagcaaaaa 840  
43 E C G K C I R Q A R L I L E E E T A K N 62

841 atgcggaattgtataaagtccgataaGTGATAAGGGCATTCTTTGACTCTGTGTTGACC 900  
63 A E L Y K V A \* ← Bfdr 69

901 GCTTCTACACTTTTTAGTACTGGAGCGGAGGAGCAGATCatgaaagcgataagaatgt 960  
1 Bfr2s RBS M K G D K N V 7

961 cattacacatctgaacaaactggtggtaacgagctggtgcaatcaaccagtacttct 1020  
8 I T H L N K L L G N E L V A I N Q Y F L 27

1021 tcatgcccgcgatgttcaaaaactgggactcaaacgtcttaacgatcatgagatcatga 1080  
28 H A R M F K N W G L K R L N D H E Y H E 47

1081 gtcaattgacgaaatgaacacgcggatcggtatatacgagcgtatcctttttctggaagg 1140  
48 S I D E M K H A D R Y I E R I L F L E G 67

1141 tgtccctaactctgcagatcttggcaaacatcaatcggtagaacgtagaagagatgct 1200  
68 V P N L Q D L G K L N I G E D V E E M L 87

1201 gcgttctgatcttgcgttggaaactcgaaggtgcaagatttgcgtgaagcgatctccta 1260  
88 R S D L A L E L E G A K D L R E A I S Y 107

1261 tgccgactcggtagggattatgtcagtcgcatctgatggtgacgtgctcgtgatga 1320  
108 A D S V R D Y V S R D L M V D V L A D E 127

1321 agaagagcacttgactggctgaaaccgaattagagctgattacgcgtctgggatcca 1380  
128 E E H I D W L E T E L E L I T R L G I Q 147

1381 aaactacctgcaaacgcaattgaaagaagatgaTTTTTTCACCCGACATTCCGTGCGAT 1440  
148 N Y L Q T Q L K E E \* ← Bfr2r 157

1441 ACGATTGTGTCCAGTCGGTGGCTGATGAATAAAGCATCAACTCTAACTTTCGATTGCTT 1500  
1501 CCTGAGCAAATTTGCGTATAATGCGCGGGCTTACCTGAAATGTAAGCCCGATTTCGTATG 1560

1561 AATATGAATCTGAAGGCAGGTACCCGATACCCGCCGAACAATACTCCCGATATGGGGGTT 1620  
← Bfr1r

1621 ATGTACTGAACGATTACTCCCCATCAATCGTAATGGGTGTGAGGAGTAATTATTTCC 1680

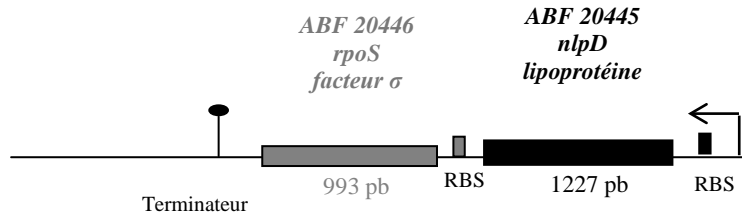
gène *bfd*

gène *bfr*

**Annexe 2** : Séquences nucléique et protéique de la bactéroferritine Bfr d'*E. chrysanthemi* 3937. Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les deux sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TGA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). Les flèches verticales en position 794 et 1155 désignent les sites de coupure par les enzymes *NsiI* et *PstI* où la cassette *aphA3* et  $\Omega$  a été inséré pour construire respectivement les mutants *bfd* non polaire et *bfr* $\Omega$ .

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Ech	MSQNTLKYNELHEDAEFDENGID--VFDDKALAEETSQSDQLDEELLSQGTQRVLDATQLYLGEIGYSPLLTAEVEYFARRALRGDVSRRRRHIESNLRVVKIARRYNNRGLALLDLIEEENGLI													
Ec	MSQNTLKYHDLNEDAEFDENGVE--VFDEKALVEQEPSNDLAEELLSQGATQRVLDATQLYLGEIGYSPLLTAEVEYFARRALRGDVSRRRRHIESNLRVVKIARRYGNRGLALLDLIEEENGLI													
Yp	MSQNTLKYNELHEDAEFDENSTETEIFDEKALVDEPTESELADELLAQGYTQRVLDATQLYLGEIGYSPLLTAEVEYFARRALRGDVSRRRRHIESNLRVVKIARRYNNRGLALLDLIEEENGLI													
Consensus	MSQnTLKYn#LhEDa#FDENg.#..!FD#KAlv##Eps#s#La##ELLsQG.tQRVLDATQLYLGEIGYSPLLTAEVEYFARRALRGDvsRRRRHIESNLRVVKIARRY.NRGLALLDLIEEENGLI													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Ech	RAYEKFDPERGFRFSTYATWIRQTIERRAHNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKL DHEPSAEETAEQLDKPYDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILADEKNGPEDTTQDDMHKQK													
Ec	RAYEKFDPERGFRFSTYATWIRQTIERRAHNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKL DHEPSAEETAEQLDKPYDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILADEKNGPEDTTQDDMHKQS													
Yp	RAYEKFDPERGFRFSTYATWIRQTIERRAHNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKL DHEPSAEETAEQLDKPYDDVSRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILADEKNGPEDTTQDDMHKQS													
Consensus	RAYEKFDPERGFRFSTYATWIRQTIERRAHNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKL DHEPSAEETAEQLDKPYDDVsRMLRLNERITSVDTPGGDSEKALLDILaDEk#NGPEDTTQD#DMHKs													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Ech	IVKALFELNAKQREVLARRFGLLGYEAATLEDVGREIGL TRERYRQIQVEGLRRLREILQVQGLDIEELFRE													
Ec	IVKALFELNAKQREVLARRFGLLGYEAATLEDVGREIGL TRERYRQIQVEGLRRLREILQTQGLNIEALFRE													
Yp	IVKALFELNAKQREVLARRFGLLGYEAATLEDVGREIGL TRERYRQIQVEGLRRLREILQTQGLSIEALFRE													
Consensus	IVKALFELNAKQREVLARRFGLLGYEAATLEDVGREIGL TRERYRQIQVEGLRRLREILQtQGL.IEaLFRE													

**Annexe 3** : Alignement des séquences du facteur de transcription  $\sigma^S$  d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech), *E. coli* K12 (Ec) et *Y. pestis* CO92 (Yp). La séquence de  $\sigma^S$  d'*E. chrysanthemi* 3937 présente 92% et 91% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli* et *Y. pestis* respectivement.



**Annexe 4** : Représentation schématique de l'environnement du gène *rpoS* codant le facteur de transcription  $\sigma^S$  d'*E. chrysanthemi* 3937.

1 GCCAGTCTCGGTA AAAAGTCCGTCTTTAAAATTTCAATACAACCTCTCTTATGGTATAAAC 60  
 61 GGATTGATATGTAGGCTGTGTCCCGTCGTGTCCGTGTTTGTACCCTGTTGGTATGGC 120  
 121 GTGATCGCCAGACAGACCTTATGGTACAGCCTGTTTGCCTGACGAATAAAAATAAACGGT 180  
 181 AATCGTTTTTACGTTCTCGTCTGCATGATTGCCAGCCTTAATCAGGGTGTCCGGAACG 240  
 241 GAAATAAACGTCGGGACCGGGCAGATTTCTGCATTTTGGTTATAGGGGAATTTGGCGC 300

301 atgggaagc caaatcgtgaactggcgtcagatcgctgtgtgttcggttattactctggga 360  
 1 M G S Q I V N W R Q I A V C S V I T L G 20  
 361 ttggccggttgtgcaaatgacaataatcaggcggcccgatcagcagcgtgggagataac 420  
 21 L A G C A N D N N Q A A P I S S V G D N 40  
 421 ggcgaggaagccgctcgggcaatgaccaccacctattcgccgcccgcgtatttccagc 480  
 41 G A G S R S G S T T T Y S P P P R I S S 60  
 481 gtcggcagcgtgagcaataactcaacctgttccttcggcggcatcagccaccttcc 540  
 61 V G S V S N N T Q P V P S A V I S H P S 80  
 541 agcgatggcggtcaccaccggcaaggttaagattgtctataaccgcagctataacagc 600  
 81 S D A A V T T R E G K I V Y N R S Y N S 100  
 601 atcccaaaagggagctacagcggtaatacctacaccgtcaaacggggataaccctgttc 660  
 101 I P K G S Y S G N T Y T V K R G D T L F 120  
 661 tatatgcctggattaccggtaattaccgcgcaactggcgcagcgaacaacattcag 720  
 121 Y I A W I T G N D Y R E L A Q R N N I Q 140  
 721 gagccttacagcctgaatgtgggtcagtcgtaagcctcggcagcaacatgaatgccggc 780  
 141 E P Y S L N V G Q S L S L G S N M N A G 160  
 781 ggcagcaccagcgtggtgattgccagcgcgaccacgataacgacatccggcggc 840  
 161 G S T Q G M A I A S A P T T I T T S A P 180  
 841 gtaacaacgtccgcccggtagaaagcagccggcggcagcggacatagctgctgaa 900  
 181 V T T S A P V E S S P A G S G H M L P E 200  
 901 aatgccggcaagcctctggcggcgtcgcatgctatcaggcaataacagcggcggc 960  
 201 N A G K A S G G R M L S G N N T A G G S 220  
 961 agcggccatagctgcccggcagcggcggcggcgtggagccgctcaccacaaatgcaa 1020  
 221 S G H M L P A S A A A A G A A S P Q M Q 240

1021 acgacgcaggttattctcaaccaactaatgcgtattctgaaggttcgggtaaacagaat 1080  
 241 T T Q V D S Q P T N A Y S E G S G K Q N 260  
 1081 gtggtaagatgttggccacggcgggagcggcagaccacgcttccgacgaccgaaccgacg 1140  
 261 V G K M L P T A G A A T T L P T T E P T 280  
 1141 caaacgagcagcgaattgccagctggcgttggcctacagacgggaagtcataagtagt 1200  
 281 Q T S T A I A S W R W P T D G K V I D S 300

1201 ttctcagcctcagagggggaaataaagggttggatcgccggctcacgtgggcaatcc 1260  
 301 F S A S E G G N K G I D I A G S R G Q S 320  
 1261 gttatcgctaccgcatccggcgtgtagtgtatgccccgaacgcttacgctggttacggt 1320  
 321 V I A T A S G R V V Y A G N A L R G Y G 340  
 1321 aatctgatcatcattaaacataatgatgactacttgagcgcctatgccataacgaaacc 1380  
 341 N L I I I K H N D D Y L S A Y A H N E Q T 360  
 1381 atgctggctcgggaaacaacaagaggttaaaggcgggtcaacaaatcgctaccatgggtagc 1440  
 361 M L V R E Q Q E V K A G Q Q I A T M G S 380

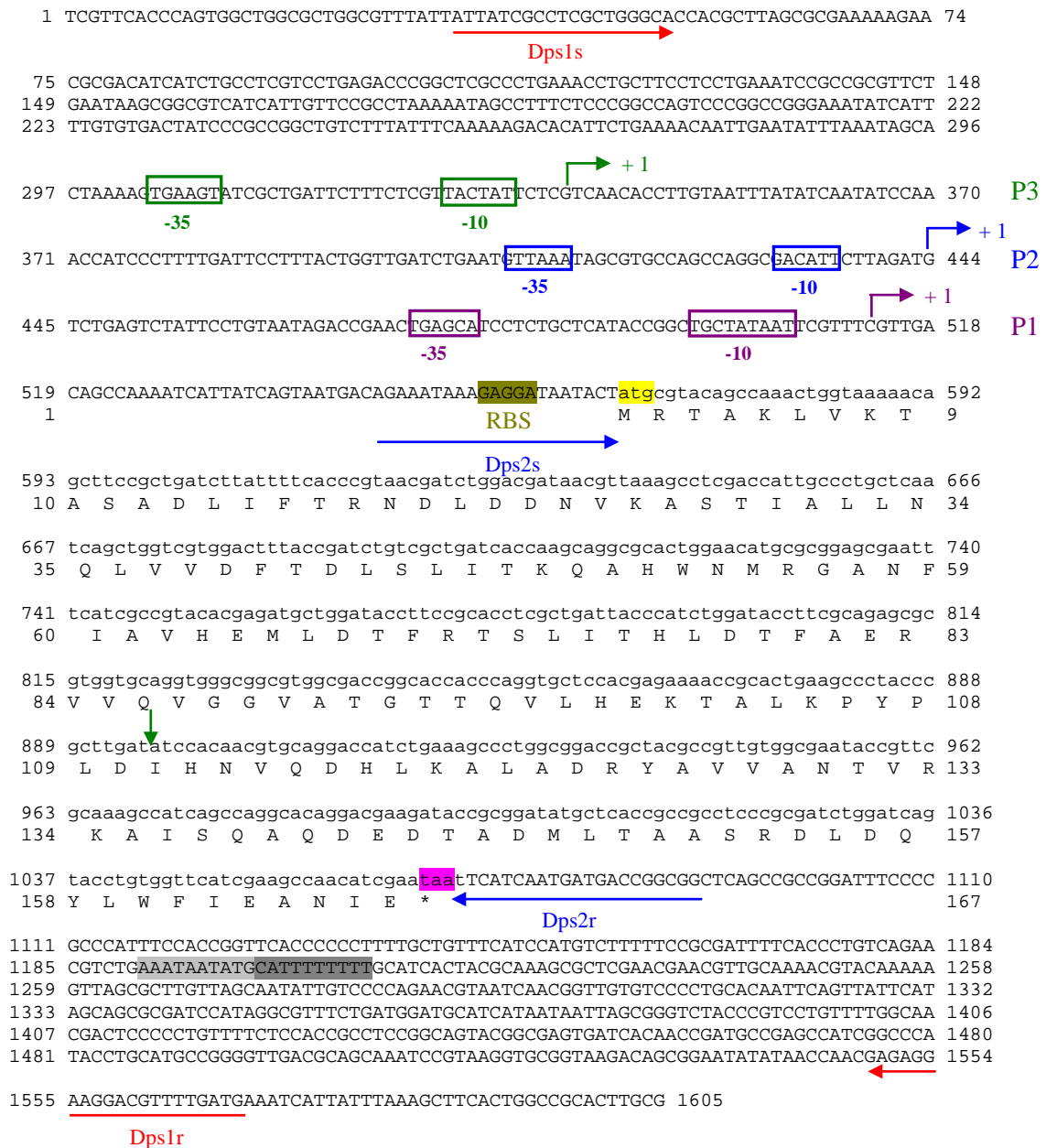
1441 accggaaccagttcagctacgcttgcattttgaaattcgttacaaggggaaatccgtaaac 1500  
 381 T G T S S V R L H F E I R Y K G K S V N 400  
 1501 ccgctgcgttttctccgcagcgaataaTCGGGCAGAGTATTTCCGGTATTCTGCCAAGGG 1560  
 401 P L R F L P Q R \* 408

1561 ATCACGGGTAGGAGC CACTTatgagc caaaaatcagctgaaagttaacgagttacatgaag 1620  
 1 M S Q N T L K V N E L H E D 14  
 1621 atgctgaattcagatgagaatggaatcagcgtttttgacgacaaaagcgttggcggaggaag 1680  
 15 A E F D E N G I D V F D D K A L A E E E 34  
 1681 aaaccagcagatagcagaccagctcagcaggaattgctttcagcaggaactgctcagcgcg 1740  
 35 T S D S D Q L D E E L L S Q G T A Q R V 54  
 1741 tgctggatgcaaccagctttatctgggagaaatcggctactcacctcttctgactgctg 1800  
 55 L D A T Q L Y L G E I G Y S P L L T A E 74  
 1801 aagaagaagtttactttgcccgtcggcgctacgcggcgatgtttcatctcgccgcgcta 1860  
 75 E E V Y F A R A L R G D V S S R R M 94  
 1861 tgatcgagagtaacctgcccgtggtgaaatcgcccgcgctacaataatcggggac 1920  
 95 I E S N L R L V V K I A R R Y N N R G L 114  
 1921 tggcgtgctggatctgattgagaagggaaacctcggtttgatccgpcagtcgagaagt 1980  
 115 A L L D L I E G N L G L I R A V E K F 134  
 1981 ttgacctgaacgcgggttcgcttttcgacttacgccacctggtggatccgctcagacca 2040  
 135 D P E R G F R F S T Y A T W W I R Q T I 154  
 2041 ttgaagggccatcgaatcagaccgcaccatccggtttaccatccatcgttaaag 2100  
 155 E A R I M N Q T R T I R L P I H I S R R M 174  
 2101 aactcaatgtctacctgctaccgcagcgaactgtcccacaagcttgatcatgagccca 2160  
 175 L N V Y L R T A R E L S H K L D H E P S 194  
 2161 gtgcggaagaaatcggcagcggctggataagccgggtgatgagcttaaccgcatgctc 2220  
 195 A E E I A E R L D K P V D D V N R M L R 214  
 2221 gtctcaacgagcagcagcgtggtgatacggcgtggcggggattcggaaaaggcgc 2280  
 215 L N E R I T S V D T P L G G D S E K A L 234  
 2281 tgctggatattctggcagcagagaaggataacggcccgaagacaccacgcaggataacg 2340  
 235 L D I L A D E E K D N G P E D T T Q D N D 254  
 2341 atatgaaacaaaatcgttaagtggttggtaactgaacgaaaacagcgtgaagtgc 2400  
 255 M K Q N I V K W L F E L N A K Q R E V L 274  
 2401 tggcccgcggttttggctgctgggatataagccgccacgctggaagatgtgggcccgtg 2460  
 275 A R R F G L L G Y E A A T L E D V G R E 294  
 2461 aaatcgggtgactcgtgaacgggttcgcccagatcaggtagaagggctgcgcccgttgc 2520  
 295 I G L T R E R V R Q I Q V E G L R R L R 314  
 2521 gcgagatcctgcaggtgacggggctggacatcgaagagctggtccgcgaaataaCTCGCAC 2580  
 315 E I L Q V Q G L D I E E L F R E \* 330

2581 AATAATTAACATGGCACAAAAAATGGTGGGATGTCACCATTTTTTATGCTGCAAT 2640

2641 CGGTTGTGCGTTATCGGGCACACTGAGACAGCAGGAACTCGACGATATCGCCGCCTTG 2700  
 2701 ATCATCTCTTTTTCGCCTTTACGGCGGTGCTTGTACTCGATCTCGTCTTATCCAGATTG 2760  
 2761 CGGTCGCCAATCACGATGGTGTGCGGAATACCGATCAGTTCATGTCCGCAAACATCACG 2820  
 2821 CCGGGGCTTCTTTGCGACTCGTCCAGCAATACATCGACGCCGTTGGCGCGCAACTGCTG 2880  
 2881 TAGATGCCCTCGCTACTTCTGCACCGGGAAGGATTTATGCATGTTTCATCGCAAACAT 2940  
 2941 GCCACCTGGAACGGCGCAATGGCGTCAGGCCAGATAATGCCGCGATCGTGTGTTCTGT 3000

Annexe 5 : séquence nucléique et protéique du gène *rpoS* d'*E. chrysanthemi*



**Annexe 6** : Séquences nucléique et protéique de la protéine Dps1 d'*E. chrysanthemi* 3937. Les séquences promotrices, boîtes -10 et -35 sont encadrées et le site potentiel de fixation du ribosome RBS est surligné en vert. Les trois sites d'initiation de la transcription +1 ont été déterminés par extension d'amorces. Les codons d'initiation ATG et de terminaison TAA de la traduction sont surlignés en jaune et rose respectivement. Le terminateur potentiel de transcription est surligné en gris. Les amorces utilisées dans ce travail sont indiquées par des flèches horizontales rouges (construction mutant) et bleues (sonde pour Northern-blot). La flèche verticale désigne le site de restriction *EcoRV* où l'interposon  $\Omega$  a été inséré pour construire un mutant *dps1 $\Omega$* .

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech  MNIRDLEYLVALAEHRHFRRRAADSCHYSQPTLSGQIRKLEDELGYMLLERTSRKVLFTQAGLLVEQARTVYLVREVYVKEMASQQGETMSGPLHIGLIPTVGPYLLPQIIPMLHRTFPKLEMYLHEAQTH
Ec   MNIRDLEYLVALAEHRHFRRRAADSCHYSQPTLSGQIRKLEDELGYMLLERTSRKVLFTQAGMLLVQDARTVYLVREVYVKEMASQQGETMSGPLHIGLIPTVGPYLLPHIIPMLHQTFPKLEMYLHEAQTH
Consensus MNIRDLEYLVALAEHRHFRRRAADSCHYSQPTLSGQIRKLEDELGYMLLERTSRKVLFTQAG$LLV#QARTVYLVREVYVKEMASQQGETMSGPLHIGLIPTVGPYLLPqIIPMLHrTFPKLEMYLHEAQTH

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech  QLLAQLDSGKLDCAILAMVKESEAFIEVPLFDEPHLLAIYQDHPANRERYVMSDLSEKLLMLEDGHCLRDQAMGFCFQAGADEDTHFRTSLETLRNMVAAGSGITLLPSLAVPPERVYRDGVCYLPCY
Ec   QLLAQLDSGKLDCAILAMVKESEAFIEVPLFDEPHLLAIYQDHPANRECVPMADLAGEKLLMLEDGHCLRDQAMGFCFQAGADEDTHFRTSLETLRNM-----PALAVPPERKRDGVVYLPYCI
Consensus QLLAQLDSGKLDCAILAMVKESEAFIEVPLFDEPHLLAIYQDHPANRErVa#ADLAGEKLLMLEDGHCLRDQAMGFCF#QAGADEDTHFRTSLETLRNM.....PaLAVPPERkRDGVcYLPCi

261    270    280    290    300    305
|-----|-----|-----|-----|
Ech  KPEPKRTIALVYRPGSPLRGRYEQLADSVREHMQLMHEQLSKQSA
Ec   KPEPRRTIIGLVYRPGSPLRSRYEQLAEAIRARMGDFDKVLRQAV
Consensus KPEPrRTIaLVYRPGSPLRgRYEQLA#a!RarH#gHm#q11KQaa

```

**Annexe 7 :** Alignement des séquences de la protéine OxyR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle d'*E. coli* K12 (Ec). La séquence d'OxyR d'*E. chrysanthemi* 3937 présente 85% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli*.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech  MSSHERSKLPLPSLRNIQAFLEVANTQSINVAEKLNITASAVSHQIATLEKFLNKKLFRIRNGKGYTLTEHGEIYLRVYSGAISIIIGRATDKMINESSNEILRVHSSPSFGMIWLMRRLGKFRTLHPDIT
Ec   MKLLAKAPLNLRLAFEAAGRTGAFALAAESELELSPSAISHAIRKLENLLDYRLFQRSTREITLTKEGEILLEHIIQRFNELQQGL-ALVTADESAPLRLHTAPSFHQWLLPRLGKFIENPSTID
Consensus .....akllalaplRnirAFeaaarTqaialAAeel#isaSA!SHAakLEnll#krLFqRngre!TLTeeGEIILRe!qraineiqral.a$!nadenriLRlHsaPSFahqNL$rRLGKFrrenPdId

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ech  INLTCSYENLQFARDNIDIDIRHGIPDNDAYRVHTIKNERLKVMSPEYISKNPINHPEEILNHNLIYSSTLLANWDKWFSYCDIKYARPGFNLSDFRSYMSFEARRHGLGLILESSMHGEEFLKSGSLV
Ec   LRLSASTEARFEQDDFDLDIYVGEPRPSPYEKIPLAVEELTPLCSPQLAER--LKKPEDLYALTLIQCDVQLYQKQWFEANKMTPPN-NYGLRFDRSFMIAIAAVDGLGVVLESKLLAEREIASGKLV
Consensus irLsaStEnarFarD#iDiDirhGePrpdaYrkipianErLkp$aSP#Laer..inhPE#iIahnLIqcdtqLa#MdgWFeandikpar.n%NlrFDRS%MaiaAArdGLGL!LESk$aEreiasGkLV

261    270    280    290    300    307
|-----|-----|-----|-----|
Ech  -QVFPREFEYPVNAHHIYMPHINERTHKVKVVFIEWHRHELAIIDGYVL
Ec   CPLVNSTSEIHYIGHYLVFPQHMHMSALDVFKTALLNELNLGKIR
Consensus .qlfnrefEihynaHhiVnPh#erhhaldVFieW$rnELaidgir.

```

**Annexe 8 :** Alignement des séquences de la protéine PerR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle d'*E. coli* K12 (Ec). La séquence d'*E. chrysanthemi* 3937 présente 30% d'identité de séquence avec celle d'*E. coli*.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Ech	MSSHEASKLPLPSLRNIQAFLEVANTQSI	NVAREKLNITASAVSHQIATLEKFLNKKLFIRNGKGYL	TEHG---	EIYLRVSGAISIGRATDKMINESSNEILRVHSSPSFGMI	LMRRLGKFR	TLHP								
Bsu	MAAHEL-KEALETLKETGVRIIPQRRAILEYLVNSMAHPTADDIYK-ALEGGKFPNMSVATVYNNLRVFR	ESGLVKELTYGDASSRFDVTS	DHYHAI	CENCGKI	VD	FHY	PGL	DEVEQLAAHVTGFKVSHH						
Consensus	MaaHEa.KeaLesLr#iqarieparhaii#yaa#k\$ahpaaadihq.	AleeKFlnkklairnngrtl	lEhG...	Eitlr#aSgaidi!	grahdhaInEncneIlrfHspgl	deneqLaarl	lggFrt	lHh						
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Ech	DITINLTC	SYENLQFARDNIDIRHGIPDWDAYRVHTIKNERLKYMASPEYISKMPI	NHPEILNHNLIYSSTTLANWDKHF	SYCDIKYARPGFNLSFDRSYMSFEAR	MGLGLILESSMGE	EFLKSG								
Bsu	RLEIYGVCQEC	SKKENH												
Consensus	rieIngtCqecn	lqear	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	261	270	280	290	300	309								
Ech	SLVQVFPREFEYPVNAHHIVMPHINERTHKVKVFIEHMRHEL	AIDGYL												
Bsu														
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Annexe 9** : Aligement des séquences de la protéine PerR d'*E. chrysanthemi* 3937 (Ech) avec celle de *B. subtilis* (Bsu). La séquence d'*E. chrysanthemi* 3937 présente 15 % d'identité de séquence avec celle de *B. subtilis* (Bsu)

## Ferritins, bacterial virulence and plant defence

Aïda Boughammoura · Thierry Franza ·  
Alia Dellagi · Camille Roux ·  
Berthold Matzanke-Markstein ·  
Dominique Expert

Received: 12 September 2006 / Accepted: 28 November 2006  
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

**Abstract** The enterobacterial pathogen *Erwinia chrysanthemi* causes soft rot diseases on a wide range of plants, including the model plant *Arabidopsis thaliana*. This bacterium proliferates in the host by secreting a set of pectin degrading enzymes responsible for symptom development. In addition, survival of this bacterium *in planta* requires two high-affinity iron acquisition systems mediated by siderophores and protective systems against oxidative damages, suggesting the implication by both partners of accurate mechanisms controlling their iron homeostasis under conditions of infection. In this review, we address this question and we show that ferritins both from the pathogen and the host are subtly implicated in the control of this interplay.

**Keywords** *Erwinia chrysanthemi* · *Arabidopsis thaliana* · Siderophore · Oxidative stress · Iron homeostasis

A. Boughammoura · T. Franza · A. Dellagi ·  
C. Roux · D. Expert  
Laboratoire Interactions Plantes-Pathogènes,  
UMR 217 INRA/INA P-G/Université Paris 6,  
Paris 75005, France

D. Expert (✉)  
CNRS, 16 rue Claude Bernard,  
Paris 75005, France  
e-mail: expert@inapg.fr

B. Matzanke-Markstein  
Isotopes Laboratory, Institute of Physics,  
University of Luebeck, 23538 Luebeck, Germany

### Iron, virulence and immunity

The interaction between a pathogen and a host organism leads to a competitive relationship where both protagonists try to defeat each other. In plant as in animal hosts, a successful pathogen produces virulence factors enabling it to gain access to essential nutrients, to rapidly adapt to new environmental conditions and to overwhelm host defense. One strategy involved by bacterial pathogens to deal with the conditions imposed by the host during infection is the production of specific high-affinity iron transport systems and other factors such as toxins and hydrolytic enzymes, that respond to iron availability (for a review, see Crosa et al. 2004). Indeed, vertebrate hosts activate diverse mechanisms upon pathogen attack aimed at depriving the invader of nutritional iron (for a review, see Ong et al. 2006). For instance, by complexing iron into proteins of the transferrin family and scavenging it into ferritins, the host inhibits the growth of certain bacteria and fungi. The macrophage ferrous iron transporter NRAMP1 (SLC11A1) confers resistance to intracellular bacterial parasites possibly by extruding iron from the phagosomal vacuole to the cytoplasm. Increased expression of the iron regulatory peptide hepcidin during infection and inflammation leads to iron sequestration in enterocytes and macrophages and interrupts the delivery of iron in plasma. NGAL (neutrophil

gelatinase-associated lipocalin) is induced in epithelial cells during inflammation and binds catecholate type siderophores, thus preventing bacteria from acquisition of siderophore-bound iron. These antimicrobial mechanisms constitute the well known iron-withholding strategy and are considered as a part of the vertebrate innate immune system. Similar mechanisms in plant hosts could exist and we are currently investigating this question in *Erwinia chrysanthemi* infected *Arabidopsis* plants.

### Importance of iron in *Erwinia chrysanthemi* infection

*Erwinia chrysanthemi* strain 3937 (syn. *Dickeya datantii*, *Pectobacterium chrysanthemi*) is an enterobacterium representative of the pectolytic species which causes soft rot diseases on a wide range of plants, including vegetables and ornamentals of economic importance. In natural infections, *E. chrysanthemi* enters the aerial parts of a host plant, through wounds and natural openings. Experimental infections can be performed by inoculation of strain 3937 on diverse plant hosts, including chicory leaves, African violets (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.) and the model plant, *Arabidopsis thaliana*. Cytological examination of leaf of *Saintpaulia* or *Arabidopsis* plants revealed the occurrence of an asymptomatic phase that may last several days, during which bacterial cells colonize intercellular spaces of the cortical parenchyma and migrate within cell walls without severe injury of cellular structures. The symptomatic phase is consecutive to the bacterial production of pectinases, especially pectate lyases that, by degrading pectic components, progressively dissolve plant cell walls, enabling bacteria to gain access to nutrients and to disseminate within the leaf and petiole. Bacterial cells do not migrate in the vascular tissues. During this invasion process, the bacteria encounter various environmental conditions, of which iron availability and production of reactive oxygen species by the plant are two factors limiting their spread.

Analysis of the role of iron in the pathogenicity of *E. chrysanthemi* on *Saintpaulia* plants has

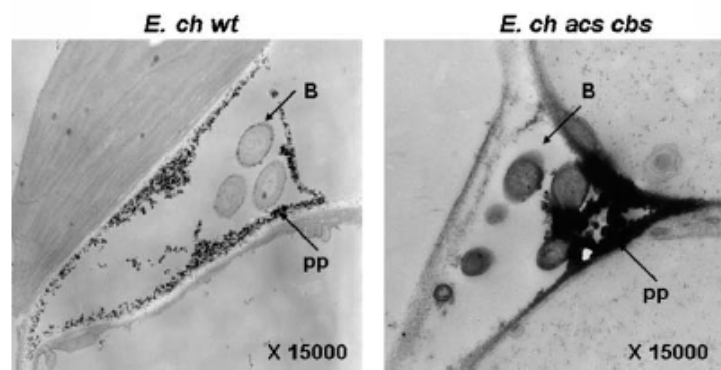
shown that during infection, this bacterium requires two high-affinity-iron uptake systems mediated by the siderophores, chrysobactin and achromobactin (for a review, see Expert 2005). Chrysobactin is a monocatecholate-type siderophore while achromobactin is a citrate derived compound that involves carboxylate or/and hydroxyl donor groups for iron binding. Double mutants deficient in achromobactin and chrysobactin production are impaired in symptom initiation because they have reduced survival in intercellular spaces of host tissues (Franza et al. 2005). Interestingly, electron microscopy examination of infected leaf of *Arabidopsis* plants treated with cerium chloride as an indicator of hydrogen peroxide production revealed that this oxidative burst from the plant is more intense after infection with a siderophore negative mutant than with the wild type strain (Fig. 1). This suggests that siderophores are not only required for bacterial iron nutrition but, as iron scavengers, also act as antioxidants. In addition, expression of the genes involved in chrysobactin/achromobactin mediated iron uptake and those encoding pectate lyases important for virulence is controlled by iron, via the Fur sensory/regulatory protein (Franza et al. 2002). Therefore, it seems that in the host, bacteria are able to express their virulence in relation to their iron requirements.

This plant–pathogen interaction illustrates the critical question of control of iron homeostasis in biological situations. Indeed, bacteria must accurately control their intracellular iron utilization and cope with changes in redox conditions (Santos et al. 2001). The question is do bacterial ferritins play a role in this context? The second point concerns the presence of bacterial siderophores *in planta* and their possible interference with the plant iron metabolism. Thus, we investigated whether plants control and modify their iron status in response to infection.

### What is the role of the *E. chrysanthemi* ferritin?

Analysis of the genome sequence of *E. chrysanthemi* 3937 (<https://asap.ahabs.wisc.edu/annotation/php/ASAPI.htm>) enabled us to identify four loci,



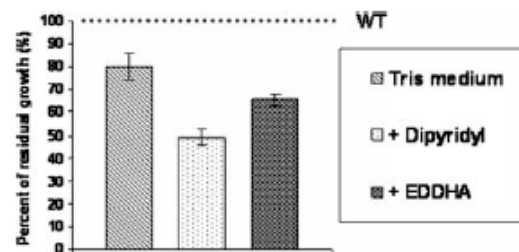


**Fig. 1** Localisation of  $H_2O_2$  accumulation in intercellular spaces of Arabidopsis leaf tissues colonized by *E. chrysanthemii* wild type (*E. ch wt*) or achromobactin and chrysobactin negative mutant (*E. ch acs cbs*) cells. Tissue samples were prepared for conventional electron microscopy, 24 h

post inoculation. The histochemical assay is based on the reaction of  $H_2O_2$  with cerium chloride to produce electron dense insoluble precipitates of cerium perhydroxides (Bestwick et al. 1997). B: bacterial cell; pp: precipitate

*ftnA*, *bfr*, *dps1* and *dps2* coding for a ferritin, a haem-containing bacterioferritin and two different DPS proteins (DNA protection during starvation), respectively. Storing iron in a non-reactive form in the cell is the role ascribed to ferritins. Ferritins are organized in a 24-subunit shell surrounding a central cavity, and owing to their ferroxidase activity, they oxidize excess of ferrous ions and store the ferric form in a bioavailable mineral core (for reviews, see Hintze and Theil 2006; Matzanke 1997). In several bacterial species, ferritins are able to insure protection against the oxidative damage initiated by iron and to serve as an iron reserve. However, there is still little information about the physiological role of bacterial ferritins and their contribution to the virulence of pathogens.

To investigate this question in *E. chrysanthemii*, we cloned the *ftnA* gene and constructed a *ftnA* null mutant by reverse genetics. The *E. chrysanthemii* *ftnA* gene encodes a protein of 169 amino acid residues that is 78.8% identical to the FtnA ferritin from *Yersinia pestis*. Under iron restricted conditions, the growth of the *ftnA* negative mutant is impaired compared to wild-type strain (Fig. 2), indicating that the intracellular iron level in the mutant is not sufficient to overcome iron deprivation. Growth properties of this mutant are affected in the presence of paraquat, a superoxide generating compound but not in the presence of hydrogen peroxide. The mutant has also an



**Fig. 2** Growth of the *ftnA* negative mutant under iron restricted conditions, compared to that of wild type strain. Tris medium is a low-phosphate minimal medium, that was supplemented with EDDHA or 2, 2'-dipyridyl as indicated, to give a final concentration of 80  $\mu$ M or 100  $\mu$ M respectively (Franza et al. 2005). Results correspond to the stationary phase of growth as measured by the absorbance at 600 nm. Experiments were carried out in triplicate and standard deviations are shown

increased sensitivity to streptonigrin that produces radicals in the presence of metal and oxygen and to nitric oxide-generating compounds. Interestingly, we found by Mössbauer spectroscopy, that the intracellular ferrous iron pool in the mutant is twice higher than in the wild-type (data not shown). Thus, as in *Campylobacter jejuni* (Wai et al. 1996), the FtnA ferritin in *E. chrysanthemii* can protect the cell against oxidative stress, which is not the case in *Escherichia coli* or *Helicobacter pylori* (Abdul-Tehrani et al. 1999; Bereswill et al. 1998).

Another point of interest is the positive regulation of the *E. chrysanthemi* *ftnA* gene by iron and Fur. This control is mediated by a small antisense RNA (RyhB-like, Gottesman 2005) able to pair with the 5' end of *ftnA* RNA thereby blocking *ftnA* gene translation/transcription (Fig. 3). Indeed, we observed that a transcriptional *ftnA::uidA* fusion is upregulated by addition of iron (Fig. 4), and in a *fur* background where RyhB RNA accumulates, the fusion is shut off (data not shown). In a  $\Delta$ *ryhB* mutant, *ftnA* gene transcripts accumulate to high levels compared to wild type strain (Fig. 4). Therefore, this situation seems to differ from that described in *E. coli* since the *E. coli* *ftnA* gene is not RyhB post-transcriptionally regulated. In *E. coli*, RyhB controls the expression of a number iron containing proteins including bacterioferritin (Bfr) and SodB (Massé et al. 2005).

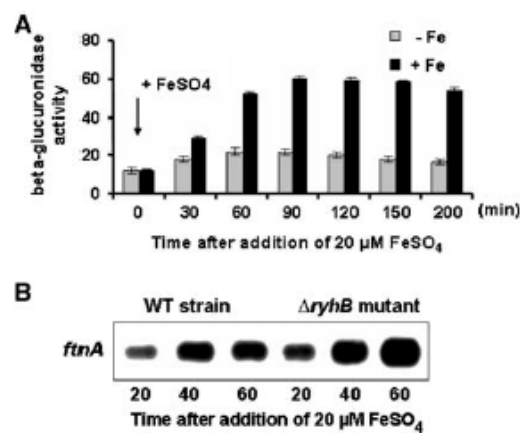
We analysed the pathogenic behavior of the *ftnA* mutant on chicory leaves and potted African violets, in comparison with wild type strain. On these two plants, the mutant displayed a delay in the appearance of symptoms. However, once the symptoms had appeared, their progression was the same for both strains. This delay is consistent

with the fact that the mutant has reduced iron stores and is more susceptible to oxidative conditions. Therefore, it seems that the ferritin confers on *E. chrysanthemi* cells, the capability to adapt to the conditions encountered in the host at the onset of infection. In *Helicobacter pylori*, the Pfr ferritin is essential for survival in the gastric mucosa, likely because it enables the bacterium to overcome toxicity of iron at low pH (Waidner et al. 2002).

#### *Arabidopsis* response to *E. chrysanthemi* infection: the role of Atfer1 ferritin in plant immunity

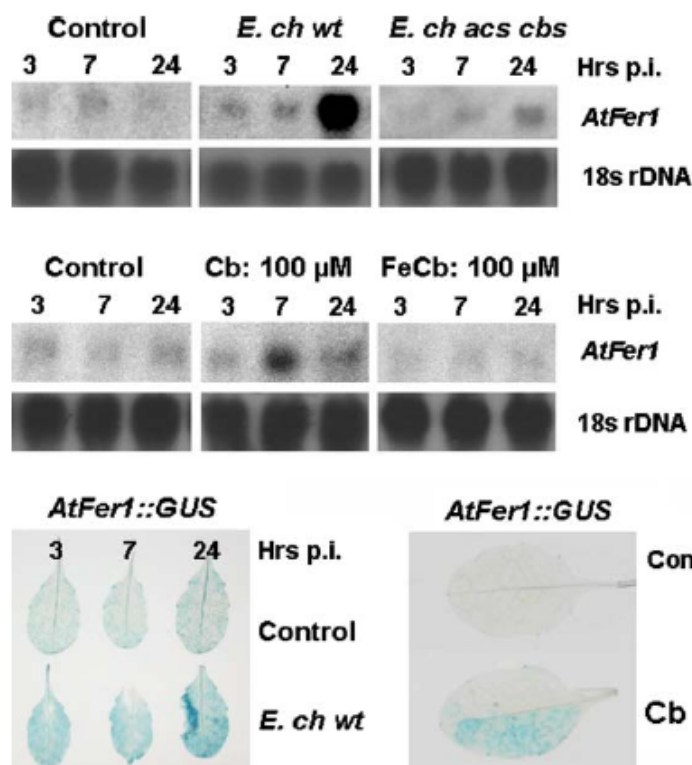
In the course of a cDNA differential screening between *Arabidopsis* infected or not by *E. chrysanthemi*, we pulled out a cDNA encoding a ferritin (*Atfer1*), indicating an upregulation of the *Atfer1* gene in response to infection. Ferritins are encoded by a four-member gene family in *Arabidopsis* (*Atfer1-4*) and are regulated at the transcriptional level (Petit et al. 2001a, b). *Atfer1* gene expression is stimulated in the presence of excess of iron, hydrogen peroxide or nitric oxide (Gaymard et al. 1996; Murgia et al. 2002; Petit et al. 2001a, b). To investigate whether *Atfer1* gene expression is a part of an iron-withholding defense system induced in response to bacterial invasion, we used an *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant line abolishing *Atfer1* gene expression. By comparing the susceptibility to infection of this line with the wild-type ecotype Col-0, we found that spreading of the symptoms is faster and the number of systemic infections is higher in the *atfer1* mutant line. This result indicates that the *Atfer1* gene is involved in a basal level of resistance of *Arabidopsis* to *E. chrysanthemi* (Dellagi et al. 2005).

Analysis of the *Atfer1* gene transcriptional activity after infection showed that this gene is highly expressed at 24 h post inoculation and this event is independent of the presence of IDRS (iron-dependent regulatory sequence), a cis acting element required for the *Atfer1* gene response to iron excess and nitric oxide. Interestingly, this upregulation does not occur after inoculation with an *E. chrysanthemi* siderophore negative mutant,



**Fig. 3** Transcriptional expression of the *ftnA* gene is regulated by iron and the small RNA RyhB. **A:** Time course expression of a chromosomal *ftnA::uidA* fusion in *E. chrysanthemi* cells grown in LB medium, supplemented with iron (+Fe), or not (-Fe). **B:** Northern blot analysis showing *ftnA* (transcripts) accumulation in the wild type strain and in a  $\Delta$ *ryhB* mutant, at different times (in mn) after supplementation by iron, as indicated





**Fig. 5** Transcriptional regulation of the *Atfer1* gene after infection of *Arabidopsis* by *E. chrysanthemii* wild type (*E. ch wt*) compared to achromobactin and chrysobactin negative mutant (*E. ch acs cbs*) cells or after infiltration with chrysobactin (Cb) compared to ferric chrysobactin (FeCb). Transcript accumulation was monitored by Northern blot analysis, using *Atfer1* gene as a radioactive probe

(top and middle panels). *Atfer1* promoter activity in response to wild type bacterial infection or to chrysobactin infiltration was observed in an *Arabidopsis* transgenic line containing 1400 bp of *Atfer1* promoter fused to the glucuronidase reporter gene (*Atfer1::GUS*) as indicated. Methods were described previously (Dellagi et al. 2005)

occupy. However, the role of bacterioferritin as a transient iron pool is still enigmatic. Associated to chloroplasts and mitochondria, ferritins in plants also play a pivotal role in iron and oxygen metabolism as highlighted by the number of environmental signals (iron, nitric oxide, hydrogen peroxide, the stress hormone abscisic acid, photoinhibition) to which ferritin encoding genes respond. We know that ferritin gene expression is also regulated by pathogen attack and elucidating the mechanisms by which this regulation takes place deserves our attention.

**Acknowledgements** Work in the Laboratory of Plant-Pathogen Interactions was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), project SPE 217-01. We are grateful to the Ministère des

Affaires Etrangères (Programme d'actions intégrées Procope) for supporting the collaboration between our two laboratories.

## References

- Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang Y-S et al (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* 181:1415–1428
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat J-F, Cellier F, Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. *J Biol Chem* 281:23579–23588
- Bereswill S, Waidner U, Odenbreit S et al (1998) Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 144:2505–2516

- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield J (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9:209–221
- Crosa JH, Mey AR, Payne SM (eds) (2004) Iron transport in bacteria. ASM Press, Washington, DC, pp. 199–434
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat J-F, Gaymard F, Expert D (2005) Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *Plant J* 43:262–272
- Expert D (2005) Genetic regulation of iron in *Erwinia chrysanthemi* as pertains to bacterial virulence. In: Barton LL, Abadia J (eds) Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Springer, pp. 215–227
- Flo TH, Smith KD, Sato S, et al (2004) Lipocalin 2 mediates an immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917–921
- Franza T, Mahé B, Expert D (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* 55:261–275
- Gaymard F, Boucherez J, Briat J-F (1996) Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochem J* 318:67–73
- Gottesman S (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *TRENDS Genet* 21:399–404
- Hintze KJ, Theil EC (2006) Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cell Mol Life Sci* 63:591–600
- Kachadourian R, Dellagi A, Laurent J, Bricard L, Kunesch G, Expert D (1996) Desferrioxamine-dependent transport in *E. amylovora*. CFBP 1430: cloning the gene encoding the ferrioxamine receptor FoxR. *BioMetals* 9:143–150
- Lanquar V, Lelievre F, Bolte S et al (2005) Mobilization of vacuolar iron by the AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* 24:4041–4051
- Massé E, Vanderpool Cs, Gottesman S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:6962–6971
- Matzanke B (1997) Iron storage in microorganisms. In: Winkelmann G, Carrano CJ (eds) Transition metals in microbial metabolism. Harwood Academic, pp 117–157
- Murgia I, Delledonne M, Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J* 30:1–10
- Ong ST, Ho JZS, Ho B, Ding JL (2006) Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 211:295–314
- Persmark M, Expert D, Neilands D (1989) Isolation, characterization and synthesis of chrysoferritin, a compound with a siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J Biol Chem* 264:3187–3193
- Petit J-M, Briat J-F, Lobreaux S (2001a) Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. *Biochem J* 359:575–582
- Petit J-M, Van Wuytswinkel O, Briat J-F, Lobreaux S (2001b) Characterization of an Iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. *J Biol Chem* 276:5584–5590
- Santos R, Franza T, Laporte M-L, Sauvage C, Touati D, Expert D (2001) Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:758–757
- Smith JL (2004) The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 30:173–185
- Wai SN, Nakayama K, Umene K, Moriya T, Amako K (1996) Construction of a ferritin deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol Microbiol* 20:1127–1134
- Waidner B, Greiner S, Odenbreit S et al (2002) Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonisation. *Infect Immun* 70:3923–3927

*Erwinia chrysanthemi* 3937 est une bactérie phytopathogène responsable de maladies de type pourriture molle sur une large gamme de plantes. Durant l'infection, les bactéries se disséminent de manière extracellulaire, au niveau de l'apoplasme des tissus aériens du végétal où elles doivent s'adapter à des conditions de stress oxydant et une faible disponibilité en fer. Comme cet élément est essentiel et paradoxalement génère des radicaux hydroxyles hautement toxiques via la réaction de Fenton, une régulation fine des quantités intracellulaires en fer est primordiale pour la bactérie. L'homéostasie du fer implique une classe de protéines dénommées ferritines qui séquestrent le fer sous forme non réactive et biodisponible notamment lorsque le métal devient limitant dans l'environnement. Le génome d'*E. chrysanthemi* 3937 comporte une centaine de gènes dédiés au métabolisme du fer dont 4 sont supposés être impliqués dans le stockage intracellulaire du fer : le gène *ftnA* codant une ferritine de type eucaryote, le gène *bfr* codant une bacterioferritine contenant des groupements hème et les gènes *dps1* et *dps2* codant deux protéines Dps (DNA-binding proteins from starved cells). L'inactivation de ces gènes a montré que la ferritine FtnA contribue principalement au stockage intracellulaire du fer. Le rôle des ferritines ne se limite pas à servir de réserves de fer intracellulaire : ainsi la protéine FtnA participe à la résistance au stress oxydant et la protéine Dps1 pourrait jouer un rôle dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. Conformément à leur rôle dans le stockage intracellulaire du fer, les gènes *ftnA*, *bfr* et *dps1* sont exprimés en réponse à la biodisponibilité en fer par la protéine Fur (Ferric uptake repressor), mais de manière temporellement différentielle au cours de la croissance bactérienne et selon des mécanismes distincts. Seule l'induction du gène *ftnA* par le fer et Fur est dépendante de l'ARN anti-sens RyhB. Par ailleurs, les gènes *bfr* et *dps1* sont induits en phase stationnaire de croissance par le facteur  $\sigma^S$ . Les travaux réalisés au cours cette thèse ont permis de caractériser les intervenants de l'homéostasie du fer chez *E. chrysanthemi* 3937, d'acquérir une vue globale du trafic intracellulaire du fer et d'en apprécier leur contribution respective dans la pathogénie.

**MOTS-CLES :** *Erwinia*, homéostasie du fer, ferritines, répresseur Fur, RyhB, pouvoir pathogène

---

### **Iron homeostasis in *Erwinia chrysanthemi* 3937**

The pathogenic enterobacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937 is able to cause soft-rot disease on a large set of plants. In the host, bacteria disseminate extracellularly and encounter an oxidative environment with low iron availability. Under these conditions, a tight control of the intracellular iron pool is important since excess of iron can exacerbate oxidative stress by generating the highly toxic radical  $\text{OH}^\circ$  through the Fenton's reaction. Iron homeostasis involves ferritins which sequester iron under a non reactive state. These iron stores can be used to enhance bacterial growth when external iron supplies are restricted. The genome of *E. chrysanthemi* 3937 presents a hundred of genes involved in iron metabolism including four loci that could be devoted to iron storage : the *ftnA* gene encoding an eukaryotic type haem-free ferritin, the *bfr* gene coding for a haem-containing bacterioferritin and, the *dps1* and *dps2* genes encoding two Dps proteins (DNA-binding proteins from starved cells). Our work is aimed at elucidating the role of these proteins in iron homeostasis and pathogenicity of *E. chrysanthemi* 3937. According to their differential role in iron storage, the *ftnA*, *bfr* and *dps1* genes appeared to be controlled differently by iron and Fur (ferric uptake regulator). Only the iron and Fur-induction of *ftnA* gene is dependent of the small antisens RyhB RNA. Moreover, the *dps1* and *bfr* genes are regulated by additional effectors including the  $\sigma^S$  transcription factor. Disruption of the *ftnA*, *bfr* and *dps1* genes showed that FtnA is the main cellular component involved in iron storage. However, these ferritins are not only involved in iron storage : FtnA contributes to oxidative stress resistance and Dps1 could be implicated in hydrogen peroxide detoxication through its ferroxidase center. The implication of these proteins to bacterial virulence is also discussed.

**KEY-WORDS :** *Erwinia*, iron homeostasis, ferritins, Fur repressor, RyhB, pathogenicity

---

**DISCIPLINE ( Orsay ) : Biologie**

**SPECIALITE : Phytopathologie – Microbiologie**

Laboratoire des Interactions Plantes-Pathogènes -UMR 217 INRA, INAPG, UPMC-  
16 rue Claude Bernard 75005 Paris, France