Ingénierie de la voie de biosynthèse du sidérophore chez *Pseudomonas* pour la production de pyoverdine fonctionnalisée

Mémoire présenté par

MATHIEU Sébastien

Encadré par Dr. Coraline RIGOUIN

Université de Lorraine – Master 2 Microbiologie

Orientation RIM

Stage effectué du 7 janvier au 31 juin 2019

Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

CNRS UMR7242 BSC - ESBS - 300 Bd Sébastien Brant - CS 10413

67412 ILLKIRCH cedex

Remerciements

Je tiens à remercier M. Jean-Luc Galzi de m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire au cours de ce stage. Je tiens également à remercier Mme. Isabelle Schalk et M. Gaëtan Mislin pour m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche.

Je remercie tout particulièrement ma tutrice, Coraline, qui m'a permis de participer à son tout premier projet de recherche dans cette équipe, pour toutes les compétences qu'elle m'a permis d'acquérir et pour sa sympathie au quotidien.

Je remercie également Anne, Valérie, Véronique, Vincent, Pierre et Françoise pour leur expertise et leur gentillesse. Je remercie Quentin avec qui j'ai eu l'honneur de partager une paillasse.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe de la cafétéria, avec qui j'ai parlé de tout et n'importe quoi (et surtout de n'importe quoi), pour leur soutien et pour tous les beignets aux chocolats engloutis : Anne, Gwen, Sébastien (la version un peu plus vieille), Sarah, Agathe et Joshua.

Table des matières

Abréviations 7

Présentation de la structure d'accueil 11

1. Présentation générale de l'Unité 11
2. Les axes de recherches de l'équipe « Métaux et microorganismes » 13

Etat de l'art 15

1. Introduction 15
2. Les NRPS : des synthétases aux produits divers 15
   2.1. La structure des NRPS 17
   2.2. La diversité des NRPS chez les bactéries 17
3. Ingénierie des systèmes NRPS 19
   3.1. Le « domain swapping », la substitution du domaine d'adénylation 19
   3.2. La modification du substrat par ingénierie enzymatique 21
   3.3. Incorporation d'acide aminés non naturels dans systèmes NRPS 21
4. Les pyoverdines : Biosynthèse, régulation et applications 23
   4.1. Les applications de la pyoverdine 25
   4.2. La biosynthèse de la pyoverdine PVDI produite par *P. aeruginosa* 27
5. Les objectifs de mon stage 29

Matériels et méthodes 31

1. Matériel biologique 31
2. Biologie moléculaire 31
   2.1. Extraction d'ADN 31
   2.2. Extraction d'ARN 33
   2.3. Amplification d'ADN par PCR 35
   2.4. Digestions enzymatiques 35
   2.5. Electrophorèse d'ADN 35
   2.6. Purification d'ADN 37
   2.7. Séquençage 37
3. Transformation bactérienne 37
4. Conjugaison triparentale 39
5. Clonages pour la substitution du promoteur de *pvdS* 41
   5.1. Design des amorces 41
   5.2. Clonage par digestion/ligation 41
   5.3. Clonage par InFusion™ 43
6. Mutagénèse de *pvdD* 43

6.1. Analyse in silico 43
6.2. Mutagenèse in vitro 43
7. Suivi de la production de pyoverdine au cours du temps 45
7.1. Par culture cellulaire au TECAN™ 45
7.2. Par culture cellulaire en Falcon™ 45
7.2. Par l'analyse de la transcription de *pvdS* 47
8. Purification de la pyoverdine 47
Résultats 49
1. Conception d'une souche châssis pour la surproduction de pyoverdine 49
1.1. Preuve de concept : Surproduction de PVD1 chez *P. aeruginosa* PAO1 49
1.2. Conception d'une souche châssis chez *P. putida* KT2440 55
2. Modification de la spécificité de PVDD pour son substrat 61
2.1. Développement de la stratégie par analyse bio-informatique 63
2.2. Introduction des mutations dans le chromosome 65
Discussion et perspectives 67
1. Concevoir une souche châssis 67
2. Fonctionnalisation de la pyoverdine 71
Annexe 1 : Amorces utilisees dans ce travail chez la souche PAO1 76
Annexe 2 : Amorces PCR utilisées dans ce travail pour la souche KT2440 77
Annexe 3 : Autres amorces utilisées dans ce travail 78
Annexe 4 : Carte du plasmide « PA_P_{BAD} » 79
Annexe 5 : Carte du plasmide « PA_P_C » 80
Annexe 6 : Evolution de la production de PVD chez PAO1 sauvage et PA_P_{BAD} 81
Annexe 7 : Evolution de la production de PVD chez PAO1 sauvage et PA_P_{BAD} 82
Annexe 8 : Evolution de la production de PVD par KT2440 sauvage et PP_P_{BAD} 83
Annexe 9 : Evolution de la production de PVD par KT2440 sauvage et PP_P_{BAD} 84
Annexe 10 : Alignement des domaines A de PA1221, DhbF et PvdD 85
Références 86
Webographie 89

ABREVIATIONS

A : Domaine d'adénylation

A, Ala : Alanine

ADN : Acide désoxribonucléique

ADNc : Acide désoxiribonucléique codant

AMP : Adénosine Monophosphate

A400/A600 : Rapport de la production de pyoverdine sur la densité cellulaire

araC/P_{BAD} : Promoteur inductible à l'arabinose, régulation par AraC

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

C : Domaine de condensation des NRPS

$CaCl_2$: Chlorure de calcium

Ch : Chloramphénicol

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

ESBS : Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

F, Phe : Phénylalanine

Gm : Gentamycine – Gm^R : Résistant à la gentamycine

G, Gly : Glycine

HCl : Acide chloridrique

His-Tag : Succession de 6 résidus histidine

I : Isoleucine

K_2HPO_4 : Dipotassium phosphate

Kan : Kanamycine – Kan^R : Résistant à la kanamycine

$MgSO_4$: Sulfate de magnésium

MT : Marqueur de taille

NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthétase (Synthétase à peptides non ribosomiques)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pc : Promoteur des cassettes d'integrons de classe I

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PDB : Protein Data Bank

PgGly : Propargylglycine

PPtase : Phosphopantéthéinyl transférase

PVD : Pyoverdine

qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

rpm : Rotation par minute

T : Domaine de thiolation des NRPS

Tm : Température d'hybridation

TE : Domaine thioéstérase des NRPS

UMR : Unité Mixte de Recherche

UMS : Unité Mixte de Service

V, Val : Valine

W, Trp : Tryptophane



Figure 1 - L'UMR - 7242 est hébergée dans les locaux de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS), 300 Bd Sébastien Brant, 67412 Illkirch.

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

1. Présentation générale de l'Unité

L'UMR 7242 « Biotechnologie et signalisation cellulaire » est une unité mixte de recherche entre le Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) et l'Université de Strasbourg. Elle est hébergée dans les locaux de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS – Figure 1). Regroupant une centaine de chercheurs, d'enseignants-chercheurs, de doctorants, d'ingénieurs, de techniciens et de personnels administratif, son objectif est de décoder certaines voies de signalisation cellulaire dans le but de développer de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques. Ce travail se scinde en deux axes principaux :

- *L'étude des voies de protection de l'intégrité du génome : mécanismes épigénétiques, transcriptionnels et de réparation de l'ADN, ainsi que leur dérégulation dans les cancers.*
- *L'étude des voies de communication à la membrane cellulaire par la compréhension de leur importance dans les processus de douleur, d'inflammation et de pathogénicité.*

Différentes approches sont abordées au sein de l'unité comme la génomique fonctionnelle et structurale, la chimie biologique, ainsi que l'ingénierie biologique. Pour cela, l'unité possède de nombreux plateaux techniques. Un partenariat existe par exemple avec la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS, UMS 3286), le premier plateau européen entièrement publique permettant le criblage haut-débit de molécules bioactives pour la découverte de nouveaux médicaments. Plusieurs équipes forment l'unité, dont celle qui m'accueille durant ce stage, marquée en gras (Organigramme disponible - Figure 2) :

- Equipe Poly (ADP-ribosyl)ation et intégrité du génome
- Equipe Signalisation nucléaire et cancer
- Equipe Dynamique du réplisome et cancer
- Equipe Intervention chémobiologique
- Equipe régulation épigénétique de l'identité cellulaire
- Equipe RCPGs, douleur et inflammation
- **Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications**
- Equipe neuroimmunologie et thérapie peptidique.

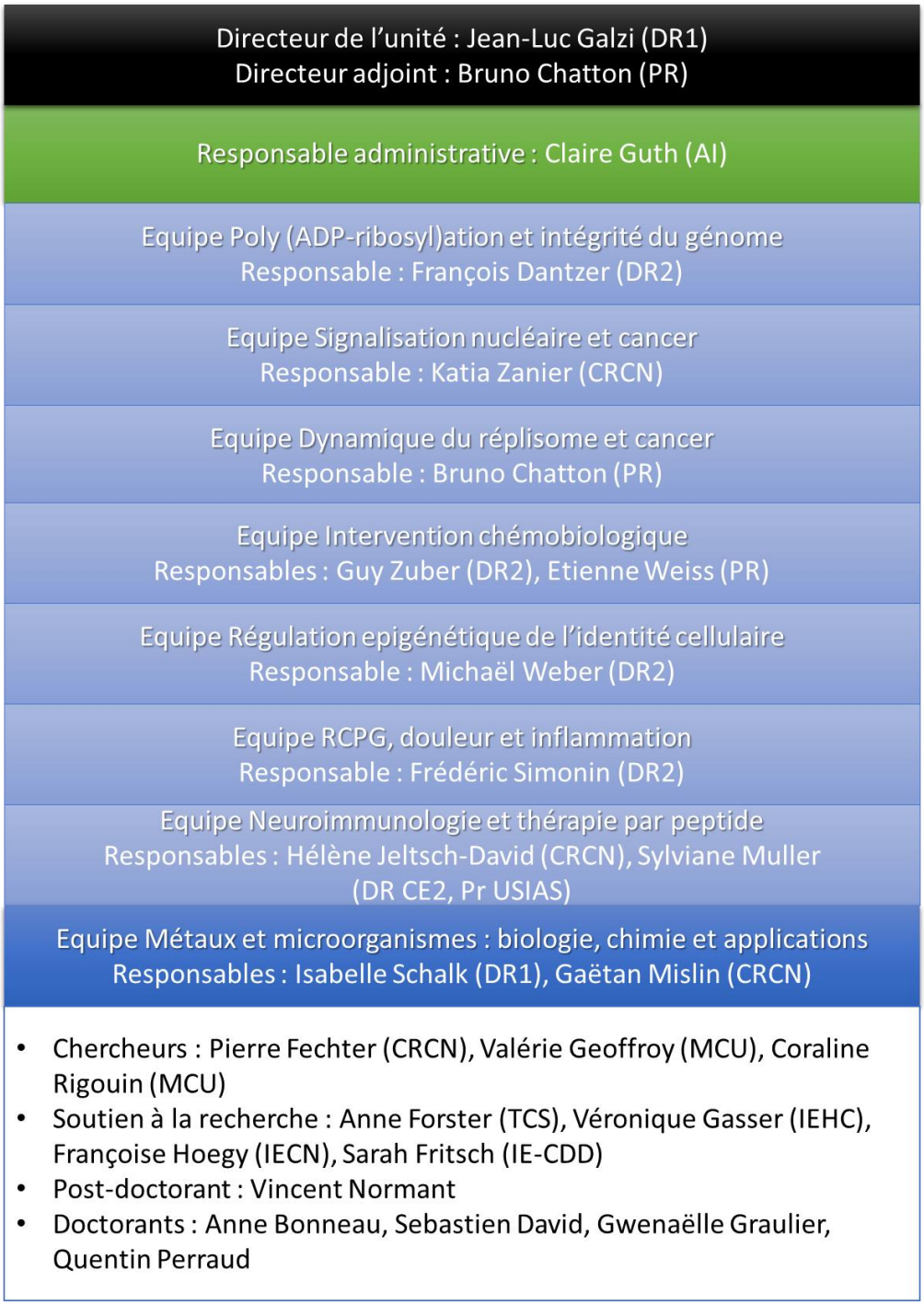


Figure 2 - Organigramme de l'UMR – 7242 et présentation de l'équipe « Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications ».

2. Les axes de recherches de l'équipe « Métaux et microorganismes »

L'équipe « Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications », codirigée par I. Schalk et G. Mislin, focalise ses travaux sur l'homéostasie du fer chez les bactéries, en particulier du genre *Pseudomonas*. Sa particularité est d'effectuer un travail multidisciplinaire assuré par des microbiologistes, biochimistes, biologistes moléculaires et chimistes organiciens. Le premier axe de recherche est la compréhension des mécanismes d'assimilation du Fer chez *Pseudomonas* : les protéines impliquées, leur organisation, et la régulation de leur expression. L'équipe concentre cette étude aux chélateurs de Fer (III) produits par les bactéries, les sidérophores. Ce sont des métabolites secondaires produits par la bactérie dans le cytoplasme, exportés dans le milieu extracellulaire, puis importés une fois le fer chélaté via des systèmes de transports supposés sélectifs. Les autres axes de recherches découlent de la compréhension de ces mécanismes : il s'agit de développer les applications possibles des sidérophores du genre *Pseudomonas*. La première est l'utilisation des propriétés chélatrices des sidérophores dans les procédés de bioremédiation d'effluents liquides, de sols contaminés en métaux lourds, et autres. La seconde est le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre un organisme pathogène opportuniste, *P. aeruginosa*. Il est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales et est fréquemment impliqué dans des infections létales chez les patients atteints de mucoviscidose. De ce fait, deux objectifs y sont sous-jacents, en partie financés par l'association « *Vaincre la mucoviscidose* » : (i) synthétiser des inhibiteurs de protéines impliquées dans le transport du Fer, (ii) développer des conjugués sidérophores-antibiotiques qui permettent de tuer ou d'inhiber la croissance de bactéries imperméables à l'antibiotique en parasitant les voies d'assimilation du fer (Stratégie du « Cheval de Troie »). Ma tutrice, C. Rigouin, vient d'intégrer l'équipe pour développer l'ingénierie bactérienne et des approches de biologie synthétique autour de ces sujets.

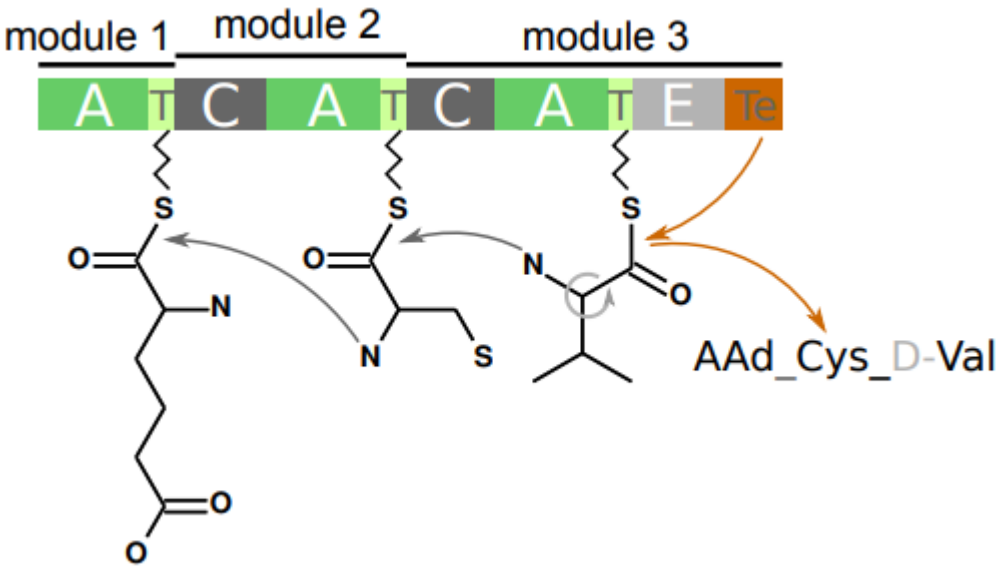


Figure 3 - Schématisation d'une NRPS (exemple de l'ACV (δ-(L-α-aminoadipoyl)- L-cysteinyl-D-valine). L'ACV, composée de trois modules, intervient dans synthèse de la Pénicilline par *Penicillium notatum*. Les substrats sont reconnus par le domaine d'adénylation (A), puis sont fixés de manière covalente à l'enzyme sur le domaine de thiolation (T). Le domaine de condensation (C) permet de former les liaisons peptidiques entre les substrats. Le domaine thioestérase (TE) libère la molécule formée de la synthétase. Ici, un domaine d'épimérisation (E) modifie l'isomérie du substrat du module 3. Le module 1 est le module d'initiation, le module 3 est celui de terminaison. D'après Pupin, 2013.

ETAT DE L'ART

1. Introduction

L'étude des synthétases à peptides non ribosomiques, ou NRPS (« Non Ribosomal Peptide Synthetase »), représente un enjeu majeur de la recherche actuelle. Ce sont des enzymes qui assurent la synthèse de métabolites structurellement complexes et aux fonctions variées au sein des organismes vivants. Antibiotiques, chélateurs de métaux ou biosurfactants, les produits de ces NRPS ont démontré leur intérêt en biotechnologie et la pénicilline en est l'exemple le plus connu (Kries, 2016). Ces dernières décennies, de grandes avancées ont permis de déchiffrer leurs mécanismes enzymatiques. Les NRPS présentent une activité qui se résume schématiquement à une ligne d'assemblage : les enzymes sont divisées en plusieurs modules qui reconnaissent un acide aminé et l'incorporent dans la molécule en cours de synthèse grâce à plusieurs domaines enzymatiques (Figure 3). Certains de ces domaines peuvent modifier le substrat à incorporer par cyclisation, épimérisation, et autres. Grâce à cette compréhension, de nombreuses stratégies d'ingénierie ont émergé. L'inversion ou la modification de ces briques élémentaires pourrait permettre la modification des séquences peptidiques produites par les NRPS. L'intérêt est d'obtenir une synthèse *de novo* de peptides utiles en biotechnologie, moins coûteuse qu'une synthèse peptidique sur support solide. Par exemple, la maîtrise de ces outils permettrait d'incorporer à la synthèse de métabolites des acides aminés non naturels. Ces derniers leur confèreraient des propriétés physico-chimiques intéressantes qui amélioreraient leur rendement de purification, leur activité thérapeutique ou leur conjugaison avec d'autres molécules.

2. Les NRPS : des synthétases aux produits divers

Chez les bactéries, deux voies de synthèse peptidique existent et répondent à des attentes différentes. La première est la voie ribosomale : elle assure la synthèse d'un grand nombre de peptides en utilisant un nombre limité de substrats. La seconde a une stratégie inverse. Elle permet la synthèse de peptides complexes et qui sont souvent spécifiques de l'espèce. Cette voie utilise les enzymes NRPS. Présentées de manière très simplifiées, elles s'apparentent à une ligne d'assemblage.

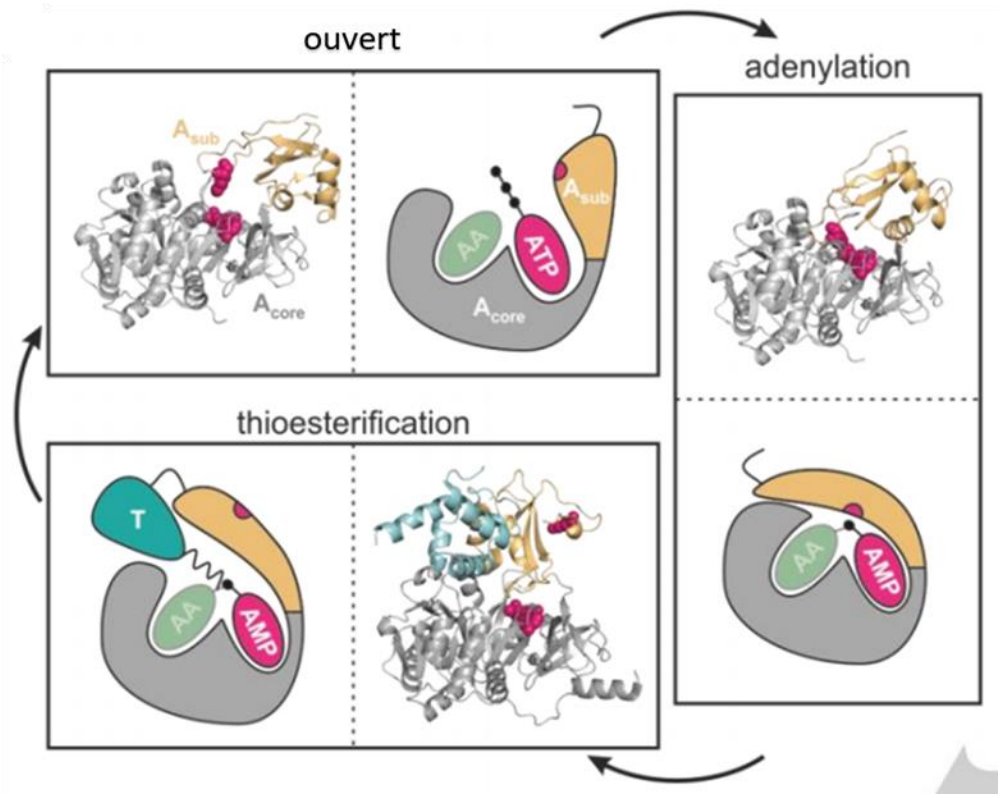


Figure 4 - Schématisation de l'activité enzymatique d'un domaine d'adénylation (synthétase de Gramicidine LgrA (PBD : 5ES5 et 5ES8)). Le domaine est composé d'un sous-domaine C-terminal (A_{sub}) et un sous-domaine N-terminal (A_{core}). Une fois les substrats reconnus, leurs conformations changent permettant au site actif de l'enzyme (en rouge) d'amorcer la réaction d'adénylation. Le domaine T du module fixe le produit sur son bras Phosphopantéthéine par thioestérification. Cela induit un nouveau changement conformationnel des sous-domaines menant au complexe ouvert initial. D'après Kries and Stanišić, 2019.

2.1. La structure des NRPS

Les NRPS sont généralement organisées en trois types de modules : un module d'initiation, des modules d'élongation, et un module de terminaison. Chaque module permet l'incorporation d'un acide aminé dans la chaine peptidique (Figure 3). Il existe trois types de NRPS selon la stratégie d'assemblage : les linéaires, les itératifs et les non linéaires :

- Les **linéaires** possèdent des modules qui chacun à leur tour, apportent leur substrat à la chaîne peptidique.
- Les **itératifs** ont un ou plusieurs modules qui sont utilisables à plusieurs reprises pour la synthèse du peptide.
- Les **non linéaires** sont caractérisés par une ligne d'assemblage discontinue : l'ordre d'apparition des modules dans la synthétase ne correspond pas à l'enchaînement des substrats dans le métabolite final.

L'incorporation des substrats se fait par différents domaines enzymatiques, dits principaux, inclus dans le module : (i) un domaine d'adénylation (A) capable de reconnaitre et d'activer un acide aminé, (ii) un domaine de thiolation (T) fixant l'acide aminé activé par le site d'adénylation, (iii) et un domaine de condensation (C) qui forme les liaisons peptidiques entre les acides aminés portés par les domaines de thiolation (Figure 3). Il est à noter que le module d'initiation ne possède pas de domaine de condensation. Le module de terminaison possède un domaine thioéstérase (TE) qui libère le peptide de la synthétase. Le domaine T est activé par l'enzyme Phosphopantéthéinyl transférase (PPTase) qui catalyse l'ajout d'un groupement prosthétique phosphopantéthéine à partir du coenzyme A sur un résidu sérine (Payne *et al*, 2017 ; Calcott and Ackerley, 2014).

2.2. La diversité des NRPS chez les bactéries

Les peptides issus de la synthèse non ribosomale sont souvent impliqués dans des fonctions biologiques permettant la survie de l'organisme producteur dans un environnement particulier. Cela peut être la production d'antibiotiques comme la Gramicidine ou la Pénicilline, celle de toxines ou de chélateurs de fer, les sidérophores (Martínez-Núñez and López, 2016). Ces multiples fonctions sont obtenues grâce à une diversité structurale importante. Les NRPS incorporent en effet, en plus des acides aminés standards, des acides aminés non protéinogènes ou modifiés mais aussi d'autres types de substrats comme des acides carboxyliques et des acides gras (Walsh *et al*, 2013).

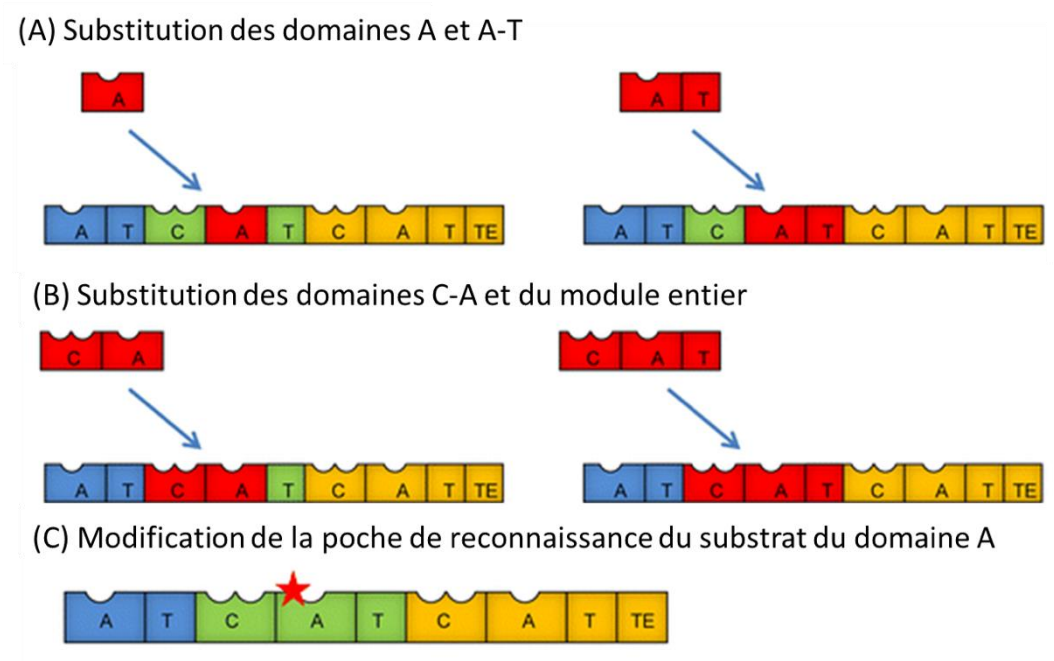


Figure 5 – Stratégies d'ingénierie des NRPS permettant la modification de la reconnaissance du substrat – A : Substitution du domaine A, ou « domain swapping » par un autre, avec ou sans le domaine T. B : Substitution du domaine A, ou « domain swapping » couplée au domaine C associé, ou au module entier. C : Modification du site de fixation du substrat par mutagénèse ciblée dans le domaine A. D'après Calcott and Ackerley, 2014.

3. Ingénierie des systèmes NRPS

Les systèmes NRPS ont nourri un grand intérêt en ingénierie. Cela se justifie par la diversité des produits et par la variété de leurs applications. De grandes avancées ont été réalisées dans la compréhension de leurs mécanismes, notamment grâce à l'obtention de structures tridimensionnelles de domaines enzymatiques (Conti *et al*, 1997 ; Mitchell *et al*, 2012 ; Ye *et al*, 2013). Cela a facilité le développement de stratégies d'ingénieries pour créer plus de diversité. Ces dernières se scindent en deux approches : l'ingénierie métabolique et l'ingénierie enzymatique.

Dans la première, la combinaisons de plusieurs synthétases issues de voies différentes au sein d'un même opéron permet, par expression hétérologue, d'obtenir de nouvelles molécules. Cleto and Lu, en 2017, ont par exemple associé des synthétases de l'entérobactine, un sidérophore, et de la vancomycine, un antibiotique, ce qui a permis d'obtenir des peptides variés dont l'intérêt thérapeutique est encore à démontrer.

L'approche par ingénierie enzymatique se focalise sur les modules et les domaines des NRPS. L'objectif est d'introduire des mutations de façon ciblée ou non dans leurs séquences codantes. L'essentiel de la recherche se concentre sur l'ingénierie du domaine A qui est responsable de la reconnaissance et de la spécificité de substrat (Kries, 2016). Il a été estimé que plus de 500 acides aminés différents peuvent être recrutés par ces derniers (Walsh *et al*, 2013) et que certains domaines ont une permissivité pour plusieurs acides aminés (Baumgart *et al*, 1991 ; von Döhren *et al*, 1997 ; Kurmayer *et al*, 2001). De nombreuses études ont par ailleurs décrit l'activité enzymatique de ce domaine (Kries and Stanišić, 2019 - Figure 4). De ce fait, des stratégies émergent pour modifier leur spécificité : (i) la substitution d'un domaine A par un autre, ou « domain swapping », (ii) la modification du site de reconnaissance du substrat par mutagénèse ciblée (Figure 5).

3.1. Le « domain swapping », la substitution du domaine d'adénylation

Le « domain swapping » consiste en la substitution du domaine A associé ou non au domaine T correspondant par un autre, ce qui permet la substitution d'un résidu dans la chaîne peptidique formée. Cette méthode a permis le remplacement d'un acide aspartique en asparagine dans la voie de biosynthèse de la surfactine chez *Bacillus subtilis* (Eppelmann *et al*, 2002). Cependant, elle fournit généralement un rendement minime, voir des peptides tronqués. Cela peut être expliqué par une interaction tertiaire et quaternaire non optimale entre les domaines C natifs et les domaines A ou A-T substitués (Calcott and Ackerley, 2014, Figure 5).

Il a été démontré, notamment sur la voie de biosynthèse de la pyoverdine, que quelques mutations obtenues par évolution dirigée peuvent permettre de restaurer cette coordination (Owen *et al*, 2016 ; Fischbach *et al*, 2007). L'objectif de l'évolution dirigée est de générer de la diversité par la conception d'une banque de mutants, puis de cribler *in vitro* ou *in vivo* les variants pour l'activité recherchée. Une étude menée par Calcott *et al* en 2014 sur la même voie de biosynthèse a démontré qu'une substitution du module entier est plus efficace que la seule substitution du domaine d'adénylation. De même, une substitution du domaine A du module d'initiation, qui ne possède pas de domaine C, est une autre stratégie contournant les problèmes observés (Linne *et al*, 2001). Le « Domain Swapping » ne permet pas cependant d'intégrer à la voie de biosynthèse des acides aminés non naturels. Pour cela, d'autres méthodes sont utilisées.

3.2. La modification du substrat par ingénierie enzymatique

Conti *et al*, en 1997 ont été les premiers à obtenir une structure cristallisée d'un domaine A, celui du module d'initiation PheA de la Gramicidine S complexé aux substrats L-Phe et AMP. Ces données structurales nouvelles ainsi qu'un alignement avec 24 séquences d'autres domaines d'adénylation ont démontré la présence de motifs très conservés. Ainsi, Stachelhaus *et al*, en 1999 ont identifié 8 résidus clés, ou signatures, impliqués dans la spécificité du substrat. Ils se situent dans un rayon de 5,5 Å autour du site de fixation. Cela a permis l'établissement d'un code, nommé Stachelhaus, permettant la prédiction des substrats de domaines A. Depuis, des approches par apprentissage profond à partir d'un jeu de données plus important (Rausch *et al*, 2005 ; Minowa *et al*, 2007) ont permis d'améliorer cette prédiction et de développer des outils bio-informatiques associés (antiSMASH : https://antismash.secondarymetabolites.org/, un exemple de programme d'annotation de NRPS). La modification de ces acides aminés signatures permet de modifier la spécificité d'un domaine A pour un substrat, notamment pour y incorporer des acides aminés non naturels (Calcott and Ackerley, 2014 ; Kries *et al*, 2014).

3.3. Incorporation d'acide aminés non naturels dans systèmes NRPS

L'incorporation de groupements fonctionnels dans les peptides peut s'effectuer de trois manières : (i) l'approche « Bio-Chem » qui ajoute le groupement souhaité sur le peptide purifié, (ii) l'approche « Chem-Bio » où l'on apporte à la synthétase un substrat/précurseur modifié, comme un acide aminé non naturel, (iii) et l'approche « Bio-Chem-Bio » où l'on modifie génétiquement le domaine de reconnaissance du substrat pour que la synthétase puisse *in vivo* incorporer un acide aminé non naturel que l'on apporte (Goss *et al*, 2012).

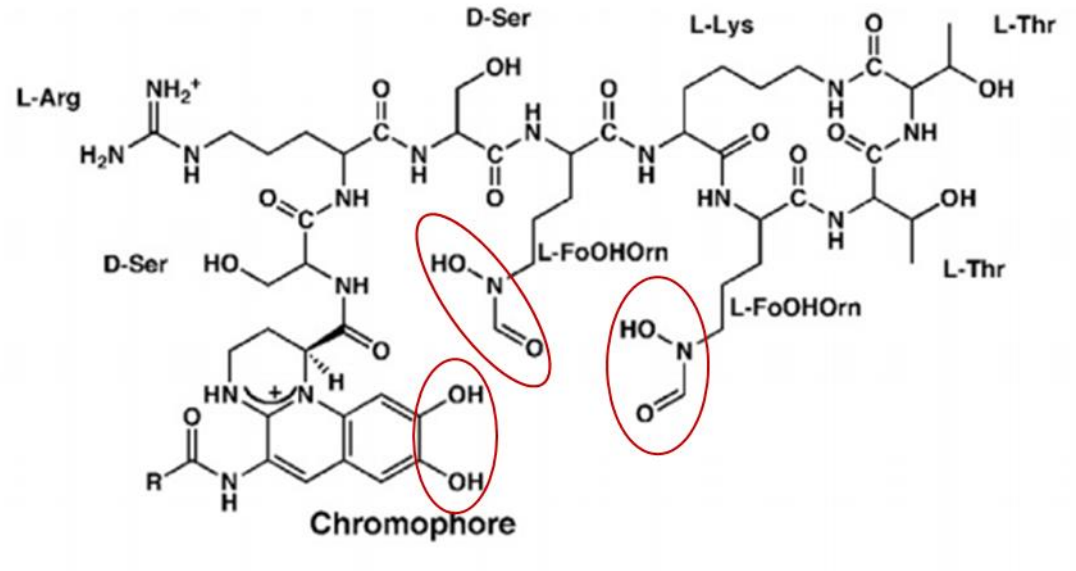


Figure 6 - Structure de la pyoverdine PVDI produite par *P. aeruginosa* PAO1. Les fonctions bidentates chélatant le fer sont entourés en rouge (Yeterian *et al*, 2009).

La seconde approche « Chem-Bio » utilise la flexibilité des domaines A pour la reconnaissance du substrat. Par simples supplémentations en acides aminés dans le milieu de culture de l'organisme étudié, certains domaines A ont montré une permissivité à plusieurs acides aminés. Les conditions de cultures ont notamment eu un rôle dans ce phénomène (Baumgart *et al*, 1991 ; Van Döhren *et al*, 1997 ; Kurmayer *et al*, 2001). Une étude a aussi montré que la voie de biosynthèse de la Pacidamycine peut incorporer des fluorophénylalanines ou des halo- et méthyltryptophanes (Grüschow *et al*, 2009).

L'incorporation d'acides aminés non naturels par ingénierie via l'approche « Bio-Chem-Bio » a déjà été reportée à plusieurs reprises dans la littérature. Dans le domaine A du module PheA incorporant une phénylalanine de la Gramicidine S, Kries *et al* sont parvenu en 2014 à insérer *in vitro* de l'O-propargyl-Tyr, un acide aminé non naturel possédant un groupement alcyne très réactif. Cela a été réalisé par une simple mutation dans le site de fixation du domaine qui substitue un résidu tryptophane par un résidu sérine. Thirlway *et al* en 2012 ont également réussi par une unique substitution à incorporer la (2S,3R)-3-methyl glutamine dans le module 10 du NRPS CdaPS3.

4. Les pyoverdines : Biosynthèse, régulation et applications

Grâce à ses propriétés oxydoréductrices, le fer intervient dans une grande variété de réactions métaboliques et pour diverses fonctions allant de la phosphorylation oxydative à la synthèse des acides nucléiques. Cependant, le fer est très peu biodisponible pour les bactéries aérobiques. Cela s'explique par une oxydation rapide de ce dernier formant des précipités insolubles et par la compétition que les bactéries rencontrent lorsqu'elles colonisent un hôte. La production des sidérophores est l'une des stratégies permettant à la bactérie de subvenir à ses besoins en fer. Ils sont exportés dans le milieu extracellulaire où ils chélatent le métal puis sont réincorporés dans la cellule *via* des récepteurs membranaires spécifiques TonB dépendants. Le laboratoire s'intéresse à la pyoverdine, un sidérophore fluorescent issu des bactéries du genre *Pseudomonas*. Outre leur rôle naturel dans la capture du fer, les pyoverdines sont utilisées pour de nombreuses applications en médecine et en biotechnologie. Leur structure chimique possède une fonction catéchol et deux fonctions hydroxamates, des fonctions bidentates qui permettent de chélater efficacement le Fer (III) hexacoordiné en stœchiométrie 1:1 (Figure 6).

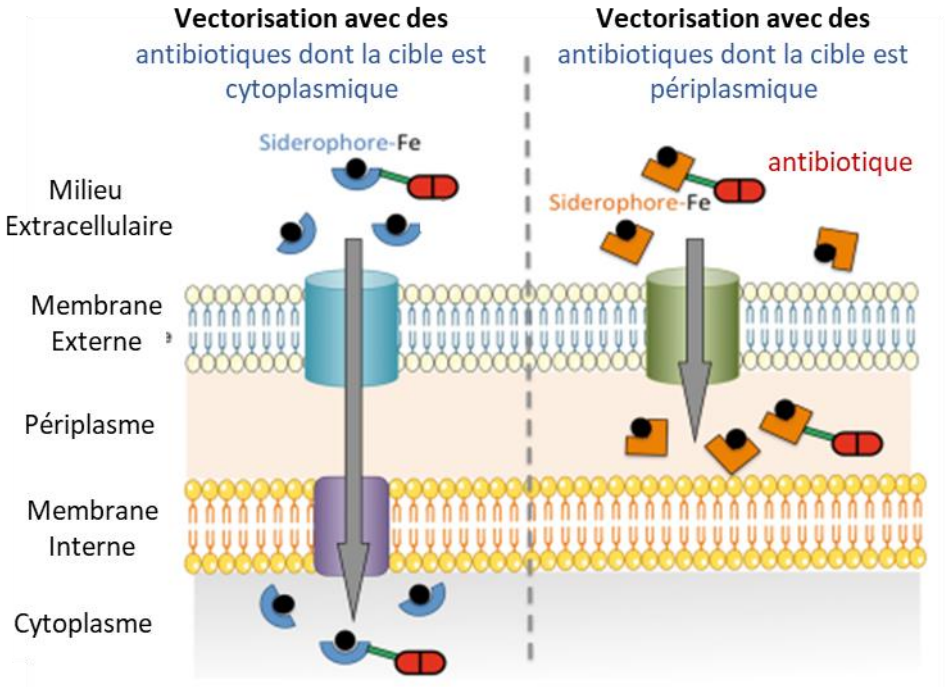


Figure 7 – Schématisation de la stratégie du « Cheval de Troie ». La paroi cellulaire des bactéries Gram négative est composée d'une membrane externe et d'une membrane interne séparées par un périplasme. La bactérie sécrète des sidérophores pour chélater le Fer (III) environnant, et l'importation du complexe sidérophore-Fer (III) est permise par des transporteurs supposés spécifiques. Le fer peut être relargué dans le cytoplasme (ce qui est supposé dans le mécanisme de la pyocheline par exemple, un sidérophore produit par *P. aeruginosa*), ou dans le périplasme (cas des pyoverdines). La stratégie « Cheval de Troie » conjugue un antibiotique à un sidérophore : en parasitant les voies d'importation, on amène l'antibiotique dans le cytoplasme (à gauche) ou dans le périplasme (à droite). D'après Schalk and Mislin, 2017.

Ces sidérophores sont également des molécules signales pour la production de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*, où elles activent par exemple la formation de biofilms. Par conséquent, les pyoverdines font le lien entre le métabolisme du fer et la pathogénicité (Ringel and Brüser, 2018).

4.1. Les applications de la pyoverdine

4.1.1. Concevoir des conjugués sidérophores-antibiotiques : la stratégie du Cheval de Troie

L'émergence de souches pathogènes résistantes aux antibiotiques rend le traitement des infections bactériennes de plus en plus difficile. Dans le cas du pathogène opportuniste bactérien *P. aeruginosa*, l'apparition de ces résistances est d'autant plus problématique. Cette espèce possède en effet une résistance intrinsèque à une variété d'antibiotiques du fait d'une grande imperméabilité de sa paroi cellulaire (Schalk, 2018). *P. aeruginosa* représente 8,4% des infections nosocomiales recensées en France en 2012 (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infection Nosocomiale). L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) classifie par ailleurs cette espèce parmi les pathogènes de priorité critique pour la recherche de nouveaux antibiotiques, notamment en raison de leur résistance récente aux carbapénèmes. Par conséquent, la recherche de nouvelles voies thérapeutiques contre ce pathogène est importante. L'une des stratégies est la conception de conjugués sidérophores-antibiotiques qui permettent le passage de l'antibiotique dans le cytoplasme de la bactérie par la voie d'importation du fer (Mislin and Schalk, 2014 ; Figure 7). La problématique essentielle liée à cette stratégie est le passage de l'antibiotique du périplasme, lieu où les sidérophores sont généralement recyclés, au cytoplasme. Certains conjugués ont déjà démontré leur efficacité en laboratoire, *in vitro* et *in vivo* (Ji *et al*, 2012), certains sont en essais cliniques (Saisho *et al*, 2017).

4.1.2. Bioremédiation

Grâce à leurs capacités chélatrices, les sidérophores sont utilisés en bioremédiation (Saha *et al*, 2016). Le laboratoire a par exemple développé un procédé de désamiantage utilisant les pyoverdines (Geoffroy and Regis, 2017). Les sidérophores sont également utiles en tant que biocapteurs pour mesurer la concentration de ces métaux. Une pyoverdine issue d'une souche de *P. aeruginosa* a déjà été utilisée dans ce but (Barrero *et al*, 1993).

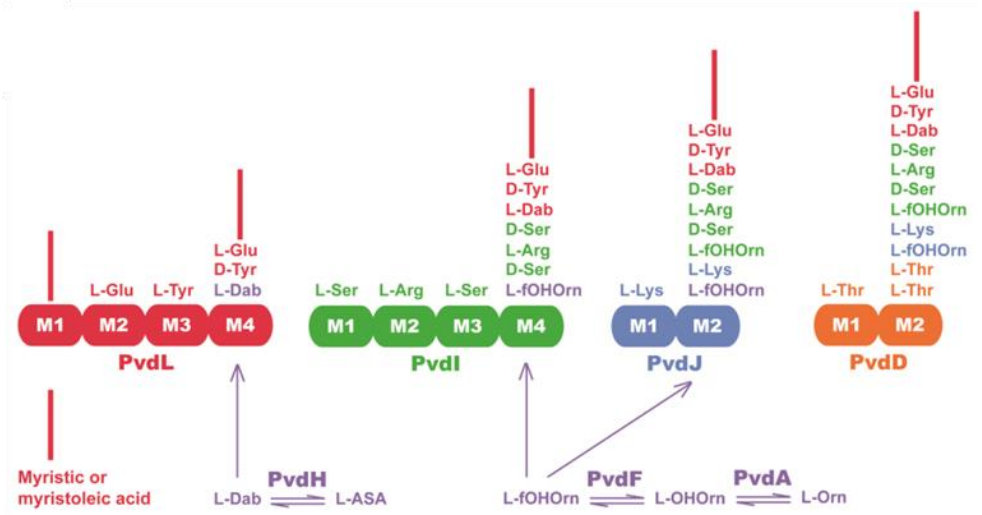


Figure 8 - Schématisation de la voie de biosynthèse de la pyoverdine PVD1 chez *P. aeruginosa* PAO1. Les quatre NRPS sont PvdL, PvdI et PvdJ et PvdD. D'autres enzymes nécessaires à la synthèse de certains substrats sont indiqués (d'après Gasser *et al*, 2015).

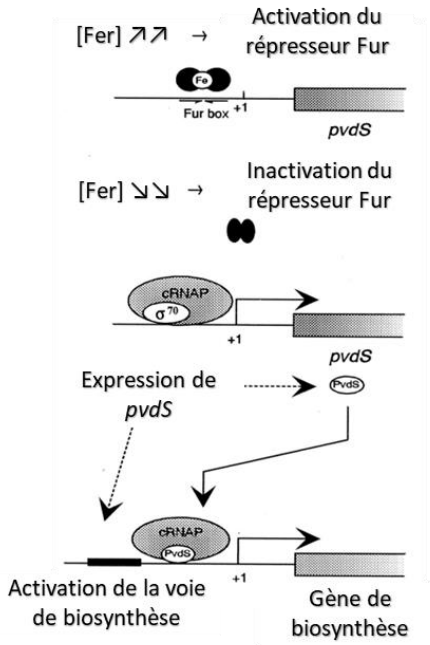


Figure 9 - Schéma de la régulation de l'expression de *pvdS* par le régulateur Fur (d'après Leoni *et al*, 2000).

4.2. La biosynthèse de la pyoverdine PVDI produite par *P. aeruginosa*

Chez *P.aeruginosa* PAO1 qui produit la pyoverdine PVD1, quatre NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) sont impliquées dans la synthèse du précurseur de la pyoverdine (Ravel and Cornelis, 2003). Ce précurseur est ensuite maturé dans le périplasme par une série d'enzymes (Gasser *et al*, 2015). PvdL permet la synthèse d'un chromophore conservé et les autres assurent la synthèse d'une chaîne peptidique variable selon l'espèce (Ringer et Brüser, 2018 ; Figure 8).

4.2.1. La régulation de la voie de biosynthèse

Un milieu carencé en fer est le signal permettant la production de la pyoverdine. Cela est assuré par le régulateur Fur. Lorsque la concentration en fer cytoplasmique est suffisante, ce dernier inhibe l'expression des gènes *pvdS* et *fpvI*. Ils codent pour des facteurs sigma : le premier active l'expression des gènes de biosynthèse et le second ceux codant les protéines nécessaires à l'importation de la ferripyoverdine (pyoverdine complexée au fer). Fur s'associe avec le fer cytoplasmique et le complexe se fixe sur la région promotrice de ses cibles, ce qui réprime leur transcription. En concentration limitante, il n'est plus associé au fer et n'est plus capable de reconnaître les régions promotrices qu'il inhibe : la répression est levée (Figure 9). Outre la régulation Fur-dépendante, un autre système permet une autorégulation de la production de Pyoverdine lorsque de la ferripyoverdine est reconnue au niveau du récepteur membranaire associé (Ringer et Brüser, 2018). La production de pyoverdine est également régulée par la densité cellulaire (Quorum sensing) grâce au régulateur LasR (Stintzi *et al*, 1998).

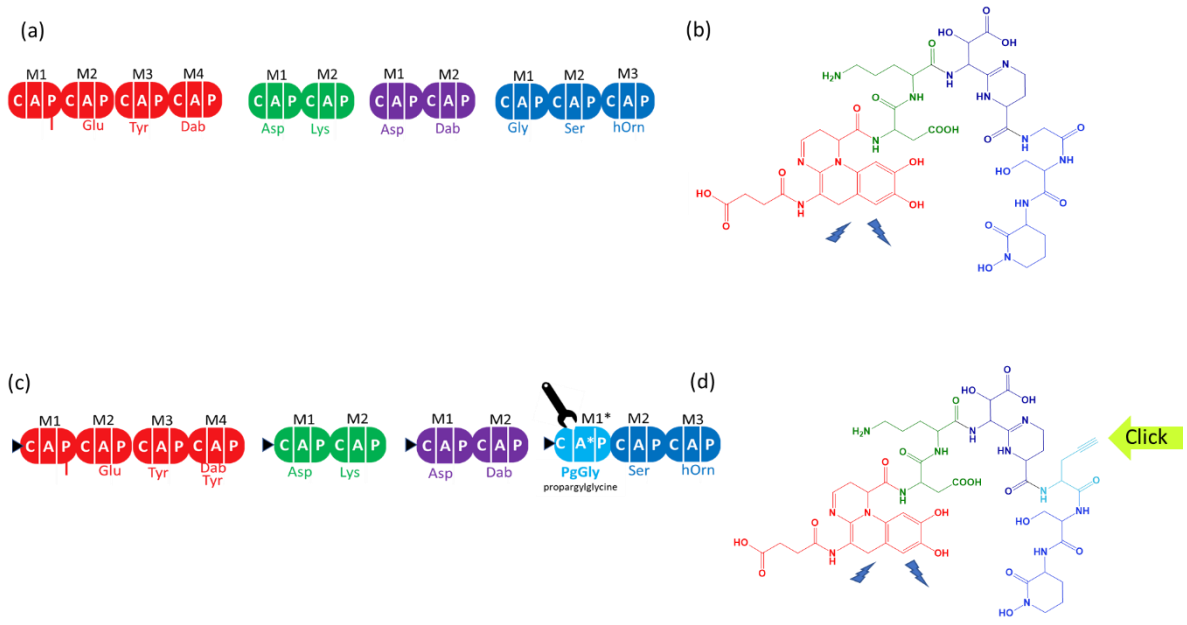


Figure 10 : Schématisation du second objectif de mon stage : fonctionnaliser la pyoverdine. (a) enzymes NRPS impliquées dans la biosynthèse de la pyoverdine chez la souche *P. putida* KT2440. C : domaine de condensation ; A : domaine d'adénylation ; P : domaine de thiolation ; M : module. En dessous de chaque module est indiqué le substrat activé. (b) Structure de la Pyoverdine correspondante. (c) enzymes NRPS modifiées par ingénierie enzymatique afin d'incorporer une Propargylglycine (PgGly) dans la structure de la pyoverdine produite par la souche *P. putida* KT2440, prédite dans la structure correspondante en bleu clair (Click). (d) Structure de la Pyoverdine correspondante. Le chromophore, en rouge (b et d) émet de la fluorescence à 450 nm après excitation à 400 nm.

5. Les objectifs de mon stage

La pyoverdine possède donc de nombreuses applications possibles. Ceci implique de disposer d'une grande quantité de ce sidérophore. Certaines applications, comme la stratégie du cheval de Troie notamment, nécessitent de le conjuguer à d'autres molécules. La synthèse totale de la pyoverdine a été décrite dans la littérature (Mashiash and Meijler, 2013) mais pour des raisons économiques, elle est aujourd'hui essentiellement produite par culture cellulaire et purification. Cela nécessite de réaliser une culture en milieu carencé en fer, ce qui limite sa mise en pratique en biotechnologie. Aujourd'hui, 1 mg de la pyoverdine synthétisée par *P. fluorescens* coûte 197€ (Référence : P8124-1MG – Sigma-Aldrich™). De même, la conjugaison de la pyoverdine n'est pas à ce jour régiosélective. L'ajout d'un groupement fonctionnel se réalise après fonctionnalisation de la pyoverdine purifiée. Cette fonctionnalisation se fait par chimie organique et s'effectue selon les résidus présents dans la molécule, les lysines étant les plus aptes à réagir. Si plusieurs résidus lysines sont présents dans la structure de la pyoverdine ciblée, il y aura par conséquent plusieurs produits obtenus.

De ce fait, mon premier objectif est de concevoir une souche châssis permettant de surproduire la pyoverdine de façon indépendante au fer. La preuve de concept sera réalisée au sein de la souche *P. aeruginosa* PAO1, dont les voies de biosynthèse et de régulation ont été particulièrement décrites. L'hypothèse est que la modification de l'expression de l'activateur transcriptionnel *pvdS* permettrait d'obtenir ce phénotype. Le promoteur de *pvdS* étant réprimé par le régulateur Fur en milieu non-carencé en fer, la substitution de ce dernier par un promoteur inductible (*araC*/P_{BAD}) ou constitutif (le promoteur de cassette P_C des integrons de classe I) permettrait une surexpression de la voie de biosynthèse quel que soit le milieu de culture. Par la suite, la surproduction sera testée au sein de la souche *P. putida* KT2440. Cette dernière est en effet particulièrement étudiée et utilisée en biotechnologie (Nikel and Lorenzo, 2018).

Afin de faciliter la conjugaison de la pyoverdine, le second objectif est de fonctionnaliser *in vivo* ce sidérophore en y incorporant un acide aminé non naturel, la Propargylglycine (PgGly), par ingénierie enzymatique de la voie de biosynthèse. Cette acide aminé possède en effet un groupement alcyne très réactif. Nous avons ciblé la pyoverdine de *P. putida* KT2440 qui possède un groupement glycine dont la structure est proche de la Propargylglycine pour cette étude (Figure 10). Cela permettrait une fonctionnalisation rapide avec une molécule possédant un groupement azide par une réaction nommée « Chimie click », une méthode sélective, efficace et réalisable en milieu aqueux pour la fusion de plusieurs molécules.

Tableau 1 - Souches bactériennes utilisées dans ce travail

Souche	Génotype	Référence
Top10	*E. coli* F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	ThermoScientific™
HB101 (pRK2013)	*E. coli* F- *Lambda- araC14 leuB6(Am) DE(gpt-proA)62 lacY1 glnX44(AS) galK2(Oc) recA13 rpsL20(strR) xylA5 mtl-1 thiE1 hsdS20(rB-, mB-)*	Boyer and Roulland-Dussoix, 1969
PAO1	*P. aeruginosa*	Stover *et al*, 2000
KT2440	*P. putida*	Nelson *et al*, 2002

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

Les souches bactériennes d'*E. coli* et de *Pseudomonas* utilisées sont décrites dans le Tableau 1. Elles sont cultivées en routine à respectivement 37°C et 30°C en aérobiose et en milieu riche LB (« Lysogeny Broth » ; Sigma-Aldrich™, utilisation à 25 g/L). Les plasmides utilisés dans ce travail sont décrits dans le Tableau 2. Le plasmide pEXG2 est utilisé comme vecteur pour la substitution de séquences nucléiques dans le chromosome de souches *Pseudomonas.* Il possède le gène *sacB* qui code pour un produit toxique et s'exprime en présence de sucrose et le gène *aac1* qui confère une résistance à la Gm. Les cultures liquides sont effectuées sous rotation à 220 rpm en chambre thermostatée ou en incubateur InForce™. Les milieux LB solides se préparent grâce à l'ajout d'agar (Euromedex™) à 15 g/L avant autoclavage. Les cultures en conditions carencées en fer se réalisent dans du milieu CAA (Bacto™ Casaminoacides à 5 g/L, K_2HPO_4, 3 H_2O à 1,46 g/L ; $MgSO_4$, 7 H_2O à 0,25 g/L) et nécessitent : (i) une pré-culture réalisée en LB, (ii) centrifugée à 8 500 rpm, 10 min afin de laver les culots 2 fois en milieu CAA, (iii) puis une incubation toute la nuit dans ce même milieu. Le milieu sans sel LB+6% sucrose est utilisé pour sélectionner les clones ayant réalisé le 2ème évènement de crossing-over, et donc perdu le gène *sacB*, lors des mutagénèses. Il se compose de 15 g/L d'agar, 10 g/L de tryptone, 5 g/L de Yeast Extract, et de 6% de sucrose (Euromedex™) ajouté après autoclavage du milieu. Certains milieux sont supplémentés en arabinose (entre 0,02 et 2 %, Sigma-Aldrich™) afin d'induire l'expression des gènes étant sous le contrôle du promoteur *araC* /P_{BAD}. L'ajout d'antibiotiques dans les milieux exerce une pression de sélection : chloramphénicol (Ch) à 10 µg/mL et gentamycine (Gm) à 30 ou 15 µg/mL (Sigma-Aldrich™). Certains milieux sont supplémentés en Fer III à 50 nM, 500 nM, 5 µM, ou 50 µM qui est stocké à long terme dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 1M et dilué avant utilisation dans du Tris-HCl à pH7 (Euromedex™).

2. Biologie moléculaire

2.1. Extraction d'ADN

2.1.1 ADN génomique

Les ADN génomiques sont extraits de 500 µL de pré-culture grâce au protocole adapté aux bactéries du kit « NucleoSpin® : Tissue » (Macherey and Nagel™). L'ADN est élué dans 50 µL d'eau déionisée chauffée à environ 60°C.

Tableau 2 - Plasmides utilisés dans ce travail

Plasmide	**Caractéristique(s)**	**Référence**
pEXG2	Vecteur de clonage mobilisable (*oriT*$_{IncP-1}$), ColE1, *sacB*+, Gm^R, suicide chez les souches *Pseudomonas.*	Rietch *et al*, 2005
pEXG2::PA_P$_{BAD}$	Contient la cassette destinée à la substitution de la région promotrice de *pvdS* par le promoteur *araC*/P$_{BAD}$ dans le chromosome de *P. aeruginosa* PAO1.	Ce travail
pEXG2::PP_P$_{BAD}$	Contient la cassette destinée à la substitution de la région promotrice de *pvdS* par le promoteur *araC*/P$_{BAD}$ dans le chromosome de *P. putida* KT2440.	Ce travail
pEXG2::PA_P$_C$	Contient la cassette destinée à la substitution de la région promotrice de *pvdS* par le promoteur P$_C$ des integrons de classe I dans le chromosome de *P. aeruginosa* PAO1.	Ce travail
pEXG2::PP_P$_C$	Contient la cassette destinée à la substitution de la région promotrice de *pvdS* par le promoteur P$_C$ des integrons de classe I dans le chromosome de *P. putida* KT2440.	Ce travail
pEXG2::M1_PvdD	Contient 1,4 kb de la région chromosomique entourant la séquence codante du domaine d'adénylation du module 1 de PvdD de *P. putida* KT2440.	Ce travail
pEXG2::M1_PvdD _W800V	Plasmide pEXG2::M1_PvdD ayant la mutation permettant la substitution W800V dans la séquence primaire du domaine d'adénylation.	Ce travail
pEXG2::M1_PvdD _W800F	Plasmide pEXG2::M1_PvdD ayant la mutation permettant la substitution W800F dans la séquence primaire du domaine d'adénylation.	Ce travail
pEXG2::M1_PvdD _W800V,I701A	Plasmide pEXG2::M1_PvdD_W800V ayant la mutation permettant la substitution I701A dans la séquence primaire du domaine d'adénylation.	Ce travail
pRK2013	Plasmide conjugatif, origine de réplication RK2, Kan^R	Knauf and Nester, 1982

Pour les PCR sur colonies bactériennes, une méthode rapide d'extraction génomique est utilisée : la colonie est resuspendue dans 50 µL d'eau déionisée puis chauffée pendant 10 min à 100°C. La haute température lyse les membranes bactériennes. Par la suite, une rapide centrifugation à haute vitesse sépare les débris cellulaires bactériens de l'ADN génomique présent dans le surnageant. Ce dernier est conservé à -20°C.

2.1.2 ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidiques se réalisent par lyse alcaline *via* le kit « NucleoSpin® Plasmid Purification » (Macherey and Nagel™) et selon le protocole du fournisseur à partir de 2 mL de pré-culture. L'ADN est élué par 50 µL d'eau déionisée à 60°C, puis conservé à -20°C.

2.2. Extraction d'ARN

Une culture bactérienne de 8h réalisée dans les conditions souhaitées permet de collecter $2{,}5.10^8$ cellules pour l'extraction. Les ARN totaux sont ensuite stabilisés *via* un traitement des cellules par le kit « RNAprotect® » de Qiagen™, selon le protocole du fournisseur. Après centrifugation à 5 000 rpm pendant 10 min, le surnageant est jeté délicatement et les culots cellulaires sont stockés à -20°C pendant au maximum 2 semaines. La paroi bactérienne est ensuite dégradée par l'action de 15 mg/mL de lysozyme dans du tampon TE (10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA pH8), à température ambiante, pendant 10 minutes et sous agitation. Afin de fragmenter l'ADN génomique, le lysat est traité par le kit QIAShredder de Qiagen™ selon le protocole du fournisseur. La suite de l'extraction se réalise en suivant le protocole du kit RNeasy® Minispin de Qiagen™. Une fois les ARN élués par 87,5 µL d'eau RNase-free, ils sont traités par 2,5 µL de DNase I (kit RNase-Free DNase Set de Qiagen™) et 10 µL de tampon RDD fourni *via* une incubation de 15 min à température ambiante. Par la suite, une nouvelle purification utilisant le kit RNeasy® Minispin de Qiagen™ est réalisée. Brièvement, un volume de 350 µL de tampon RLT fourni est ajouté, puis le mélange est vortexé avant d'y introduire 250 µL d'éthanol 100%. Après homogénéisation par pipetage, les ARN traités sont déposés sur une colonne RNeasy® Minispin qui est centrifugée 15s, 1 000 rpm. La colonne est ensuite lavée avec 500 µL de tampon RPE fourni par une centrifugation identique, puis par 500 µL d'éthanol pendant 2 min, 1 000 rpm afin d'éliminer les sels résiduels. La colonne est séchée par une centrifugation de 5 min à vitesse maximale avec le capuchon ouvert. Les ARN sont une nouvelle fois élués dans 30 µL d'eau RNase-free. La mesure de la concentration s'effectue alors au nano drop à 260 nm, et les ARN sont stockés à -80°C.

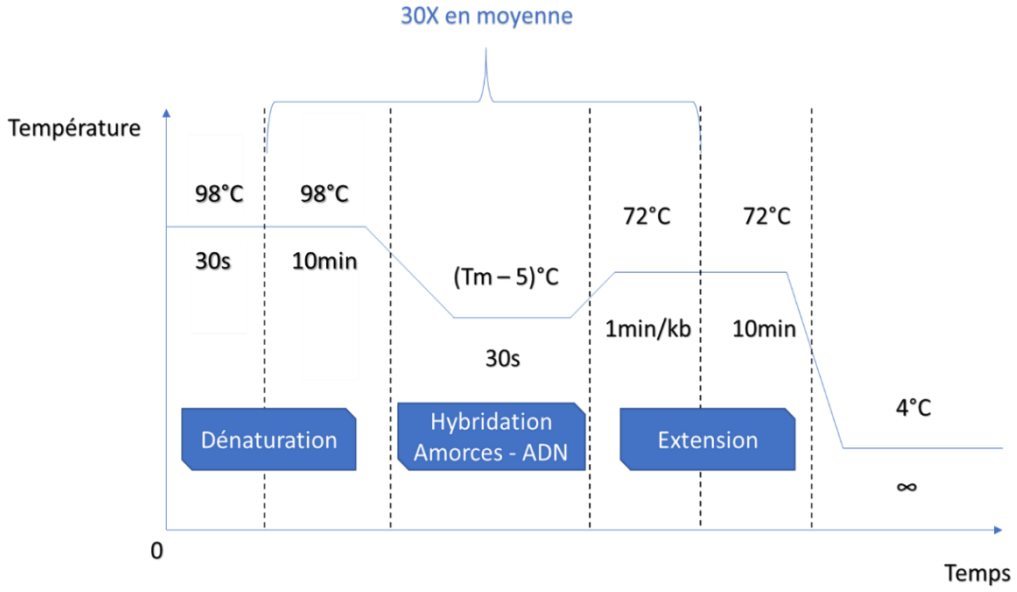


Figure 11a - Programme PCR utilisé pour l'enzyme Phusion®

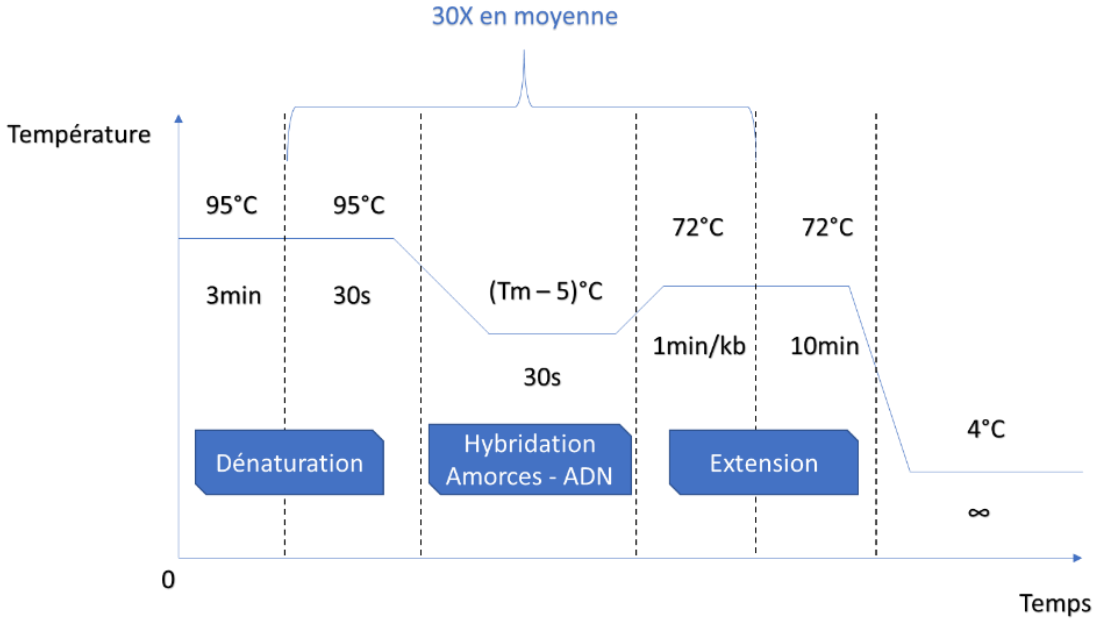


Figure 11b - Programme PCR utilisé pour l'enzyme DreamTaq

2.3. Amplification d'ADN par PCR

Les amplifications d'ADN sont effectuées selon le protocole des fournisseurs de polymérase. Elles sont réalisées dans un volume de 20 ou 50 µL, dans un thermocycleur T3000 de Biometra®. Les enzymes Dream Taq DNA Polymerase (Dream Taq) et Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Phusion®) de Thermo Fisher Scientific™ sont utilisés selon les besoins avec les programmes disponibles en Figures 11a et 11b. Pour un volume de 20 µL, le mélange contient 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotides, 1 µM de chaque amorces, 1,25 unités d'enzyme, du tampon 1X et de 5 à 100 ng d'ADN matrice. Du DMSO est ajouté à 3 % lorsque l'ADN utilisé en matrice est issu d'un génome du genre *Pseudomonas*. L'enzyme CloneAmp™ de Takara™ est utilisée pour l'amplification de plasmides qui nécessite un programme PCR similaire à celle de Phusion®, mais avec une processivité de 1kb / 15s. Elle est présente dans un pré-mix auquel est ajouté de 5 à 100 ng d'ADN matrice et les amorces à 1 µM. Une réaction témoin sans ADN matrice est réalisée lors de chaque expérience. Les amorces utilisées sont présentées dans les Annexes 1, 2 et 3. Les T°C d'hybridation sont criblées par PCR Gradient (TAdvanced de Biometra®).

2.4. Digestions enzymatiques

Les digestions enzymatiques effectuées dans ce travail utilisent les enzymes de restriction fournies par ThermoScientific™ *Eco*RI-FD, *Eco*RV-FD, *Xho*I-FD, *Nde*I-FD, et *Van*91I ajoutées à un ratio de 1 µL d'enzyme pour 20 µL d'ADN, ainsi que les tampons associés. La digestion dure 10 minutes à 37°C pour *Eco*RI-FD, *Eco*RV-FD, *Xho*I-FD, *Nde*I-FD, 5 minutes à 37°C pour *Eco*RV-FD et 3h à 37°C pour *Van*91I. De même, l'enzyme *Dpn*I (ThermoScientific™) permet de digérer l'ADN matrice méthylé après une amplification par PCR. Elle s'utilise également à 37°C pendant 3h.

2.5. Electrophorèse d'ADN

Les produits d'amplification PCR, de digestion et de clonage sont visualisés par électrophorèse en gel d'agarose 1 % ou 1,5% préparé dans du tampon TAE (Tris 0,4 M, Acétate 0,2 M, EDTA 10 mM - Euromedex™) 1X. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GeneRuler DNA Ladder de ThermoScientific™. La migration s'effectue à 135V pendant 20 minutes environ dans du tampon TAE 1X. L'ajout de 5 µL de SyberSafe™ (ThermoScientific™) dans la préparation d'un gel d'agarose de 50 mL permet de révéler l'ADN, après migration, sous exposition aux UV (365 nm) dans le E-box™ VX5 de Vilber™.

2.6. Purification d'ADN

Les amplicons et produits de digestion sont purifiés grâce au kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up » de Macherey and Nagel™ selon le protocole « PCR Clean-Up ». Les extractions sur gel d'agarose se déroulent selon le protocole « Gel extraction and purification ». Les ADN sont élués dans 50 µL d'eau déionisée chauffée à 60°C environ.

2.7. Séquençage

Afin de valider le succès des clonages et des mutagenèses (*in vitro* et *in vivo*), les ADN cibles sont amplifiés par PCR, puis purifiés avant d'être finalement envoyés à séquencer par l'entreprise Eurofins™. Cette dernière réalise un séquençage Sanger adapté aux ADN riches en GC. Les amorces utilisées pour le séquençage sont envoyées à 10 µM. Une fois les données récupérées, le logiciel SnapGene® Viewer est utilisé pour les visualiser les données et pour estimer la qualité du séquençage. Les données de séquençage sont comparées à la séquence de référence par l'outil $BLAST_N$ de NCBI.

3. Transformation bactérienne

La première étape consiste à préparer des cellules chimio-compétentes. Les cellules sont cultivées la nuit dans 5 mL de LB. Dans un erlenmeyer contenant 100 mL de LB, 1 mL de pré-culture est ajouté, puis incubée à 37°C, sous agitation (220 rpm), jusqu'à ce que la biomasse atteigne une DO_{600nm} de 0,5. La croissance est alors stoppée par immersion de l'erlenmeyer dans un bain de glace pendant au moins 20 min. Une centrifugation de 5 000 rpm pendant 10 min permet de séparer le culot cellulaire du surnageant de culture. Les culots bactériens sont lavés deux fois par 50 mL d'une solution de $CaCl_2$ 1M à 4°C. Entre chaque étape de lavage, une centrifugation de 10 min permet de culoter les cellules et de retirer le surnageant. Après la dernière centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de $CaCl_2$ 1 M supplémenté de glycérol 10% à 4°C. Elles sont alors aliquotées et stockées à -80°C. Pour la transformation, le mélange ADN-cellules est homogénéisé délicatement. Il est ensuite incubé dans de la glace pendant 30 min, puis à 42°C pendant 40s et à 4°C pendant 3 min. Les cellules sont remises en suspension dans 250 µL de LB et placées pendant 1h à 37°C, 220 rpm. Elles sont alors étalées sur boîte sélective.

4. Conjugaison triparentale

Le transfert des plasmides au sein des souches *Pseudomonas* se déroule par conjugaison triparentale. Le protocole pour *P. putida* KT2440 a été adapté de Wirth *et al*, 2019. La conjugaison nécessite la souche *Pseudomonas* réceptrice, la souche *E. coli* Top10 possédant le plasmide à transmettre, et la souche *E. coli* HB101 qui contient le plasmide conjugatif pRK2013 amorçant la conjugaison. Les cellules sont d'abord mises en pré-cultures. *P. aeruginosa* PAO1 est incubée à 42°C afin de diminuer sa virulence. Dans un tube Eppendorf 2 mL, un mélange à densité cellulaire équitable de chaque pré-cultures est réalisé dans 1,5 mL final. En parallèle, 3 témoins sont réalisés pour chaque souche ou les volumes correspondants aux autres souches sont substitués par du milieu LB. Les tubes sont centrifugés 5 min à 6 000 rpm afin de séparer le culot bactérien du surnageant de culture. Une seconde centrifugation 1 min à 6 000 rpm permet d'éliminer le reste du surnageant. Le culot est resuspendu dans 50 µL de LB, puis est déposé sur boîte LB sèche. Après 1h à température ambiante, la boite est incubée entre 4 et 6h à 37°C lorsque la souche réceptrice est *P. aeruginosa* PAO1, et à 30°C lorsqu'il s'agit de *P. putida* KT2440. La culture est ensuite récupérée à l'oese et dissociée dans 1 mL de LB. Une fois les cellules resuspendues, 100 µL est étalé sur LB Gm 30 µg/mL, Ch 10 µg/mL. La boîte est alors incubée 48h à 37°C pour les conjugaisons incluant *P. aeruginosa* PAO1 ou 30°C pour *P. putida* KT2440.

L'étape suivante consiste à enrichir les colonies ayant poussé sur boîte sélective. Pour cela, 6 colonies sont prélevées et dissociées dans 1 mL de LB dans un tube Falcon 12 mL à fond rond. Après une incubation 4h à 37°C pour *P. aeruginosa* PAO1 ou 30°C pour *P. putida* KT2440, 220 rpm, une centrifugation de 5 min à 6 000 rpm permet de culoter les cellules et d'éliminer le surnageant de culture. Une nouvelle centrifugation de 1 min à 6 000 rpm soustrait le reste du surnageant. Le culot est repris dans 50 µL de LB et 15 µL sont étalées sur une boîte LB+6% sucrose pour contre-sélectionner les bactéries n'ayant pas résolu le coïntégrat. Afin de vérifier que les bactéries ont perdu le plasmide leur conférant une résistance à la Gm, des colonies sont isolées en parallèle sur LB et LB Gm 15 µg/mL. Les clones positifs sont ceux poussant sur LB mais ne poussant pas sur LB Gm. Ces derniers sont analysés par PCR et séquençage.

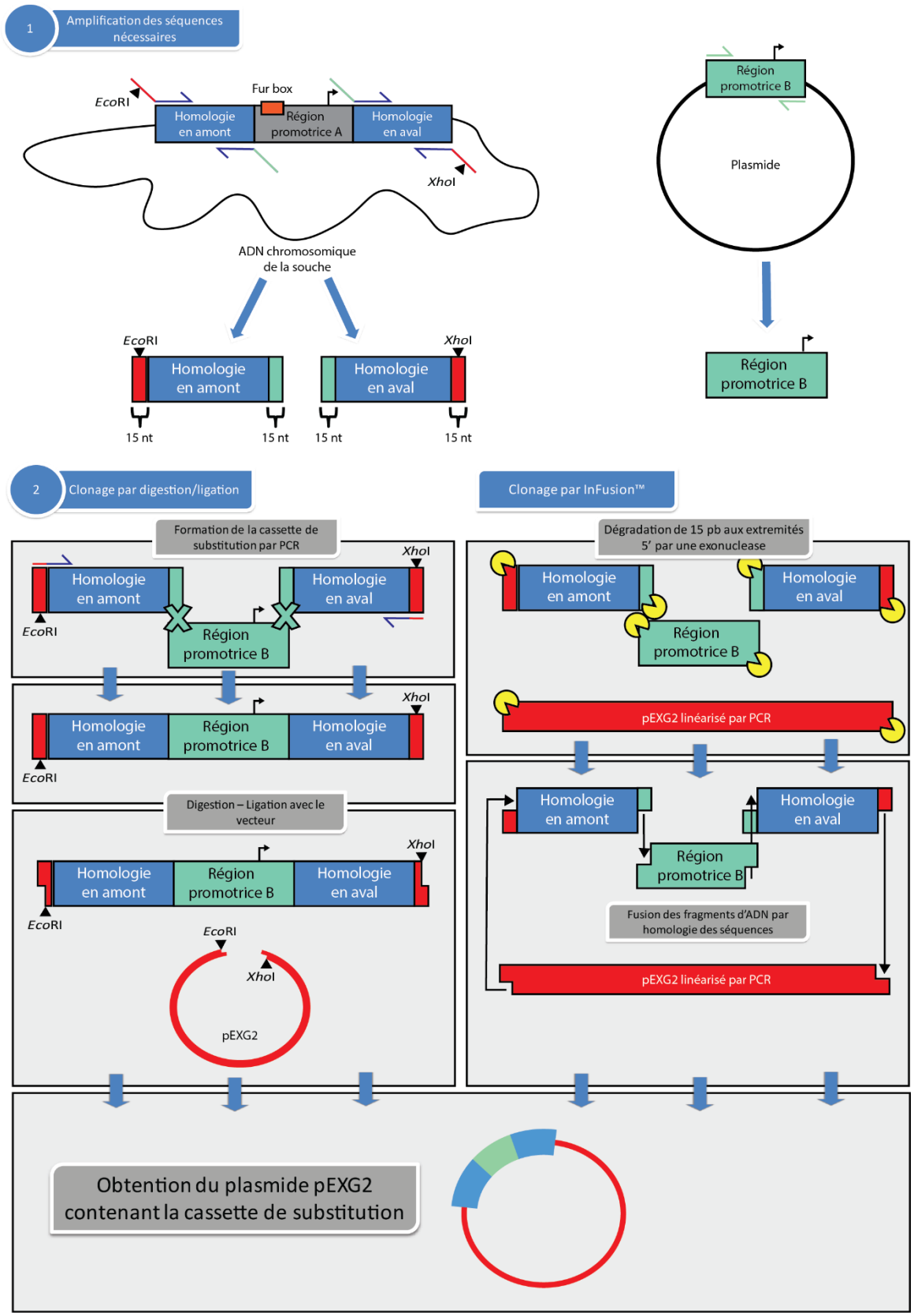


Figure 12 - Schéma des deux stratégies de clonage adoptées : par digestion/ligation et par InFusion™.

5. Clonages pour la substitution du promoteur de *pvdS*

5.1. Design des amorces

Les amorces possèdent environ 20 pb d'homologie avec la séquence à amplifier et 15 pb à l'extrémité 5' d'homologie avec les futures séquences adjacentes dans le plasmide. Ces 15 pb possèdent au sein des amorces PApvdS_am_F et PPpvdS_am_F le site de restriction *Eco*RI et ceux des amorces PApvdS_av_R et PPpvdS_av_R possèdent le site de restriction *Xho*I. L'introduction des 15 pb d'homologie en extrémité 5' permet : (i) la fusion des cassettes de substitution par PCR et un clonage dans pEXG2 par digestion/ligation, (ii) un clonage par InFusion™ (Figure 12). Les amorces qui ciblent les séquences adjacentes au promoteur sont codées de la façon suivante : « PA » correspond aux amorces pour la souche PAO1 et « PP » pour la souche KT2440 ; l'amorce cible la séquence en amont (am) ou en aval (av) du promoteur ; F et R correspondent à Forward et Reverse ; lorsque l'amorce est uniquement destinée à l'introduction d'un promoteur, le nom de ce dernier est ajouté.

5.2. Clonage par digestion/ligation

Pour reconstituer la cassette de substitution à partir des 3 amplicons, une PCR de fusion est réalisée avec la polymérase Phusion®. Les amplicons sont introduits de manière équimolaire dans une même réaction d'amplification. Les séquences d'homologies (700 pb environ) sont utilisées à 10 ng, le promoteur P_{BAD} à 16 ng (1 200 pb environ), et le promoteur P_C à 3,6 ng (280 pb environ) dans un volume de 50 µL. L'hybridation des 15 pb d'homologies entre les amplicons lors de la réaction permet la fusion de la cassette. L'amplification de la cassette de substitution se réalise grâce à l'ajout des amorces PApvdS_am_F / PApvdS_av_R ou PPpvdS_am_F / PPpvdS_avR selon la souche dès le début de la PCR ou à la moitié du programme (après 15 cycles). La température d'hybridation permettant l'hybridation des amorces aux extrémités de la cassette et celles entre les amplicons est criblée par PCR Gradient (entre 50°C et 70°C). L'obtention de la cassette est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% des produits de la PCR fusion. La cassette est purifiée par extraction sur gel. Le clonage de la cassette de substitution dans pEXG2 se réalise par leur digestion *via* les enzymes *Eco*RI et *Xho*I, suivie d'une ligation par l'ADN ligase T4 (ThermoScientific™). La réaction de ligation se déroule dans un volume de 10 µL avec 1 µL de DNA Ligase T4, 50 ng de pEXG2 digéré et 70 ng de la cassette de substitution digérée pour avoir un ratio molarité vecteur : insert de 1:3. L'incubation se déroule pendant 1h à 22°C. 5 µL de la réaction de ligation est utilisé pour la transformation de 50 µL de cellules compétentes *E. coli* Top10.

5.3. Clonage par InFusion™

La seconde technique utilise le kit InFusion™ commercialisé par Takara™. Une quantité de 10 ng de pEXG2 est linéarisé par PCR avec l'enzyme CloneAmp™ (amorces pEXG2_F et pEXG2_R). Le produit PCR est purifié par l'enzyme *Dpn*I qui digère le plasmide matrice. La réaction possède une exonucléase capable de dégrader de 5' en 3' les 15 pb aux extrémités de chaque amplicons et du vecteur linéarisé. Une fusion des fragments d'ADN permet d'obtenir le plasmide, sans utilisation de ligase. Une quantité de 100 ng de plasmide est ajouté. Le promoteur P_C est introduit à 40 ng et les séquences adjacentes à 80 ng. Le mélange est incubé 15 min à 50°C. Un volume de 2,5 µL est utilisé pour transformer 50 µL de cellules compétentes *E. coli* Top10.

6. Mutagénèse de *pvdD*

6.1. Analyse in silico

Les mutations à introduire dans le domaine A du module I de PvdD (Uniprot : Q88F79) pour incorporer la PgGly sont identifiées par une analyse *in silico*. Le serveur « antiSMASH » est utilisé afin de définir les limites des domaines enzymatiques, vérifier le substrat, et concevoir les amorces pour amplifier le domaine A. Un $BLAST_P$ des 330 premiers résidus de la séquence primaire, contenant le domaine A cible, est réalisée contre la banque de données Protein Data Bank (PDB) qui répertorie les protéines à la structure tridimensionnelle élucidée. Le logiciel PyMOL™ est utilisé pour visualiser les structures 3D du NRPS PA1221 issue de *P. aeruginosa* PAO1 (PBD : 4dg9) et DhbF de *Geobacillus* sp. Y4.1MC1. (PDB : 5u89) Les structures sont disponibles avec les inhibiteurs de domaine A valine-vinylsulfonamide et glycine-vinylsulfonamide respectivement, liés de façon covalente au site actif. Les alignements des séquences primaires sont réalisés *via* l'algorithme MUSCLE sur le service web EMBL.

6.2. Mutagenèse in vitro

Les mutagénèses dirigées sont réalisées grâce au kit Q5® Site-Directed Mutagenesis de NEB™ et selon le protocole du fournisseur. Les amorces sont conçues selon leurs recommandations (Mut1_R, Mut1_VF, Mut1_FF, Mut2_R, Mut2_AF ; Annexe 2). Une quantité de 500 ng de plasmide pEXG2::M1_PvdD est utilisée en matrice. Le programme PCR consiste en un premier cycle de 30s à 98°C, puis 30 cycles de 3 étapes : 10s à 98°C, 30s à 72°C et 3min 30s à 72°C. Un dernier cycle à 72°C de 2min est réalisé. Le choix du codon s'est réalisé selon les préférences de la souche KT2440. La mutagénèse du codon W800 de PvdD retire un site de restriction de l'enzyme *Van*91I et celle du codon I701 retire celui d'*Eco*RV.

Un volume de 5 µL du produit de mutagénèse est utilisé pour une transformation de la souche Top10. Les plasmides extraits des clones transformants sont criblés par digestion enzymatique, puis séquencés.

7. Suivi de la production de pyoverdine au cours du temps

7.1. Par culture cellulaire au TECAN™

Le suivi de la production de pyoverdine s'est tout d'abord réalisé par culture cellulaire au TECAN™ Infinite M200. Dans une microplaque 96 puits (Greiner™), les pré-cultures bactériennes sont ensemencées en milieu LB ou CAA, supplémenté ou non en arabinose et en fer, dans un volume final de 200 µL et à DO_{600nm} initiale de 0,01. Le suivi de la croissance se déroule par la mesure de l'absorption à 600nm toute les demi-heures. La production de pyoverdine est estimée par la mesure de l'absorbance à 400nm, et par 25 mesures rapprochées de l'intensité de fluorescence à 450nm après excitation à 400nm, réalisées toutes les demi-heures également. Des agitations de 10s à une amplitude de 4,5 mm se réalisent avant chaque mesure.

7.2. Par culture cellulaire en Falcon™

Pour les cultures réalisées en Falcon, les précultures ont été centrifugées 10 min, 8 500 rpm puis lavées avec le milieu de culture souhaité afin de retirer toute trace de pyoverdine. Les culots sont remis en suspension dans le même milieu. Afin d'estimer les concentrations de pyoverdine obtenues par les différentes souches testées, des tubes Falcon™ 50 mL sont ensemencé à DO_{600nm} initiale de 0,01 dans un volume de 5 mL de milieu à partir de pré-cultures. Les cultures sont incubées pendant 24h dans différentes conditions de températures (25, 30 ou 37°C) et avec différentes concentrations de fer ou d'arabinose. A intervalle de temps régulier, des échantillons de 1 mL de culture sont récupérés. La DO_{600nm} est mesurée, puis les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 8 500 rpm. Les surnageants sont ensuite utilisés pour une mesure de la concentration en Pyoverdine au spectrophotomètre à DO_{400nm} (Specord® 205). Des dilutions des surnageants ont été réalisés avec le milieu de culture afin d'améliorer la précision de mesure lorsque les valeurs obtenues sont trop importantes. Le coefficient d'extinction molaire de la pyoverdine PVD1 est de 16 500 L/mol.cm à pH neutre. Sa masse molaire est de 1 335 g/mol.

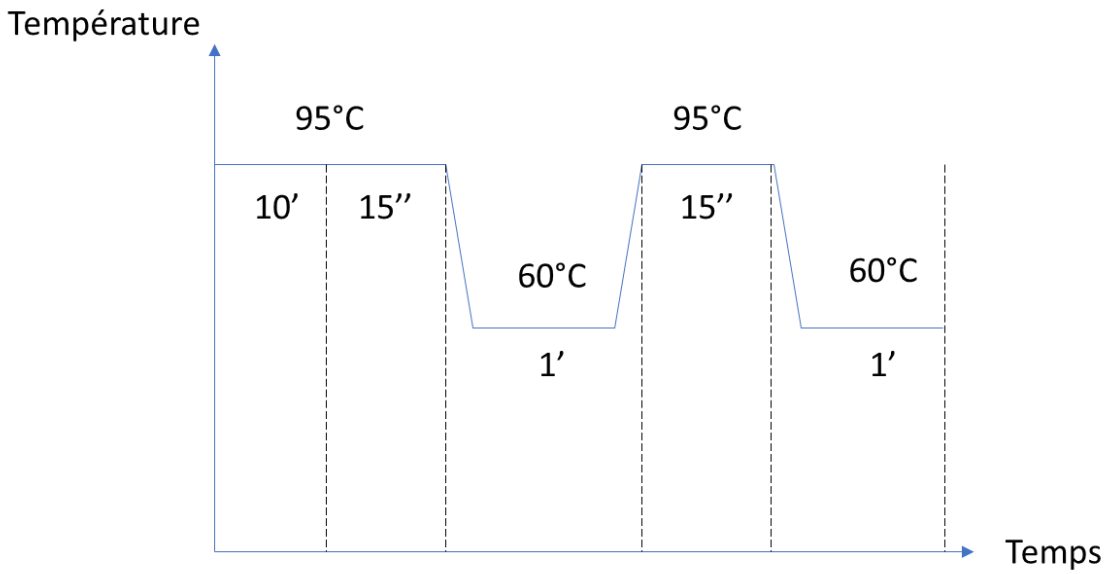


Figure 13 - Programme de la qPCR. 40 cycles sont réalisés.

7.2. Par l'analyse de la transcription de *pvdS*

A partir des ARN totaux extraits, un dosage au Nanodrop™ à DO_{260nm} est réalisé afin d'estimer leur concentration. Une quantité de 500 ng est utilisée pour une rétro-transcription (kit High Capacity RNA-to-cDNA®) afin d'obtenir les ADN codants (ADNc). L'enzyme nécessite un temps d'incubation d'une heure à 37°C, puis une inactivation de 5 min à 90°C. Pour chaque expérience, un témoin sans rétrotranscription est réalisé afin de vérifier la non-contamination en ADN génomique. Une PCR permet de déterminer qualitativement l'expression de *pvdS*. Les gènes *rpsL*, codant pour une protéine ribosomique, et *uvrD*, codant pour une hélicase d'ADN, sont utilisés comme gène de référence. Une qPCR permet d'estimer la quantité de transcrits entre deux conditions. Dans une microplaque 96 puits, 40 ng d'ADNc est mélangé dans chaque puits à un mix contenant 10 µL de SyberGreen™ (Power SyberGreen™ PCR Master Mix – Applied Biosystems), 2 µL de chaque amorces (voir amorces qPCR, Annexe 3) et 2 µL d'eau. L'amplification se réalise selon le programme disponible Figure 13 et au sein du thermocycleur Step OnePlus d'Applied Biosystems™. La différence d'expression a été calculée par la méthode des ΔΔCtt.

8. Purification de la pyoverdine

Les souches de *Pseudomonas* sont mises en pré-culture en milieu LB 10 mL toute la nuit à 30°C. Pour les souches sauvages, ces précultures sont repiquées en CAA (voir « Matériel biologique »). Un volume de 600 µL de pré-culture est introduit dans 20 mL de CAA ou de LB en Erlenmeyer 100 mL. L'incubation se déroule 24h à 25°C. La culture est transvasée dans un tube Falcon 50 mL puis centrifugée 30 min, 5 000 rpm. Le surnageant est filtré à la seringue par un filtre nitrocellulose 0,22 µm, puis la DO_{400nm} est mesurée. Le filtrat est acidifié à pH 6 par l'ajout d'HCl 6N. Un volume de 2 mL de résine XAD-4 Amberlite® (Sigma-Aldrich™) est introduit dans un tube Falcon 50 mL. Le filtrat acidifié y est déposé et incubé 1h sous agitation rotative. Après décantation des billes de résine, le surnageant est éliminé. Une mesure de la DO_{400nm} est réalisée. La résine est lavée 5 fois par 20 mL d'eau. L'élution se déroule pendant 1h sous agitation rotative avec l'ajout de 10 mL d'éthanol 50%, puis la DO_{400nm} est mesurée. L'éluat est isolé et stocké à -20°C, puis 20 mL d'éthanol 100% est ajouté sur la résine afin d'éluer ce qu'il reste sur la résine. Cette dernière est régénérée par 20 mL d'éthanol 99% - HCl 1%, puis 5 lavages successifs par 20 mL d'eau.

RESULTATS

1. Conception d'une souche châssis pour la surproduction de pyoverdine

1.1. Preuve de concept : Surproduction de PVD1 chez *P. aeruginosa* PAO1

Le premier objectif de mon stage est de démontrer que la surproduction de *pvdS* chez PAO1 peut entrainer une surproduction de pyoverdine. Pour cela, la stratégie adoptée consiste à substituer la région promotrice de *pvdS* dans le chromosome de PAO1 par un promoteur inductible (*araC*/P_{BAD}) ou constitutif (P_C). Cette substitution nécessite de construire des vecteurs plasmidiques suicides chez *Pseudomonas* qui possèdent une cassette de substitution composée des deux séquences de 700 pb adjacentes à la région promotrice séparées entre elles par le promoteur souhaité (Figure 12). Les 700 pb d'homologie avec la séquence chromosomique vont permettre, *in vivo*, d'induire un évènement de crossing-over conduisant à l'intégration du plasmide. La résolution du coïntégrat chez certains clones est identifiée par la contre-sélection de ceux possédant le plasmide et exprimant le gène *sacB* (Martinez-García and Lorenzo, 2017).

1.1.1. Construction des vecteurs

La conception des amorces pour l'amplification des séquences adjacentes et du promoteur est la clé permettant le développement de deux stratégies de clonage.

1.1.1.1. Construction du plasmide pEXG2::PA_P_{BAD}

A partir d'extractions d'ADN génomiques de *P. aeruginosa* PAO1, les séquences nucléiques de 700 pb entourant la région promotrice du gène *pvdS* ont été amplifiées par l'enzyme Phusion® avec les couples d'amorces PA_pvdS_amF / PA_pvdS_amR pour la région en amont et PA_pvdS_P_{BAD}_avF / PA_pvdS_avR pour la région aval, en utilisant une température d'hybridation (Tm) de 58°C. En parallèle, le promoteur *araC*/P_{BAD} a été amplifié par PCR selon les mêmes conditions avec les amorces PA_pBAD_F et PA_pBAD_R à partir du plasmide pEXG2. Après purification des produits PCR, une PCR de fusion a permis d'assembler les amplicons par simple hybridation des extrémités et d'amplifier l'assemblage en utilisant les amorces PA_pvdS_amF et PA_pvdS_avR. Une première PCR gradient a permis de déterminer la Tm optimale : entre 52 et 54°C. La fusion a ensuite été maximisée par l'ajout des amorces après 15 cycles de PCR sur les 30 réalisés (voir Figure 14, colonne 1). Sur les 15 premiers cycle, la Tm est de 50°C, puis elle passe à 54°C. La cassette de substitution a alors été purifiée par extraction sur gel d'agarose (Carte disponible Annexe 4).

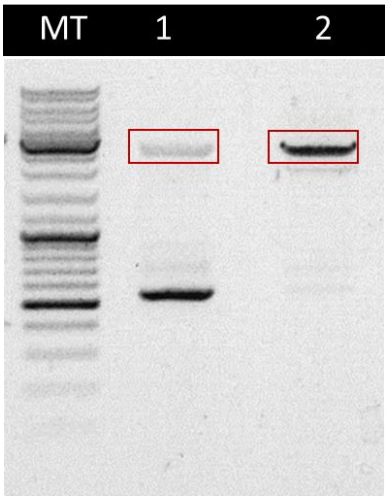


Figure 14 - Migration sur gel d'agarose 1% des amplifications par PCR de fusion pour l'assemblage des cassettes de substitutions avec ajout des amorces après 15 cycles ; Les deux amplicons encadrés en rouge ont une taille correspondant aux cassettes permettant la substitution du promoteur natif par *araC*/P_{BAD} chez la souche PAO1 (1) et KT2440 (2), soit 2,7 kb. Les amorces utilisées sont respectivement : PA_pvdS_amF / PA_pvdS_avR et PP_pvdS_amF / PP_pvdS_avR. Marqueur de taille = MT.

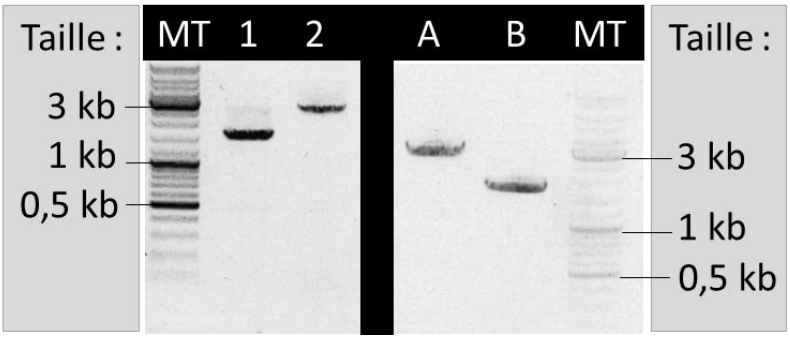


Figure 15 - Migration sur gel d'agarose 1% de l'amplification par PCR de la séquence promotrice de *pvdS* chez la souche PAO1 sauvage (1), PA_P_{BAD} (2), KT2440 sauvage (B) et PP_ P_{BAD} (A). Amorces utilisées pour (1) et (2) : PApvdS_am_F et PApvdS_av_R ; pour (A) et (B) : PPpvdS_am_F et PPpvdS_av_R. Taille attendue (1) et (B) : 1,6 kb ; (2) et (A) : 2,7 kb. B : blanc de PCR. Marqueur de taille = MT.

Le plasmide et la cassette ont été digérés par les enzymes *Eco*RI et *Xho*I puis liés covalemment par l'ADN ligase du phage T4. Le produit de ligation a été introduit par transformation de la souche Top10. Les transformants sélectionnés sur LB Gm ont été criblés par digestion de leur plasmide par *Eco*RI et *Xho*I et validés par séquençage.

1.1.1.2. Construction du plasmide pEXG2::PA_P_C

Le promoteur P_C a été amplifié à partir du plasmide pEXG2 par l'enzyme Phusion® avec les amorces PA_Pc_R et PA_Pc_F en utilisant une Tm de 50°C. Les séquences adjacentes au promoteur de *pvdS* ont été amplifiées avec les couples d'amorces correspondants (PA_pvdS_amF / PA_pvdS_P_C_amR et PA_pvdS_P_C_avF et PA_pvdS_avR) avec la même polymérase et à une Tm de 54°C. Par PCR de fusion, il a été possible d'obtenir la cassette de substitution permettant l'introduction du promoteur P_C dans le chromosome de la souche PAO1. Cependant, il n'a pas été possible d'obtenir des transformants après digestion et ligation au vecteur pEXG2. Des clonages InFusion™ ont été réalisés mais aucun transformants n'ont été obtenus (Carte disponible Annexe 5).

1.1.2. Substitution du promoteur natif de pvdS par le promoteur araC/P_{BAD}

Le plasmide pEXG2::PA_P_{BAD} a été inséré au sein de la souche PAO1 par conjugaison triparentale. Les clones ayant intégré le plasmide ont été sélectionnés sur boîte LBGm$_{30}$Ch$_{10}$. Après sélection sur sucrose, puis isolements sur LB et LB Gm, les clones ne poussant que sur LB ont été criblés par PCR par amplification de la région contenant le promoteur de *pvdS*. Les amorces PA_verif_F et PA_verif_R ont été utilisées avec l'enzyme DreamTaq et à une Tm de 58°C. En effet, l'amplicon attendu en cas de substitution est de 2,7 kb, contre 1,6 pour la souche avec le promoteur sauvage (voir Figure 15, ligne 1 et 2). Après vérification au séquençage, le clone correspond à ligne 2 contient bien le promoteur P_{BAD} à la place du promoteur natif, il est appelé « PA_P_{BAD} ».

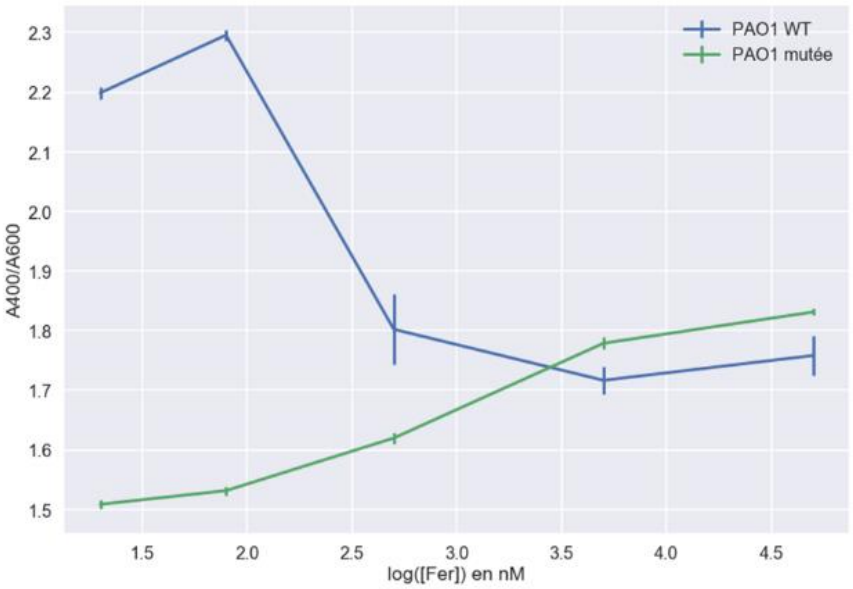


Figure 16 - Représentation graphique de l'évolution du ratio A400/A600 (production de pyoverdine sur la croissance) en fonction du logarithme de la concentration en Fer ajouté dans le milieu de culture après 10h. PAO1 mutée : PA_P_{BAD}.

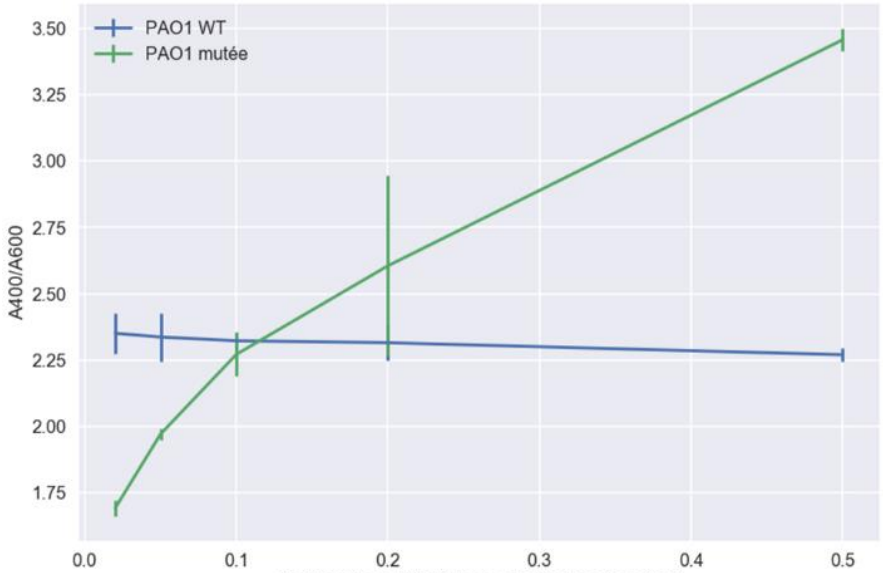


Figure 17 - Représentation graphique de l'évolution du ratio A400/A600 (production de pyoverdine sur la croissance) en fonction du pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu de culture après 10h. PAO1 mutée : PA_P_{BAD}.

1.1.3. Etude de la production de pyoverdine par la souche « PA_P_{BAD} »

1.1.3.1. Etude de la production de pyoverdine sous différents paramètres

La production de pyoverdine par la souche PA_P_{BAD} a été évaluée par rapport à la souche sauvage PAO1 en milieu CAA au TECAN™ Infinite M200 pendant 24h à 25°C. Des gammes de concentrations en Fer et en arabinose ont été testées afin d'évaluer la dépendance de la production de la pyoverdine par rapport au métal et par rapport à l'arabinose. La croissance (DO_{600nm}) et la production de pyoverdine (DO_{400nm} et fluorescence) sont mesurées toutes les demi-heures selon le protocole disponible dans le Matériel et Méthode. L'évolution du ratio de la DO_{400nm} sur la DO_{600nm} (A400/A600, production de pyoverdine normalisée à la croissance) dans le temps en fonction de la concentration en Fer III ou du pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu est présenté en Annexes 6 et 7. On remarque que la production de pyoverdine est maximale à 10h de culture. De ce fait, le ratio A400/A600 en fonction de la concentration en fer ou du pourcentage d'arabinose a été comparée après 10h de culture. Concernant la souche PAO1 sauvage, on observe que plus la concentration en fer dans le milieu est forte, plus la production de pyoverdine diminue (le ratio A400/A600 baisse jusqu'à atteindre un plateau entre 1,7 et 1,8). Au contraire pour la souche PA_P_{BAD}, la production de pyoverdine est faible et indépendante de la concentration en fer dans le milieu (le ratio reste inférieur ou égal à 1,8 – Figure 16). Lorsque l'on supplémente le milieu en arabinose, cela ne semble pas avoir d'incidence sur la production de pyoverdine pour la souche sauvage. En revanche, pour la souche PA_P_{BAD}, l'augmentation de la production de pyoverdine est dépendante de la concentration en inducteur arabinose dans le milieu (le ratio A400/A600 atteignant 3,5 lorsque le milieu est supplémenté à 0,5% - Figure 17).

1.1.3.2. Analyse de l'expression différentielle de pvdS

Afin de démontrer que le phénotype observé chez la souche PA_P_{BAD} est dû à la substitution du promoteur de *pvdS* par le promoteur *araC*/P_{BAD}, une analyse de la transcription de *pvdS* en milieu CAA supplémenté ou non en arabinose a été effectuée. Pour cela, des cultures en Falcon 5 mL de la souche PA_P_{BAD} et de la souche sauvage ont été réalisées dans les conditions souhaitées, les ARN totaux ont été extraits après 8h de culture et les cDNA synthétisés. Une qPCR a ensuite été réalisée en ciblant les gènes *pvdS* et *uvrD*. Cela a permis de démontrer pour la souche PA_pBAD que l'ajout de 0,5% d'arabinose en CAA permet d'augmenter le nombre de transcrit *pvdS* entre 35 et 85 fois par rapport à la condition sans induction.

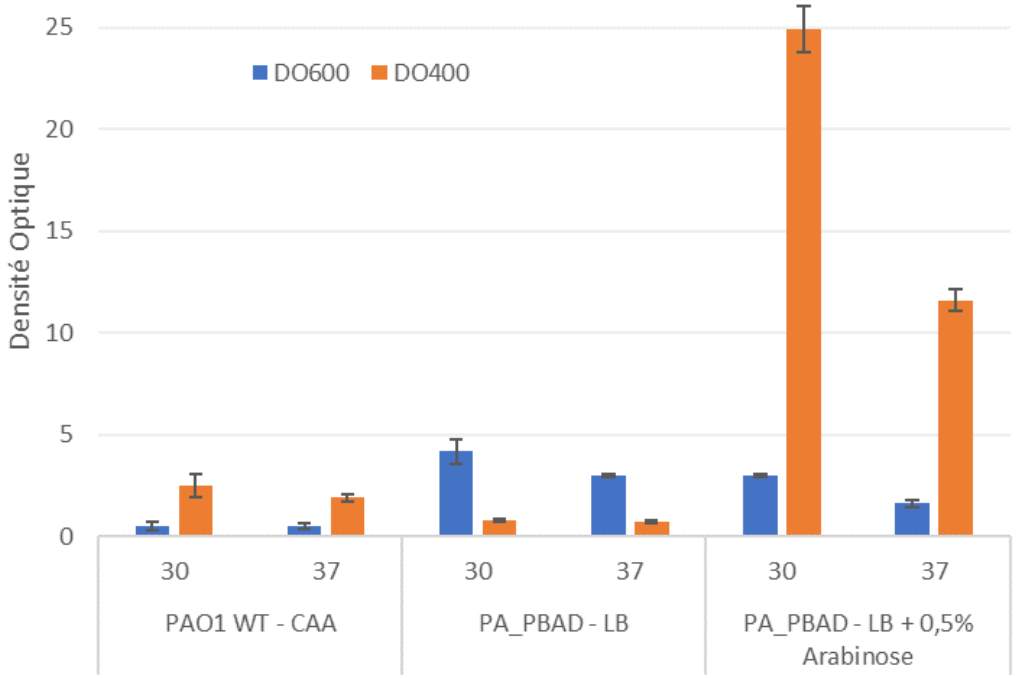


Figure 18 – Densité Optique obtenue à 400nm (densité cellulaire) et 600nm (production de pyoverdine) après 24h de culture en Falcon 5 mL en milieu LB ou LB+0.5% d'arabinose pour la souche PA_P_{BAD}, et en milieu CAA pour la souche PAO1 sauvage.

1.1.3.3. Comparaison des quantités maximales de pyoverdine produites par la souche PA_P_{BAD} et la souche sauvage

Les précédents résultats ayant montré pour la souche PA_P_{BAD} une indépendance de la production de pyoverdine par rapport au fer, la production en milieu riche a été évaluée. Il a également été testé différentes températures de production (30 et 37°C). Après 24h de culture, la biomasse évaluée par la DO_{600} était 9 fois plus importante en milieu LB pour la souche PA_P_{BAD} que celle de PAO1 sauvage en milieu CAA. Elle est 6 fois plus importante avec l'ajout de 0,5% d'arabinose dans le milieu (Figure 18, barres bleues). Après centrifugation des cultures et récupération du surnageant, la production de pyoverdine a également été évaluée par la DO_{400}. D'après les résultats obtenus, cette dernière est meilleure à 30°C qu'à 37°C, que ce soit avec la souche sauvage ou la souche mutée (Figure 18, barres oranges). Sans induction par l'arabinose, la souche mutée produit une faible quantité de pyoverdine (environ 3 fois moins importante que la souche sauvage). Lorsque l'on ajoute de l'arabinose à 0,5% dans le milieu de culture, la production devient 10 fois plus importante que la souche sauvage à 30°C.

La concentration massique de pyoverdine produite par la souche PA_P_{BAD} en LB arabinose et celle de la souche sauvage en milieu carencé en fer ont été calculées. La concentration massique obtenue avec la souche « PA_P_{BAD} » est de 2,01 (+/- 0,09) g/L à 30°C. En comparaison, la souche PAO1 sauvage en milieu CAA permet d'obtenir à 30°C 0,20 (+/- 0,04) g/L de pyoverdine. La production maximale de pyoverdine obtenue avec la souche PA_P_{BAD} est donc 10 fois plus importante que celle obtenue avec la souche sauvage.

1.2. Conception d'une souche châssis chez *P. putida* KT2440

1.2.1. Construction des plasmides pEXG2::PP_P_{BAD} et pEXG2::PP_P_C

Le second objectif de mon stage était de développer une souche châssis chez la souche KT2440 par la même stratégie expérimentale. Pour cela, deux autres clonages ont été entrepris pour permettre la substitution du promoteur natif de *pvdS* par le promoteur inductible *araC*/P_{BAD} (plasmide pEXG2::PP_P_{BAD}), ou par le promoteur constitutif de cassette des intégrons de classe I P_C (plasmide pEXG2::PP_P_C).

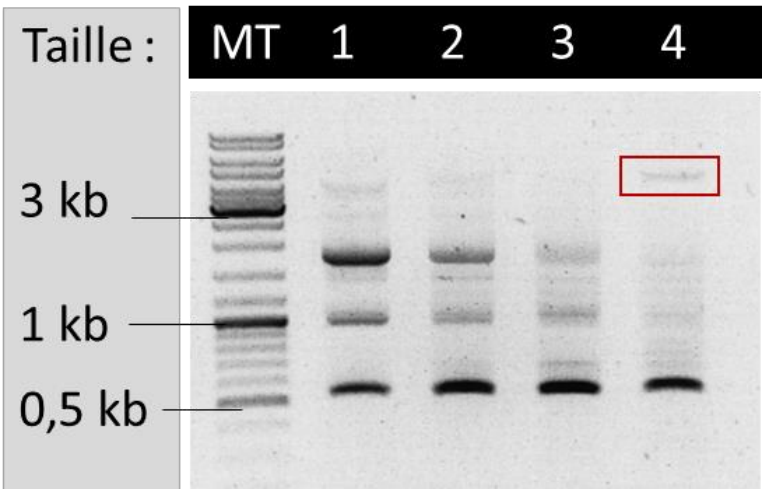


Figure 19 - Migration sur gel d'agarose 1% des PCR de fusion de la cassette permettant la substitution du promoteur natif de *pvdS* par le promoteur P_C chez la souche KT2440 avec différentes températures d'hybridation : 1 = 50°C, 2 = 56°C, 3 = 61°C, 4 = 65°C. En rouge est entouré la bande correspondant à la cassette à la taille attendue (2,6 kb). Marqueur de taille = MT.

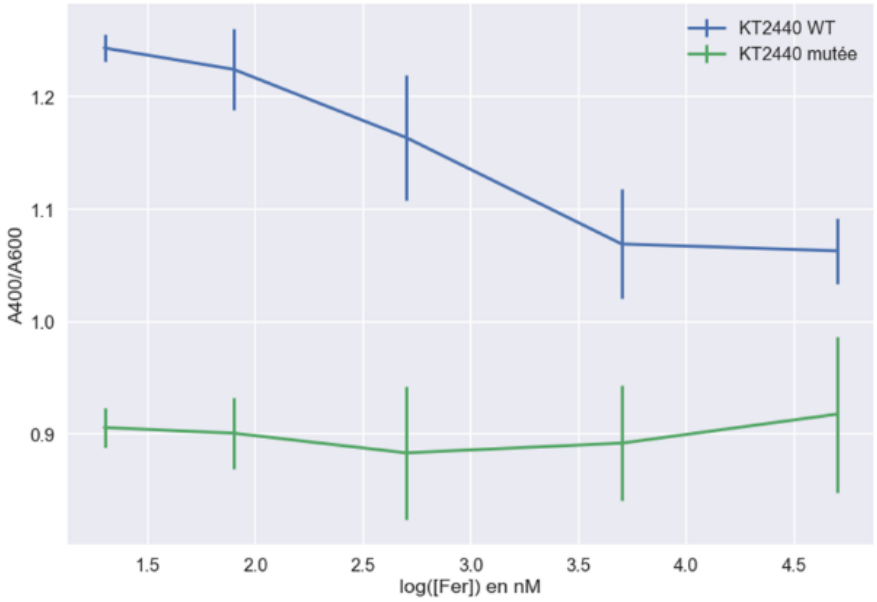


Figure 20 - Représentation graphique de l'évolution du ratio A400/A600 (production de pyoverdine sur la croissance) en fonction de la concentration en Fer ajouté dans le milieu. KT2440 mutée : PP_P_{BAD}.

1.2.1.1. Construction du plasmide pEXG2::PP_P_{BAD}

A partir d'extractions d'ADN génomiques de *P. putida* KT2440, les séquences nucléiques de 700 pb entourant le promoteur du gène *pvdS* ont été amplifiées par l'enzyme Phusion® avec les couples d'amorces PP_pvdS_amF/ PP_pvdS_P_{BAD}_amR pour la séquence en amont et PP_pvdS_P_{BAD}_avF / PP_pvdS_avR pour la séquence en aval, et avec une Tm de 54°C. La séquence en amont du promoteur a nécessité une PCR de niche, c'est-à-dire une réamplification selon les mêmes conditions d'un amplicon obtenu. La fusion de la cassette de substitution a également été réalisée par PCR avec les amorces PP_pvdS_amF et PP_pvdS_avR. Le programme utilisé est identique à la construction « PA_P_{BAD} » et les résultats sont disponibles Figure 14, colonne 2. Le plasmide et la cassette ont ensuite été digérés par les enzymes *Eco*RI et *Xho*I puis liées covalemment par l'action de l'ADN ligase du phage T4. Le produit de ligation a été inséré au sein de souches Top10 par transformation et les transformants ayant poussés sur boîte sélective ont été criblées par digestion de leurs plasmides par *Eco*RI et *Xho*I puis vérifiés par séquençage.

1.2.1.2. Construction du plasmide pEXG2::PP_P_C

Le promoteur Pc a été amplifié par l'enzyme High Fidelity Phusion® DNA Polymerase avec les amorces PP_P_C_R et PP_P_C_F à une température d'hybridation de 50°C. Les séquences adjacentes au promoteur de *pvdS* ont été amplifiées avec les couples d'amorces PP_pvdS_amF/ PP_pvdS_P_C_amR pour la séquence en amont et PA_pvdS_P_C_avF/PA_pvdS_avR pour la séquence en aval avec la même polymérase et à une température d'hybridation de 54°C. Les PCR de fusion ont été réalisée à une température d'hybridation optimale de 65°C (Figure 19, colonne 4). Toutefois, aucun transformant n'a été obtenu après digestion / ligation dans pEXG2 et transformation. De ce fait, un clonage InFusion™ a été réalisé. Le produit de clonage a été inséré chez la souche Top10 par transformation. Les transformants ont été criblés sur boîte LB Gm_{15}, puis leurs plasmides ont été digérés par les enzymes *Eco*RI et *Xho*I. Ceux présentant l'insert ont été vérifiés au séquençage.

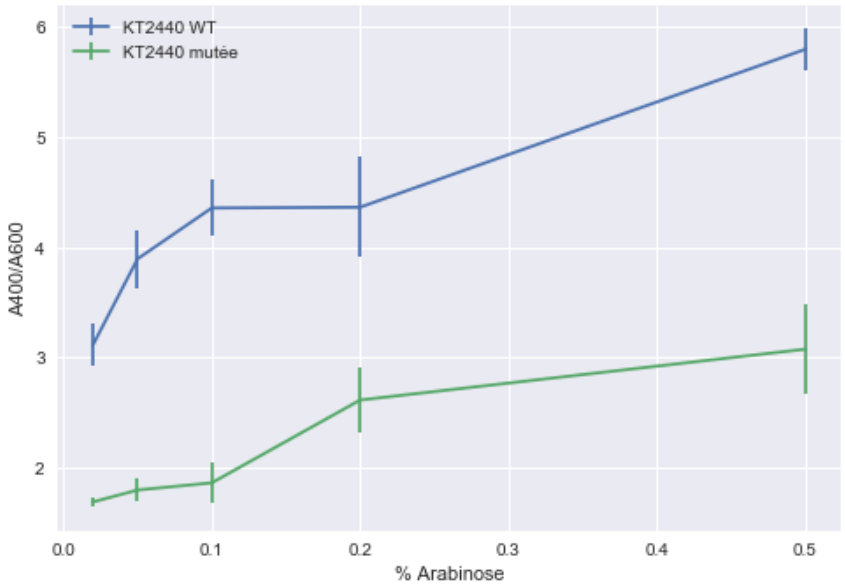


Figure 21 - Représentation graphique de l'évolution du ratio A400/A600 (production de pyoverdine sur la croissance) en fonction du pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu. KT2440 mutée : *P. putida* KT2440 dont le promoteur natif de *pvdS* a été substitué par le promoteur *araC*/P_{BAD}.

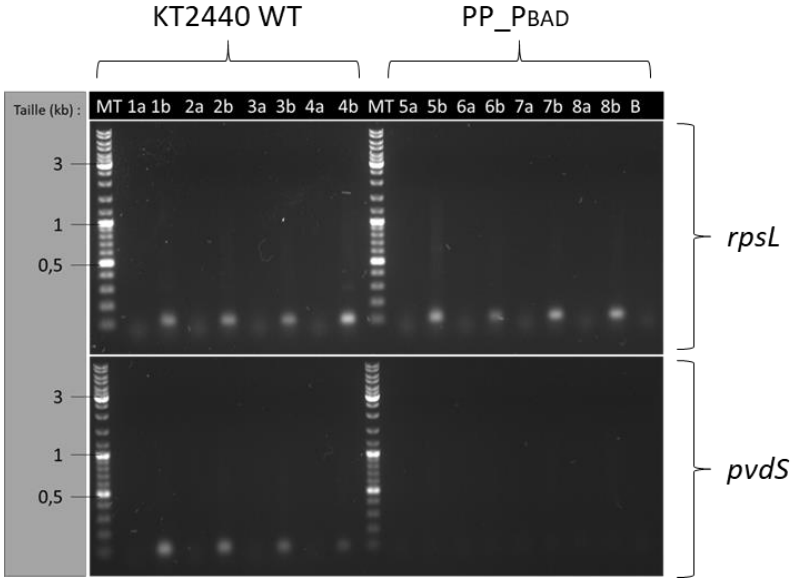


Figure 22 - Evaluation qualitative par PCR de l'expression de *pvdS* chez la souche KT2440 sauvage (1, 2, 3, 4) ou PP_P_{BAd} (5, 6, 7, 8). Haut : Amplification des ADNc correspondant à l'expression de *rpsL*. Bas = Ceux liés à l'expression de *pvdS*. Les souches ont été cultivées en milieu CAA (1, 5), CAA + 2% d'arabinose (2, 6), LB (3, 7), LB + 2% d'arabinose (4, 8) Des témoins sans rétrotranscription ont été réalisés et notés (a). Ceux ayant subi une rétrotranscription sont notés (b). B = blanc de PCR. Amorces utilisées pour *pvdS* : pvdS_R et pvdS_F ; et pour *rpsL* : rpsL_R et rpsL_F. Marqueur de taille = MT.

1.2.2. Substitution du promoteur natif de pvdS par les promoteur araC/P_{BAD} et P_C

Le plasmide pEXG2::PP_P_{BAD} a été inséré au sein de la souche KT2440 par conjugaison triparentale. Le criblage des conjuguants s'est déroulé de la même façon qu'avec la souche PAO1. Lors du criblage sur LB et LB Gm_{15}, un criblage par PCR sur colonie avec les amorces PP_verif_F et PP_verif_R a permis de mettre en évidence les clones ayant substitué le promoteur natif de *pvdS* par le promoteur *araC*/P_{BAD}, avec une Tm de 58°C (voir Figure 15, colonnes A et B). L'amplicon attendu en cas de substitution est de 2,7 kb, contre 1,6 pour la souche avec le promoteur sauvage. Les amplicons des mutants ont été vérifiés au séquençage. Concernant le plasmide pEXG2::PP_P_C, aucun conjuguant n'a jusqu'alors été obtenu.

1.2.3. Etude phénotypique de la souche « PP_P_{BAD} »

1.2.3.1. Etude de la production de pyoverdine sous différents paramètres

La production de pyoverdine par la souche PP_P_{BAD} a été évaluée par rapport à la souche sauvage en milieu CAA au TECAN™ Infinite M200 pendant 24h à 25°C. Comme pour la souche PA_P_{BAD}, des gammes de concentrations en Fer et en arabinose ont été testées. La croissance (DO_{600nm}) et la production de pyoverdine (DO_{400nm} et fluorescence) sont mesurées toutes les demi-heures selon le protocole disponible dans le Matériel et Méthode. L'évolution du ratio de la DO_{400nm} sur la DO_{600nm} (A400/A600, production de pyoverdine normalisée à la croissance) dans le temps en fonction de la concentration en Fer III ou du pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu est présenté en Annexes 8 et 9. Comme observé chez la souche PAO1, l'expression est maximale à 10h de culture. De ce fait, le ratio A400/A600 en fonction de la concentration en fer ou du pourcentage d'arabinose a été comparée à 10h de culture. Comme attendu, on remarque que la souche KT2440 sauvage produit davantage de pyoverdine lorsque le milieu est carencé en fer atteignant un ratio A400/A600 de 1,3 au maximum. L'ajout de fer induit progressivement une baisse de la production de pyoverdine (le ratio A400/A600 tend vers un plateau à 1,05). Au contraire, la production de pyoverdine par la souche PP_P_{BAD} est indépendante de la concentration en fer dans le milieu de culture (elle fournit un ratio stable de 0,9 – Figure 20). L'ajout d'arabinose dans le milieu de culture semble induire une augmentation du ratio A400/A600, que ce soit avec la souche sauvage ou mutée (Figure 21). Concernant la souche sauvage, le ratio passe de 3 à 6 avec l'ajout de 0,5% d'arabinose et de 1 à 3 pour la souche PP_P_{BAD}.

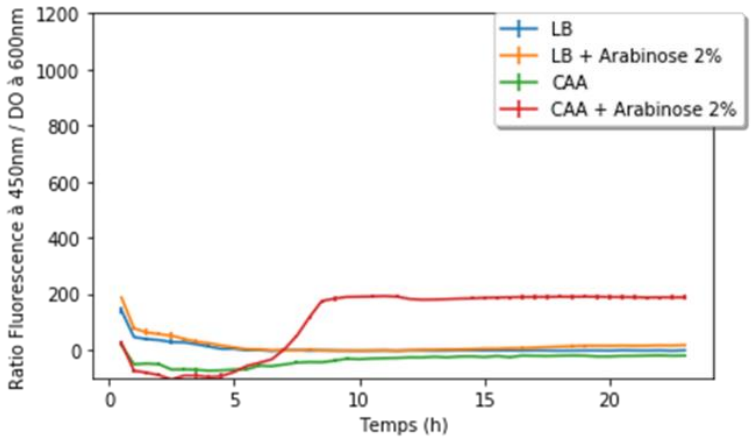


Figure 23 - Evolution de la production de pyoverdine (Ratio Fluorescence à 450 nm / DO à 600 nm) par rapport au milieu de culture chez la souche PP_P_{BAD} (CAA ou LB supplémenté ou non en Arabinose 2%).

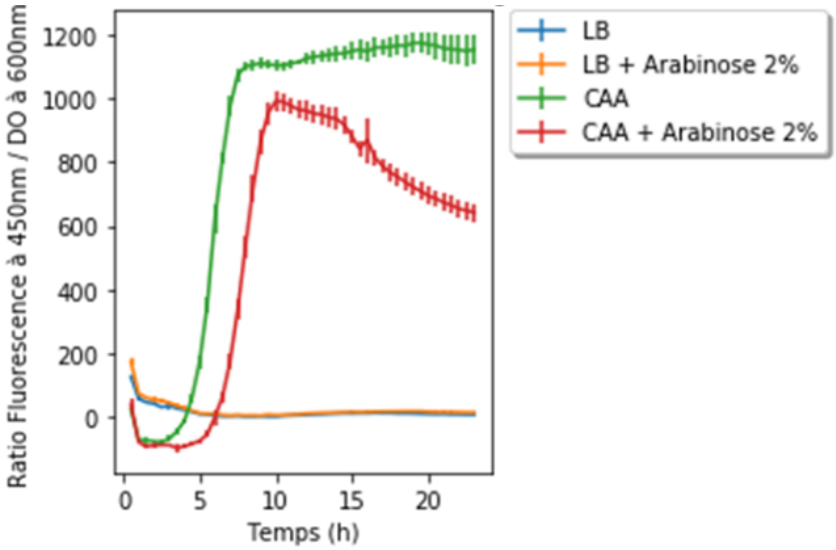


Figure 24 - Evolution de la production de pyoverdine (Ratio Fluorescence à 450 nm / DO à 600 nm) par rapport au milieu de culture chez la souche KT2440 sauvage (CAA ou LB supplémenté ou non en Arabinose 2%).

La production de pyoverdine a également été évaluée de la même manière en milieu riche LB supplémenté ou non en inducteur arabinose (Figures 23 et 24 – le ratio utilisé est celui de la fluorescence sur la densité cellulaire à cause d'un problème de mesure de la DO_{400}). Pour augmenter l'expression de *pvdS*, 2% d'arabinose sont ajoutés au milieu. Comme attendu, la souche KT2440 sauvage produit de la pyoverdine en milieu CAA supplémenté ou non en arabinose et n'en produit pas en milieu riche en fer (LB ou LB + 2% d'arabinose). Cette production atteint un plateau après 8h de culture. Concernant la souche PP_$P_{BAD,}$ les résultats montrent qu'elle produit de la pyoverdine en milieu CAA + 2% d'arabinose et qu'elle n'en produit pas en milieu CAA. Néanmoins, cette production semble également être stoppée après 8h de culture. De même, elle ne produit pas de pyoverdine en milieu LB qu'il soit supplémenté ou non en inducteur arabinose. En comparaison, la souche sauvage produit au maximum jusqu'à 10 fois plus de pyoverdine que PP_$P_{BAD.}$

1.2.3.2. Analyse de la transcription de *pvdS*

Une analyse qualitative de l'expression de *pvdS* en milieux LB ou CAA supplémentés en arabinose a été effectuée. Pour cela, les ARN totaux ont été extraits de cultures en Falcon 5 mL de la souche PP_P_{BAD} après 24h d'incubation. Une rétro-transcription a été effectuée, puis les ADNc ont été synthétisés. Une PCR a été réalisée pour amplifier les transcrits issus des gènes *pvdS* et *rpsL*. Les résultats sont disponibles Figure 22. Concernant la souche sauvage, on observe une production maximale en milieu CAA (panel du bas à gauche, colonnes 1b et 2b). Néanmoins, elle semble tout de même exprimer le gène *pvdS* en milieu LB (panel du bas à gauche, colonnes 3b et 4b). La souche mutée, elle, ne semble pas avoir de transcrits de *pvdS* après 24h de culture puisqu'aucune bande n'apparait sur le gel, quel que soit la condition testée (panel du bas à droite), et que le gène de ménage testé fourni des résultats équivalents à ceux du sauvage (panels du haut).

2. Modification de la spécificité de PVDD pour son substrat

En parallèle de la conception de souches châssis pour la production de pyoverdine, une étude de la permissivité du domaine d'adénylation du module 1 de l'enzyme PvdD a été entreprise. Cette enzyme provient de la voie de biosynthèse de *P. putida* KT2440, et le module 1 permet l'incorporation de l'acide aminé glycine. La stratégie consiste à modifier le site actif du domaine d'adénylation afin de moduler la spécificité de substrat pour qu'il puisse accepter l'acide aminé PgGly au lieu de la glycine (Figure 10).

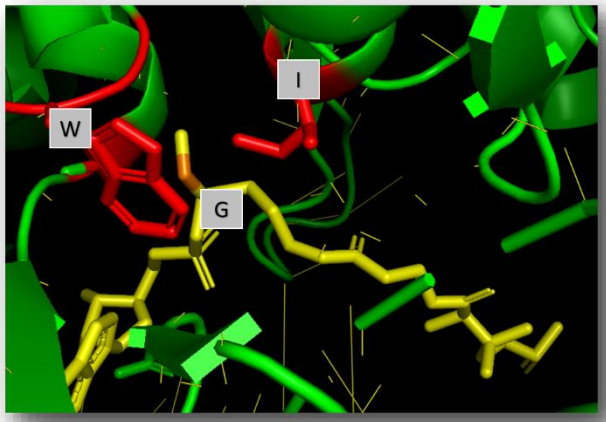


Figure 25 - Visualisation de la poche de reconnaissance du substrat dans le domaine d'adénylation de DhbF. DhbF est coloré en vert. En jaune est identifié l'inhibiteur glycine-adénosine-vinylsulfonamide. G = Glycine ; structure obtenue par diffraction aux rayons X (Tarry *et al*, 2017). En rouge sont indiqués les résidus W et I situés à moins de 5Å du carbone Cα de la Glycine. W = Tryptophane ; I = Isoleucine

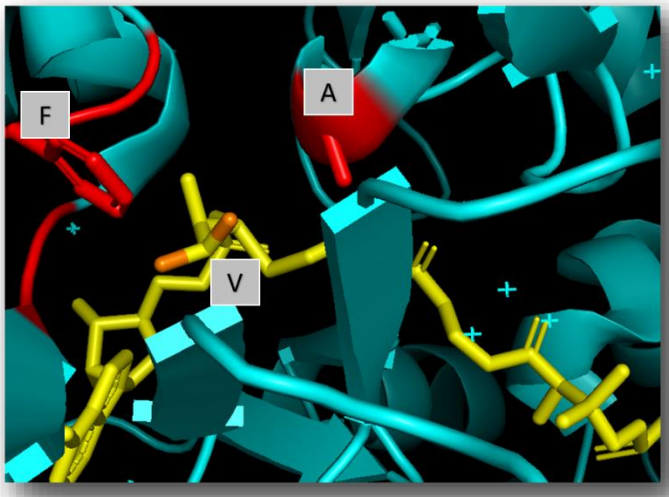


Figure 26 - Visualisation site actif du domaine d'adénylation de PA1221. PA1221 est coloré en bleu ; structure obtenue par diffraction aux rayons X (Mitchell *et al*, 2012). En jaune est identifié l'inhibiteur valine-adénosine-vinylsulfonamide. V = Valine. En rouge sont indiqués les résidus F et A situés à moins de 5Å des carbones de la chaîne latérale de la Valine. F = Phénylalanine ; A = Alanine.

Les mutations se font *in vivo* et la structure finale de la pyoverdine obtenue avec les souches mutées sera comparée à celle de la souche sauvage.

2.1. Développement de la stratégie par analyse bio-informatique

Le domaine A du module 1 de PvdD (M1_dA_PvdD) n'a pas de structure tridimensionnelle connue. Or, ces domaines présentent une grande similarité structurale entre eux (Stachelhaus *et al*, 1999). Nous avons donc décidé d'explorer le site actif de domaines A dont la structure a été résolue et dont la séquence peptidique est proche de M1_dA_PvdD. Un alignement des 330 acides amiéns correspondant au domaine A (domaine délimité grâce au prédiction antiSMASH) a été réalisé par $BLAST_P$ contre la banque de données PDB. Il montre que la NRPS DhbF de *Geobacillus* sp. Y4.1MC1 présente la plus forte homologie avec M1_dA_PvdD (42% d'homologie entre les séquences primaires – Numéro PDB : 5u89, Tarry *et al*, 2017). Comme M1_dA_PvdD, DhbF prend également en charge la glycine. La NRPS PA1221 produit par *P. aeruginosa* PAO1 est un bidomaine A-T dont la structure a été élucidée (Numéro PDB : 4dg9, Mitchell *et al*, 2012). Elle présente 32% d'homologie avec M1_dA_PvdD et reconnait l'acide aminé valine. La valine étant un acide aminé possédant une chaine latérale hydrophobe, la comparaison de ces deux structures permet de comprendre l'agencement du site actif en fonction de l'encombrement du substrat.

Cette comparaison s'est réalisée dans le logiciel PyMOL™. Les résidus situés à 5Å de la chaîne latérale du substrat ont été mis en évidence. Ceux qui diffèrent entre les deux structures ont de grandes chances d'avoir un impact dans le volume de la poche de reconnaissance (voir Figures 25 et 26). Cette stratégie a permis d'identifier 2 résidus qui diffèrent entre DhbF et PA1221. Dans la séquence de DhbF, ce sont les résidus W et I. Dans PA1221, ce sont les résidus F et A, qui ont des chaines latérales hydrophobes induisant un encombrement stérique plus faible que W et I. Cela s'explique par le fait que PA1221 incorpore un acide aminé dont la chaine latérale est plus grande. Cela fournit donc un repère pour les substitutions à réaliser dans PvdD afin d'incorporer la PgGly ayant une chaîne latérale hydrophobe plus grande que la glycine.

Par alignement des séquences peptidiques de DhbF, PA1221 et de M1_dA_PvdD, les résidus identifiés à moins de 5Å de la chaîne latérale du substrat ont été retrouvés dans PvdD. Cela laisse présager que leurs sites actifs ont une configuration similaire. PvdD possède également dans sa séquence les résidus W et I, retrouvés dans DhbF, aux positions respectives 800 et 701 (Alignement disponible Annexe 10).

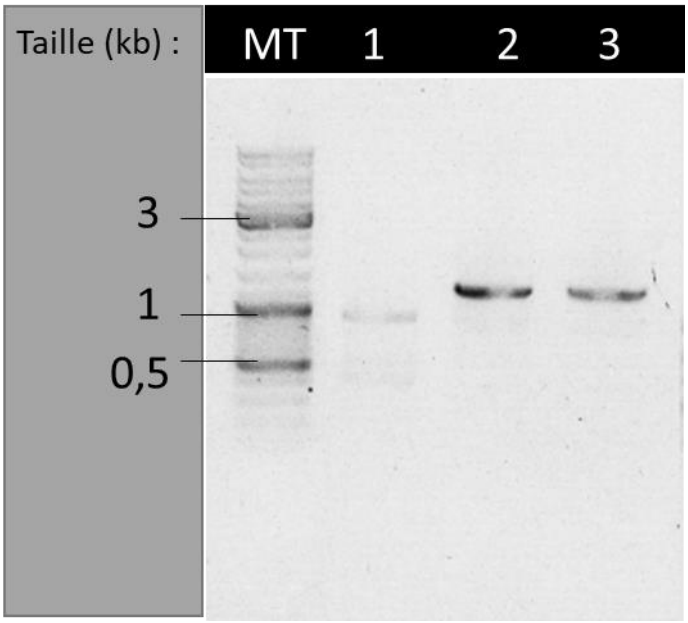


Figure 27 - Vérification de l'introduction de la mutation "W800V" dans le génome de la souche KT2440. Trois conjuguants ont été testés par PCR sur colonie ciblant la séquence génomique codant pour le module 1 de PvdD, puis digestion par l'enzyme *Van*91I. Le clone (1) ne possède pas la mutation puisque l'amplicon est digéré (taille : 900 et 400 pb). Les deux autres clones n'ont pas été digérés (taille : 1,3 kb). Ils ont été vérifiés au séquençage.

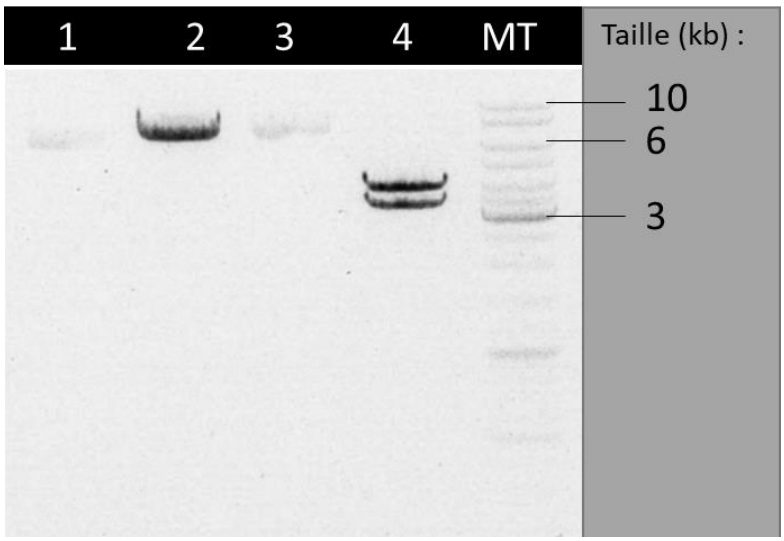


Figure 28 - Vérification de l'introduction de la mutation "I701A" par digestion de l'enzyme *Eco*RV sur le vecteur plasmidique pEXG2::M1_PvdD_W800V à partir de deux clones Top10 (1 et 2 ; 3 et 4). Légende : 1, 2 et 3 = plasmide non digéré (taille = 6,5 kb), 4 = plasmide digéré (tailles = 3,4 et 3 kb). Le clone ayant fourni le plasmide correspondant aux lignes 1 et 2 possède l'insert.

L'idée est donc de cibler les résidus W800 et I701 dans la séquence de PvdD et de les substituer respectivement par A et F afin d'agrandir la poche de reconnaissance du substrat. Il a été imaginé qu'une substitution du résidu W800 par un résidu V permettrait d'augmenter davantage le volume de cette dernière. L'objectif fixé par cette approche est donc d'obtenir les mutants de PvdD W800F, W800V, ainsi que le double mutant W800V/I701A.

2.2. Introduction des mutations dans le chromosome

Pour introduire les mutations dans le génome, un plasmide a d'abord été construit et contient la séquence chromosomique qui entoure la mutation ciblée. L'intégration du plasmide dans la souche permettra l'apparition de deux évènements de crossing-over et donc l'introduction de la mutation. Grâce à un travail réalisé par deux stagiaires de Master 1 Biologie synthétique, la séquence nucléique correspondant au domaine d'adénylation du module 1 de PvdD a été amplifiée par PCR, puis introduite par InFusion™ au sein du vecteur pEXG2, formant le plasmide pEXG2::M1_PvdD. Par la suite, j'ai introduit deux mutations au sein du domaine : « W800F » et « W800V », et la mutation « I701A » sur le plasmide contenant « W800V ». La substitution du résidu W induit le retrait d'un site de restriction de *Van*91I. De même, celle du résidu I induit le retrait d'un site de restriction *Eco*RV-FD. La vérification de la présence de la mutation est donc facilement réalisable par digestion facilitant ainsi le criblage.

Par conjugaison triparentale, les plasmides ont été transféré à la souche KT2440 ce qui a permis d'obtenir les souches PP_PvdD_W800V et PP_PvdD_W800F (Figure 27). Le double mutant PP_PvdD_W800V,I701A est en cours de criblage (Figure 28). Des cultures en milieu CAA pendant 24h à 30°C ont permis de produire de la pyoverdine à partir de ces deux simples mutants et de la souche sauvage. Les pyoverdines obtenues ont été purifiées en batch avec la résine XAD-5 comme présenté dans le matériel et méthode pour être ensuite envoyées en analyse par spectromètre de masse. L'objectif est de voir si les mutations entraînent une modification de la structure de la pyoverdine.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans l'équipe « Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications », un grand nombre de projets de recherches porte sur la pyoverdine, comme la production de pyoverdine conjuguée à des antibiotiques. Néanmoins, ces applications sont aujourd'hui limitées par (i) une difficulté à produire de la pyoverdine en quantité importante et (ii) une impossibilité de conjuguer régiosélectivement ce sidérophore à d'autres molécules. Afin de faciliter leur développement, mon stage possède deux objectifs qui répondent à ces deux problèmes : (i) concevoir une souche châssis surproduisant la pyoverdine, et (ii) fonctionnaliser la pyoverdine afin de permettre une conjugaison régiosélective.

1. Concevoir une souche châssis

Le premier objectif de mon stage est de concevoir une souche châssis permettant la surproduction de la pyoverdine. Pour rappel, cette production est dépendante de la concentration en fer dans le milieu chez les souches *Pseudomonas* sauvages. Cette régulation est possible grâce à l'action du répresseur « Fur » dans la région promotrice de *pvdS*, le gène codant l'activateur transcriptionnel de la voie de biosynthèse. La stratégie adoptée consiste à substituer la séquence promotrice de *pvdS* par le promoteur inductible à l'arabinose *araC*/P_{BAD} ou par le promoteur constitutif $P_{C.}$ Premièrement, la preuve de concept a été réalisée au sein de la souche *P. aeruginosa* PAO1. Il s'agit de la souche modèle du laboratoire : des outils de biologie moléculaire sont utilisés en routine et la régulation de la pyoverdine y est particulièrement étudiée. Concernant la substitution du promoteur natif de *pvdS* par le promoteur P_C, il n'a pas été possible d'obtenir la construction envisagée. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer ce résultat. L'étape limitante a été le transfert du produit de clonage au sein de la souche Top10 par transformation. La plus probable est donc que le produit de clonage n'a pas été obtenu, par exemple à cause de structures secondaires se formant dans les fragments d'ADN utilisés. L'expression constitutive de *pvdS* peut également être toxique pour *E. coli*. Néanmoins, nous avons pu obtenir la souche PA_P_{BAD} qui permet l'expression de *pvdS* sous contrôle du promoteur P_{BAD}. PA_P_{BAD} s'est avérée être capable de produire de la pyoverdine de façon indépendante de la concentration en fer et dépendante de la concentration en arabinose dans le milieu. Grâce à cela, une production de la pyoverdine par la souche en milieu riche a pu être réalisée, ce qui permet d'atteindre des niveaux de production de 2 mg/ml, ce qui est 10 fois plus que la souche sauvage en milieu minimum. Cette production en milieu riche n'avait jamais été décrite auparavant dans la littérature.

Ces expériences ont donc démontré la possibilité de concevoir une souche *Pseudomonas* surproductrice de la pyoverdine. L'obtention de la souche PA_P_{BAD} amène des perspectives nouvelles : Elle est à ce jour testée dans des stratégies de désamiantage dans l'équipe où des quantités importantes de pyoverdines sont nécessaires. Toutefois, la surproduction de *pvdS* dans cette souche induit probablement une surexpression des autres gènes de virulence, l'utilisation de cette souche pour des fins biotechnologiques nécessite donc leur délétion afin de diminuer sa pathogénicité. L'entreprise Smaltis située à Besançon (25) travaille déjà sur cette thématique.

Pour suivre, nous avons cherchés à construire une souche *P. putida* KT2440 surproduisant la pyoverdine. Cette souche environnementale présente en effet un intérêt majeur en biotechnologie où elle est beaucoup utilisée (Nikel and Lorenzo, 2018). La souche PP_P_{BAD} semble avoir perdu la dépendance de la production de la pyoverdine par rapport à la concentration en fer. Cependant, il est difficile de conclure sur sa capacité à produire de la pyoverdine en présence de l'inducteur arabinose. En effet, une faible induction semble avoir été identifiée en milieu CAA lorsque l'on ajoute au milieu une grande quantité d'arabinose (2% contre 0,5% utilisé avec PA_P_{BAD} ; Figure 23). De plus, la production de pyoverdine n'est pas observée en milieu riche supplémenté de la même façon en inducteur. Une induction par l'arabinose a été observée chez la souche sauvage après 10h de culture en milieu CAA (Figure 21). Toutefois, lors de l'étude de la production de pyoverdine en milieux LB et CAA avec 2% d'arabinose, cette induction n'est pas apparue. Le facteur qui change entre ces deux expériences est la mesure utilisée pour estimer la production de pyoverdine, le premier utilisant la densité optique à 400 nm et le second la mesure de la fluorescence caractéristique de la pyoverdine. Il est donc possible que l'augmentation observée dans la première expérience soit un artéfact.

Afin de vérifier si l'induction observée en milieu CAA + 2% d'arabinose par PP_P_{BAD} est due à une expression induite de pvdS, une analyse qualitative des transcrits après 24h de culture a été réalisée, mais cette dernière n'a pas permis détecter de transcrits *pvdS*. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'interpréter ce résultat. L'analyse de l'évolution de la production de la pyoverdine par rapport au temps en milieu CAA + 2% d'arabinose, montre une interruption après 8h de culture. Il est donc possible que l'induction observée résulte de l'expression de *pvdS,* mais que cette dernière est stoppée après 8h par un facteur inconnu. Comme la PCR sur les ADNc a été réalisée à partir d'extraction à 24h de culture, cela peut expliquer l'absence de transcrits observés. Ce problème de production peut être expliqué par : (i) un problème lié au promoteur, (ii) un problème lié à une régulation par un facteur inconnu.

Il a déjà été démontré dans la littérature que le promoteur *araC*/P_{BAD} était fonctionnel chez la souche KT2440, fournissant une production maximale à 2% d'arabinose (Cook *et al*, 2018). Pour être certain que l'induction observée chez PP_P_{BAD} et durant les premières heures de cultures en milieu CAA + 2% d'arabinose est expliquée par une induction de *pvdS*, il est d'abord nécessaire de réaliser une analyse de son expression à intervalle de temps régulier par qPCR. Si le promoteur permet effectivement d'induire l'expression de *pvdS,* alors le problème est lié à la régulation de la voie de biosynthèse. La souche PP_P_C n'a pas été obtenue malgré de nombreuses tentatives de conjugaisons et de nombreux criblages. Il est possible que ce promoteur induit une expression trop importante de *pvdS* qui pourrait être toxique. PvdS est en effet un régulateur transcriptionnel et il est envisageable qu'il joue un rôle majeur dans la régulation d'autres voies que celle de la pyoverdine, comme observé chez la souche PAO1. Comme cité précédemment, la régulation de la voie de synthèse de la pyoverdine peut aussi expliquer les résultats observés. Une inhibition de l'expression de *pvdS* par un ou des facteurs inconnus doit agir en milieu LB et après 10h de culture en milieu CAA supplémentés en arabinose, et il sera nécessaire de l'identifier. La source de carbone ou le quorum-sensing peuvent être deux facteurs qui influent sur cette production de pyoverdine. Par exemple, Ren *el al* ont montré en 2004 que l'inhibition du quorum-sensing par un dérivé furanone inhibait également la production de sidérophore par la souche *P. putida* F1 alors qu'elle activait celle produite par la souche *P. aeruginosa* PAO1. L'une des stratégies pourrait donc être de faire croître la souche dans des milieux de cultures qui diffèrent par la source de carbone ou qui possèdent un inhibiteur de quorum-sensing.

2. Fonctionnalisation de la pyoverdine

La seconde partie de mon projet s'est concentré sur l'ingénierie enzymatique du module I de PvdD, une NRPS produite par *P. putida* KT2440 et incorporant un résidu glycine à la synthèse de la pyoverdine. L'objectif est de modifier la poche de reconnaissance du substrat du domaine d'adénylation afin de le rendre spécifique à la Propargylglycine, un acide aminé non naturel. Ne possédant pas la structure tridimensionnelle de ce module, il a tout de même été possible par une stratégie bio-informatique d'identifier des résidus clés impliqués dans l'accommodation du substrat. Deux simples mutants (PP_PvdD_W800V et PP_PvdD_W800F ont été obtenus et vérifiés au séquençage. Le double mutant PP_PvdD_W800V,I701 est en cours de criblage. Une première analyse de leur phénotype a permis de démontrer leur capacité à produire de la pyoverdine. Cependant, le mutant PP_PvdD_W800V semble en produire en faible quantité.

Cette différence de production peut être expliquée par une différence de spécificité pour le substrat : il est possible que ce mutant accepte un autre résidu que la glycine, comme la valine par exemple, mais avec une efficacité plus faible. Le mutant produisant de la pyoverdine à la hauteur de la souche sauvage peut également être permissif à un autre acide aminé sur le module ciblé, mais être encore capable d'incorporer de la glycine, fournissant deux ou plusieurs produits. Les pyoverdines produites par ces mutants ont été purifiées et vont être envoyées pour une analyse au spectromètre de masse afin de comparer leur structure avec celle d'origine. De précédentes études ont démontré qu'une seule mutation pouvait permettre l'incorporation d'un acide aminé non-naturel (Kries *et al*, 2014). Si les résultats démontrent un changement dans la structure peptidique de la pyoverdine, il sera intéressant de supplémenter les milieux de cultures en Propargylglycine afin de constater si cet acide aminé se retrouve dans la structure de la pyoverdine. La limite de cette approche a été la stratégie de mutagénèse. Il s'agit de la première tentative réalisée au sein du laboratoire sur cette souche bactérienne et elle a régulièrement nécessité un criblage conséquent. L'une des perspectives de cette approche est le développement d'outils de mutagénèse plus efficaces, comme le système CRISPR-Cas9 ce qui permettrait de pouvoir tester un plus grand nombre de mutants (Wu *et al*, 2019). Si les mutations ne permettent pas d'incorporer un résidu Propargylglycine, il serait nécessaire de construire un véritable modèle 3D de PvdD.

Une autre approche a été développée au cours de ce stage afin de développer un criblage facilité de mutants PvdD *in vitro.* Pour cela, la totalité du module 1 de PvdD (3 kb environ) a été introduit au sein du vecteur pET20b(+) pour permettre son expression induite par l'IPTG et l'introduction d'un His-Tag en région C-terminale. Le produit de clonage a été transformée chez *E. coli* BL21 (DE3), une souche d'expression. Des cultures à différentes concentrations en inducteur IPTG et sous différentes températures de croissance ont été réalisées, mais n'ont pas permis d'obtenir une protéine soluble. D'autres souches d'expression ont alors été testées : BL21 Star (DE3) permettant une meilleure stabilité des ARN messagers, Origami B (DE3) qui optimise la formation des ponts disulfures, et Arctic Express (DE3) qui exprime des protéines chaperonnes pour retrouver plus facilement la structure de la protéine native. Dans tous les cas, la protéine semble être dans les corps d'inclusions. Cette approche peut donc être approfondie. Pour résoudre les problèmes de solubilité, le His-tag peut être remplacé par un tag SUMO qui stabilise la protéine (Butt *et al*, 2005). D'autres amorces peuvent être utilisées afin d'agrandir ou réduire la séquence insérée. Une autre stratégie et de déplacer le His-tag en région N-terminale afin de voir si cela a un effet.

Les travaux réalisés pendant ce stage ont donc permis d'obtenir une souche châssis issue de *P. aeruginosa* PAO1 surexprimant la pyoverdine. Cette dernière ouvre des perspectives d'applications dans le laboratoire. De même, le stage a permis de fournir des premiers résultats appréhendant la construction d'une souche châssis chez *P. putida* KT2440. Des premiers résultats ont également été obtenus pour la fonctionnalisation de la pyoverdine de la souche KT2440. Le développement d'une stratégie bio-informatique a permis de cibler les mutations à introduire dans le gène codant le NRPS PvdD, qui ont ensuite été réalisées expérimentalement. L'analyse de leur permissivité pour la Propargyglycine sera réalisée prochainement.

ANNEXE 1 : AMORCES UTILISEES DANS CE TRAVAIL CHEZ LA SOUCHE PAO1

Nom de l'amorce	Séquence	Remarque	Tm (°C)
		Clonage – *P. aeruginosa* PAO1	
PA_pBAD_R	gaaatcaccttgctg**ttag cccaaaaaaacgg**	Amplification du promoteur *araC*/PBAD à partir de pEXG2 + 15 nt d'homologie* avec la séquence d'homologie en amont du *pvdS* de *P.aeruginosa* PAO1	64
PA_pBAD_F	ttcgcagcggctatt**ttatg acaacttgacggc**	Amplification du promoteur *araC*/PBAD à partir de pEXG2 + 15 nt d'homologie* avec la séquence d'homologie en amont du *pvdS* de *P.aeruginosa* PAO1	66
PApvdS_am_F	cccgggctcgagctc**ttgc agctcgccggccaattg**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.aeruginosa* PAO1 en amont du gène *pvdS* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2. Site de restriction de *Xho*I indiqué en surlignage.	64
PApvdS_am_R	**aatagccgctgcgaatg atgga**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.aeruginosa* PAO1 en amont du gène *pvdS*	60
PApvdS_avR	taccgaattcgagct**ggga aaggagcgctgcgaaa**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.aeruginosa* PAO1 en aval de *pvdS* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2. Site de restriction d'*Eco*RI indiqué en surlignage.	60
PApvdS_pBAD_avF	**cagcaaggtgatttccat gtcg**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.aeruginosa* PAO1 en aval de *pvdS* pour l'association avec le promoteur *araC*/PBAD	58
PApvdS_Pc_avF	**atgtcggaacaactgtct acc**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.aeruginosa* PAO1 en aval de *pvdS* pour l'association avec le promoteur Pc	56
PA_Pc_R	cagttgttccgacat**cgttg ctgctccataaca**	Amplification du promoteur Pc + 15 nt d'homologie* avec la séquence en amont de *pvdS* de *P.aeruginosa* PAO1	66
PA_Pc_F	ttcgcagcggctatt**cttat tacgcgtaattct**	Amplification du promoteur Pc + 15 nt d'homologie* avec la séquence en amont de *pvdS* de *P.aeruginosa* PAO1	64
PA_verifHRpvdS_F	**ggatacaccggagagga atagc**	Amplification de la séquence promotrice de *pvdS* pour PAO1 pour l'envoi au séquençage avec les amorces pEXG2seqR et pEXG2seqF	64,7
PA_verifHRpvdS_R	**acctgcgcattcatcgag gagga**	Amplification de la séquence promotrice de *pvdS* pour PAO1 pour l'envoi au séquençage avec les amorces pEXG2seqR et pEXG2seqF	74,7

*Les 15 nt ajoutés en 5' des amorces pour faciliter le clonage ne sont pas en gras. En jaune sont indiqués les sites de restriction.

ANNEXE 2 : AMORCES PCR UTILISEES DANS CE TRAVAIL POUR LA SOUCHE KT2440

Nom de l'amorce	Séquence	Remarque	Tm (°C)
		Clonage – *P. putida* KT2440	
PP_pBAD_R	gaaatcaccttgctg**t tagcccaaaaaaac gg**	Amplification du promoteur *araC*/PBAD à partir de pEXG2 + 15 nt d'homologie* avec la séquence d'homologie en amont du *pvdS* de *P. putida* KT2440.	64
PP_pBAD_F	ttcgcagcggctatt**t tatgacaacttgac ggc**	Amplification du promoteur *araC*/PBAD à partir de pEXG2 + 15 nt d'homologie* avec la séquence d'homologie en amont du *pvdS* de *P. putida* KT2440.	66
PPpvdS_am_F	cccgggctcgagctc **ttgcagctcgccgg ccaattg**	Amplification de la séquence d'homologie de *P. putida* KT2440 en amont du gène *pvdS* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2. Site de restriction de *Xho*I indiqué en surlignage.	64
PPpvdS_am_R	**aatagccgctgcga atgatgga**	Amplification de la séquence d'homologie de *P. putida* KT2440 en amont du gène *pvdS*	60
PPpvdS_avR	taccgaattcgagct **gggaaaggagcgc tgcgaaa**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.putida* KT2440 en aval de *pvdS* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2. Site de restriction d'*Eco*RI indiqué en surlignage.	60
PPpvdS_pBAD_avF	**cagcaaggtgattt ccatgtcg**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.putida* KT2440 en aval de *pvdS* pour l'association avec le promoteur *araC*/PBAD	58
PPpvdS_Pc_avF	**atgtcggaacaact gtctacc**	Amplification de la séquence d'homologie de *P.putida* KT2440 en aval de *pvdS* pour l'association avec le promoteur Pc	56
PP_Pc_R	cagttgttccgacat**c gttgctgctccataa ca**	Amplification du promoteur Pc + 15 nt d'homologie* avec la séquence en amont de *pvdS* de *P. putida* KT2440.	66
PP_Pc_F	ttcgcagcggctatt**c ttattacgcgtaatt ct**	Amplification du promoteur Pc + 15 nt d'homologie* avec la séquence en amont de *pvdS* de *P. putida* KT2440.	64
PP_verifHRpvdS_F	**ggatacaccggag aggaatagc**	Amplification de la séquence promotrice de *pvdS* pour *P. putida* KT2440 pour l'envoi au séquençage avec les amorces pEXG2seqR et pEXG2seqF	64,7
PP_verifHRpvdS_R	**acctgcgcattcatc gaggagga**	Amplification de la séquence promotrice de *pvdS* pour *P. putida* KT2440. pour l'envoi au séquençage avec les amorces pEXG2seqR et pEXG2seqF	74,7
PvdD_R	taccgaattcgagct **gacgtcgatcacgg ccacttc**	Amplification de *pvdD* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2	
PvdD_F	cccgggctcgagct c**cagtggaatcaga cgcagatg**	Amplification de *pvdD* + 15 nt d'homologie* avec le MCS de pEXG2	
Mut1_R	**tcggtcggtccgtag aggtt**	Permet la mutagénèse du résidu W800 de *pvdD*	60
Mut1_VF	**aaccaccatc**gt**gt cgggtatcgagaag gtcac**	Permet la mutagénèse du résidu W800 en Valine de *pvdD*	50
Mut1_FF	**aaccaccatc**tc**gtc gggtatcgagaagg**	Permet la mutagénèse du résidu W800 en Phénylalanine de *pvdD*	48
Mut2_R	**agagaggtcagcg ccagtac**	Permet la mutagénèse du résidu I701 de *pvdD*	60
Mut2_AF	**gtccttcgat**gc**cg ccggcctgga**	Permet la mutagénèse du résidu I701 en Alanine de *pvdD*	58

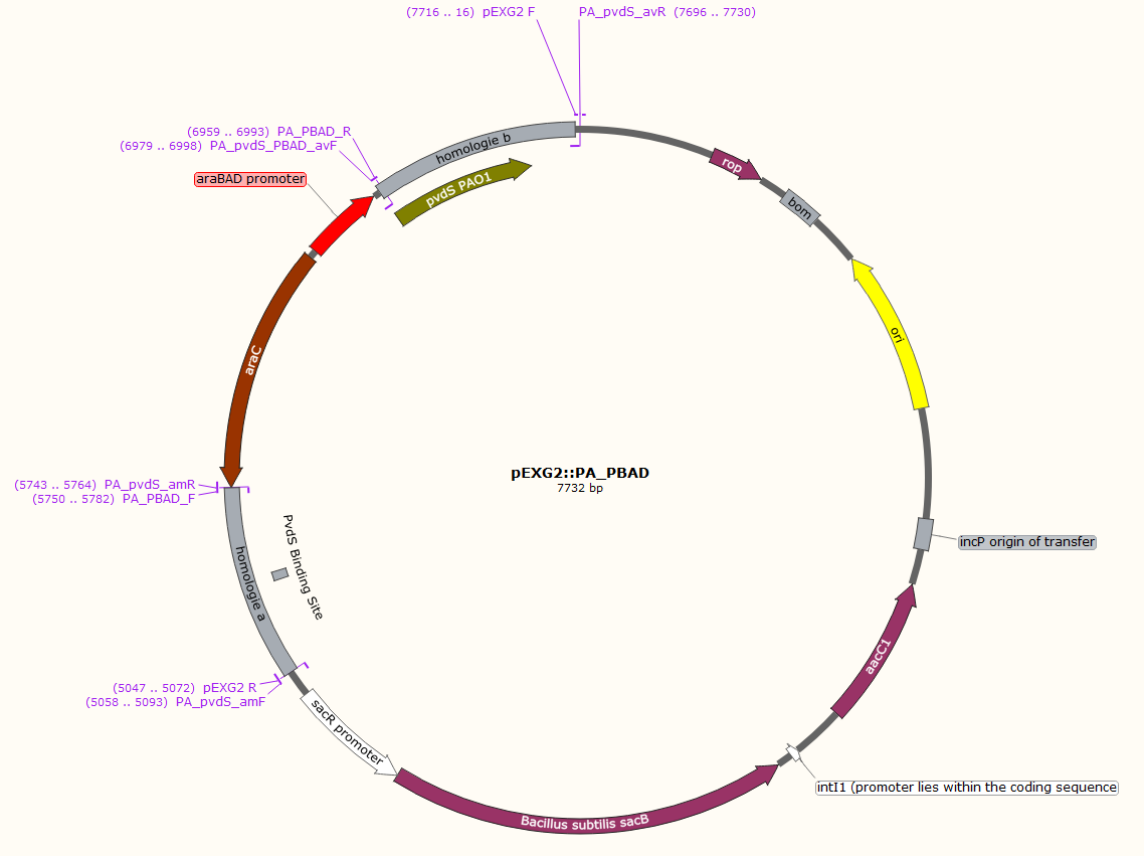
*Les 15 nt ajoutés en 5' des amorces pour faciliter le clonage ne sont pas en gras. En jaune sont indiqués les sites de restriction.

ANNEXE 3 : AUTRES AMORCES UTILISEES DANS CE TRAVAIL

Nom de l'amorce	Séquence	Remarque	Tm (°C)
pEXG2_F	**agctcgaattcggtacctt aattaatttccacg**	Amplification du plasmide pEXG2 rajoutant les queues de 15nt permettant le clonage par InFusion. Site de restriction d'*Eco*RI indiqué en surlignage.	62
pEXG2_R	**gagctcgagcccgggga tcctctaga**	Amplification du plasmide pEXG2 rajoutant les queues de 15nt permettant le clonage par InFusion. Site de restriction de *Xho*I indiqué en surlignage.	66
***pvdS*_R**	**cgtagttgatgtgcgagg tt**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *pvdS* pour les souches PAO1 ou KT2440	60
***pvdS*_F**	**caggcgctcgaacagaa ata**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *pvdS* pour les souches PAO1 ou KT2440	60
***rpsL*_R**	**caccaccgatgtacgag gaa**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *rpsL* pour les souches PAO1 ou KT2440	60
***rpsL*_F**	**tacaccaccacgccgaa aa**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *rpsL* pour les souches PAO1 ou KT2440	60
uvrD_R	**gcggctgacggtattgga**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *uvrD* pour la souches PAO1	60
uvrD_F	**ctacggtagcgagaccta caacaa**	Amplification par RT-PCR ou RT-qPCR des ADNc issus de l'expression de *uvrD* pour la souches PAO1	60

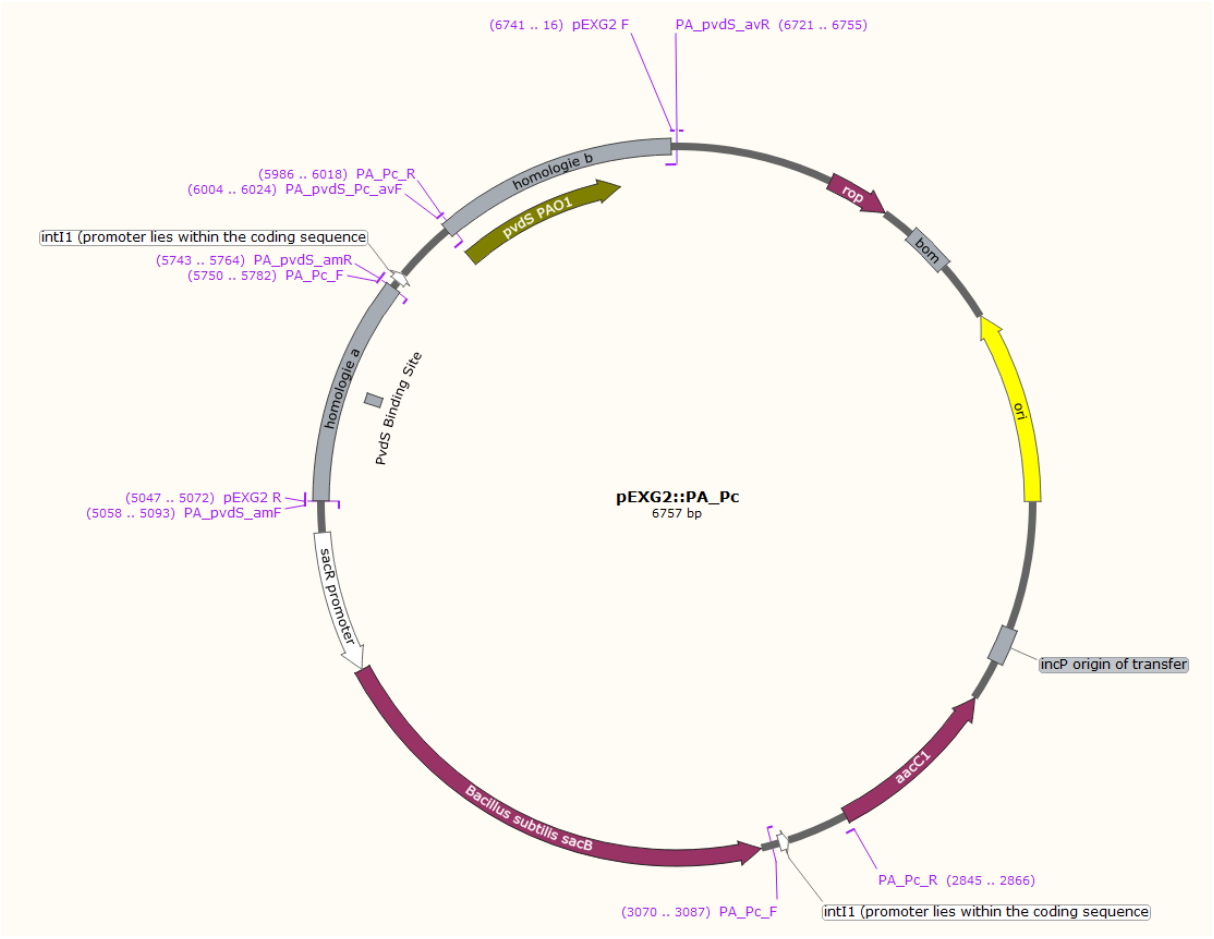
*Les 15 nt ajoutés en 5' des amorces pour faciliter le clonage ne sont pas en gras. En jaune sont indiqués les sites de restriction.

ANNEXE 4 : CARTE DU PLASMIDE « PA_P_{BAD} »



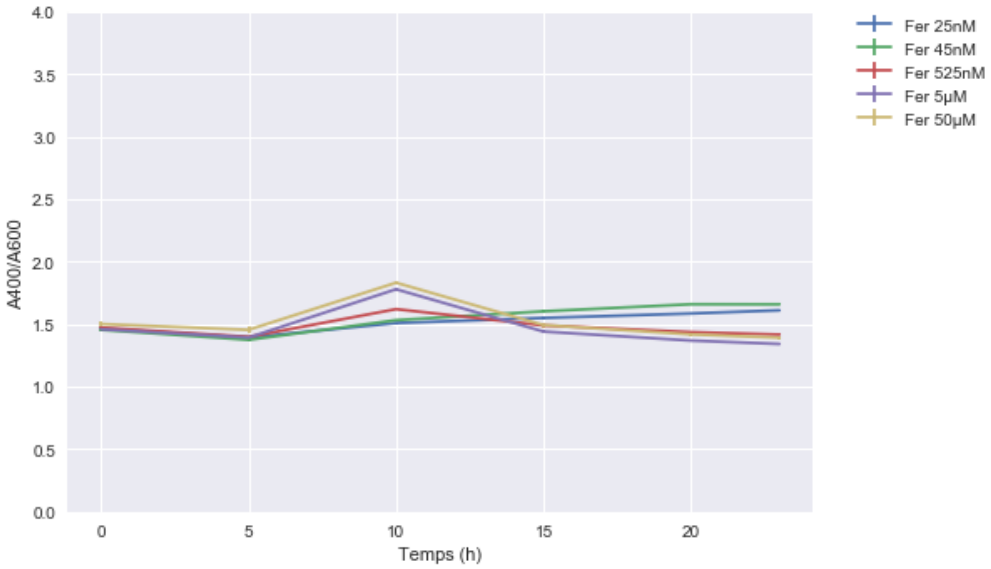
Carte du plasmide pEXG2::PA_P_{BAD}. La carte de pEXG2::PP_P_{BAD} présente la même organisation. Homologie a et b = Séquences chromosomiques respectivement en amont et en aval du promoteur de *pvdS* chez la souche PAO1. araBAD promoter = Promoteur inductible à l'arabinose *araC*/P_{BAD}. Les amorces s'hybridant sur le plasmide sont indiquées en violet. *rop* : Code pour la protéine Rop maintenant le plasmide à un faible nombre de copies. *bom* : « Basis of mobility » du plasmide pBR322 rendant le plasmide mobilisable ; *ori* : Origine de réplication du plasmide ColE1 ; incP origin of transfer : Origine de transfert du groupe d'incompatibilité IncP-1. *aac1* : gène de résistance à la Gm. sacR promoter + *Bacillus subtilis sacB* : Gène *sacB* et promoteur associé codant pour un produit toxique pour les souches *Pseudomonas* en présence de sucrose ; PvdS Binding Site : Site de fixation de PvdS dans la région promotrice permettant une boucle d'activation du gène *pvdS*.

ANNEXE 5 : CARTE DU PLASMIDE « PA_P_C »

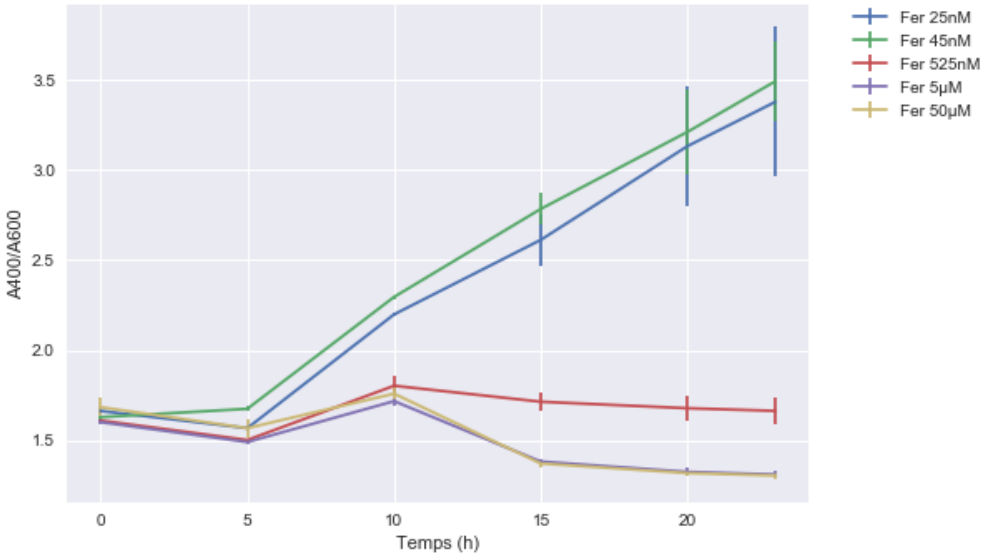


Carte du plasmide pEXG2::PA_P_C. La carte du plasmide pEXG2::PP_P_C présente une organisation similaire. Homologie a et b = Séquences chromosomiques respectivement en amont et en aval du promoteur de *pvdS* chez la souche PAO1. intI1 = Promoteur des cassettes d'integron de classe I inclue dans la séquence codante de l'integrase *intI1*. Les amorces s'hybridant sur le plasmide sont indiquées en violet. *rop* : Code pour la protéine Rop maintenant le plasmide à un faible nombre de copies. *bom* : « Basis of mobility » du plasmide pBR322 rendant le plasmide mobilisable ; *ori* : Origine de réplication du plasmide ColE1 ; incP origin of transfer : Origine de transfert du groupe d'incompatibilité IncP-1. *aac1* : gène de résistance à la Gm. sacR promoter + *Bacillus subtilis sacB* : Gène *sacB* et promoteur associé codant pour un produit toxique pour les souches *Pseudomonas* en présence de sucrose ; PvdS Binding Site : Site de fixation de PvdS dans la région promotrice permettant une boucle d'activation du gène *pvdS*.

ANNEXE 6 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE PVD CHEZ PAO1 SAUVAGE ET PA_P_{BAD}

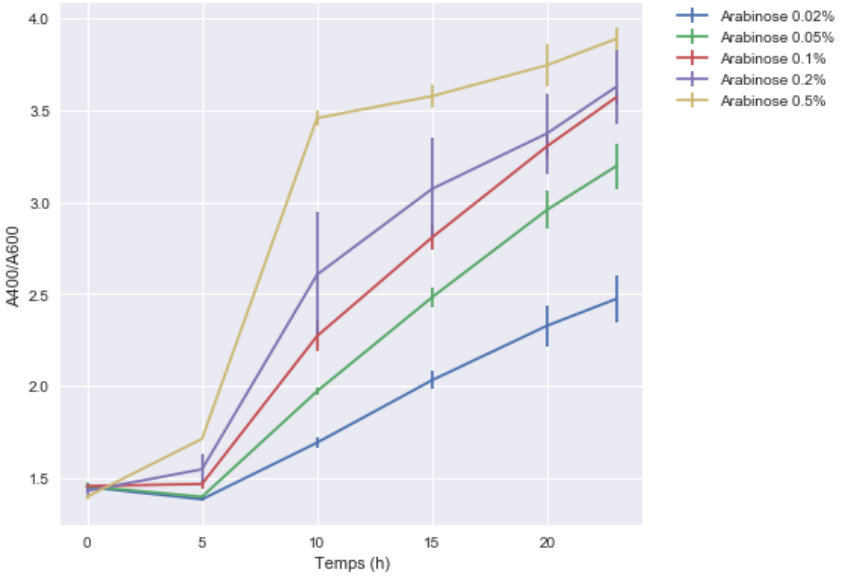


Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport à la concentration en Fer ajoutée dans le milieu de culture chez la souche PA_P_{BAD} (25, 45, 525, 5 000 ou 50 000 nM).

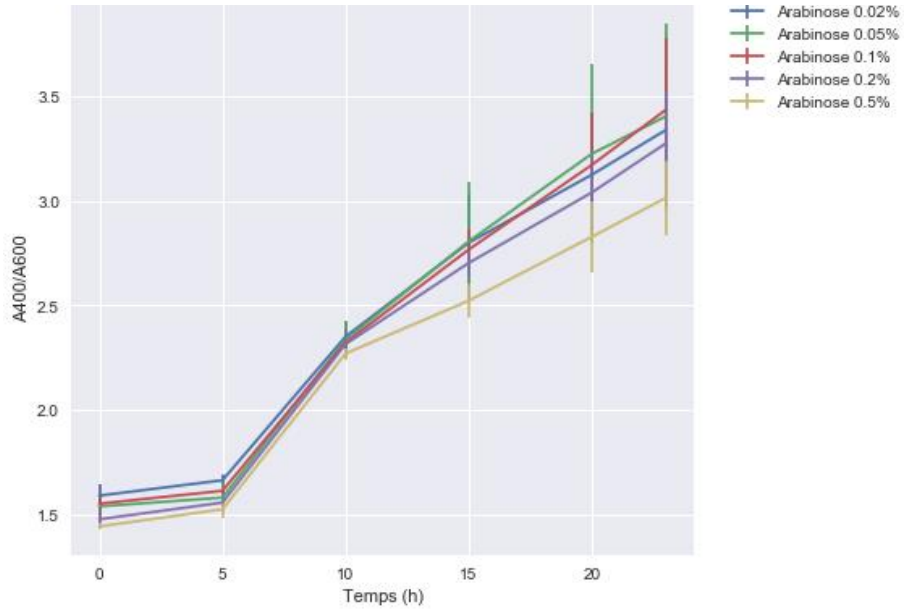


Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport à la concentration en Fer ajoutée dans le milieu de culture chez la souche PAO1 sauvage (25, 45, 525, 5 000 ou 50 000 nM).

ANNEXE 7 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE PVD CHEZ PAO1 SAUVAGE ET PA_P_{BAD}

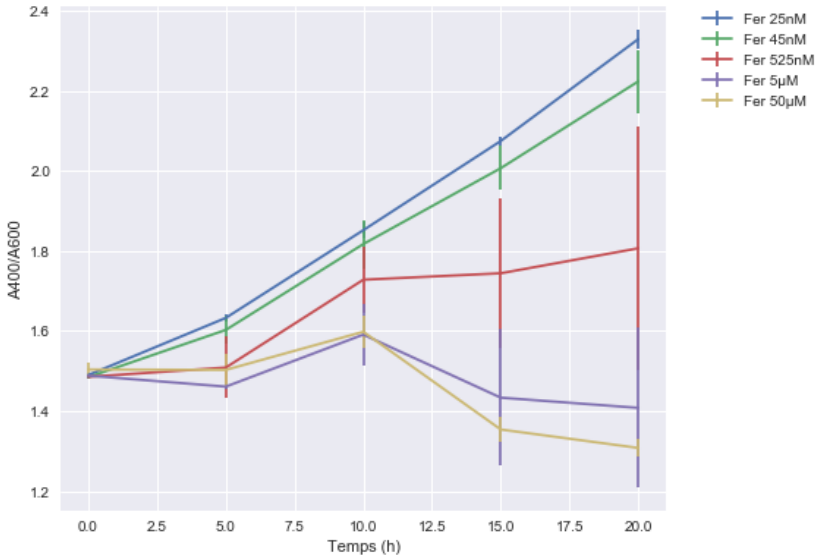


Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport au pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu de culture chez la souche PA_P_{BAD} (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 ou 0.5%)

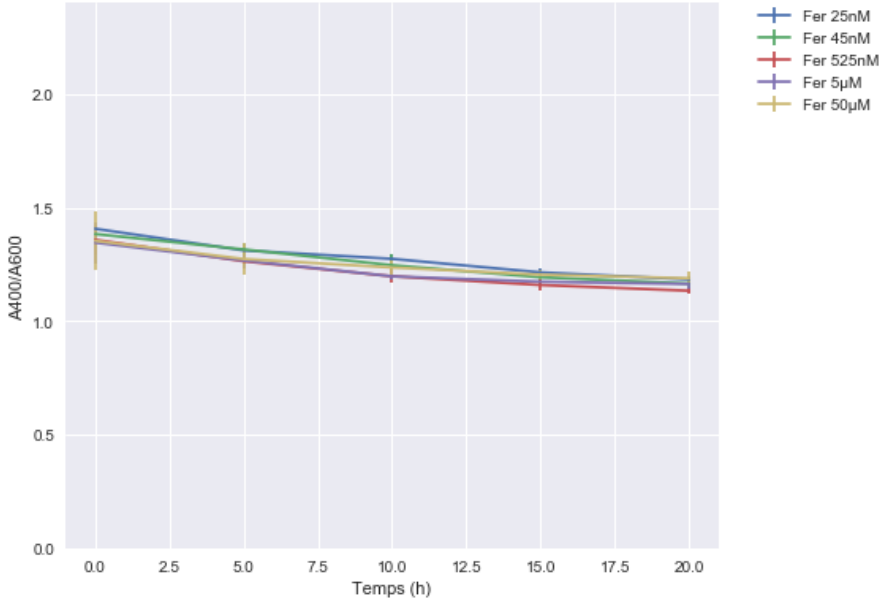


Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport au pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu de culture chez la souche PAO1 sauvage (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 ou 0.5%)

ANNEXE 8 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE PVD PAR KT2440 SAUVAGE ET PP_P_{BAD}



Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport à la concentration en Fer ajoutée dans le milieu de culture chez la souche KT2440 sauvage (25, 45, 525, 5 000 ou 50 000 nM).



Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport à la concentration en Fer ajoutée dans le milieu de culture chez la souche PP_P_{BAD} (25, 45, 525, 5 000 ou 50 000 nM).

ANNEXE 9 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE PVD PAR KT2440 SAUVAGE ET PP_P_{BAD}

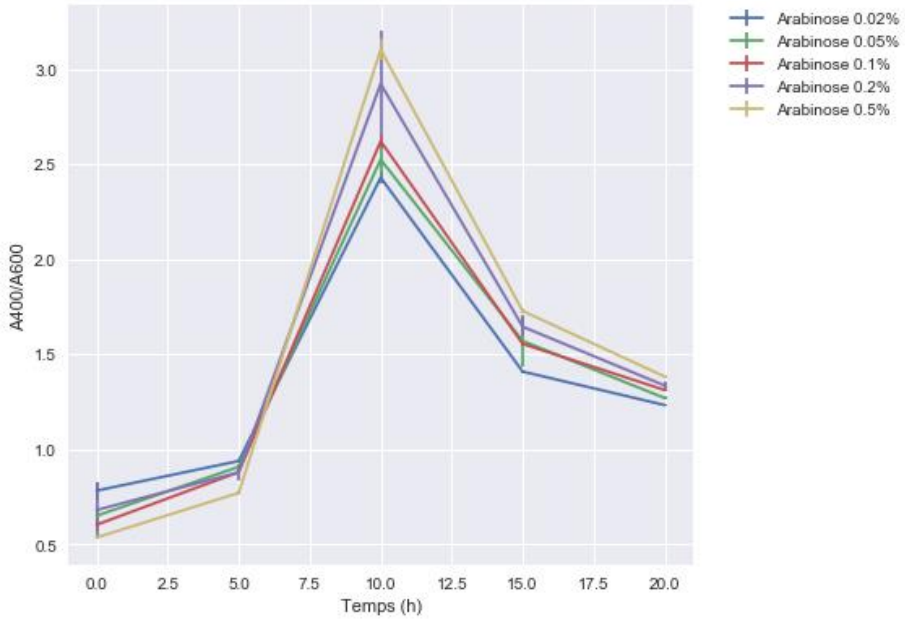


Figure 10 - Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport au pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu de culture chez la souche KT2440 sauvage (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 ou 0.5%).

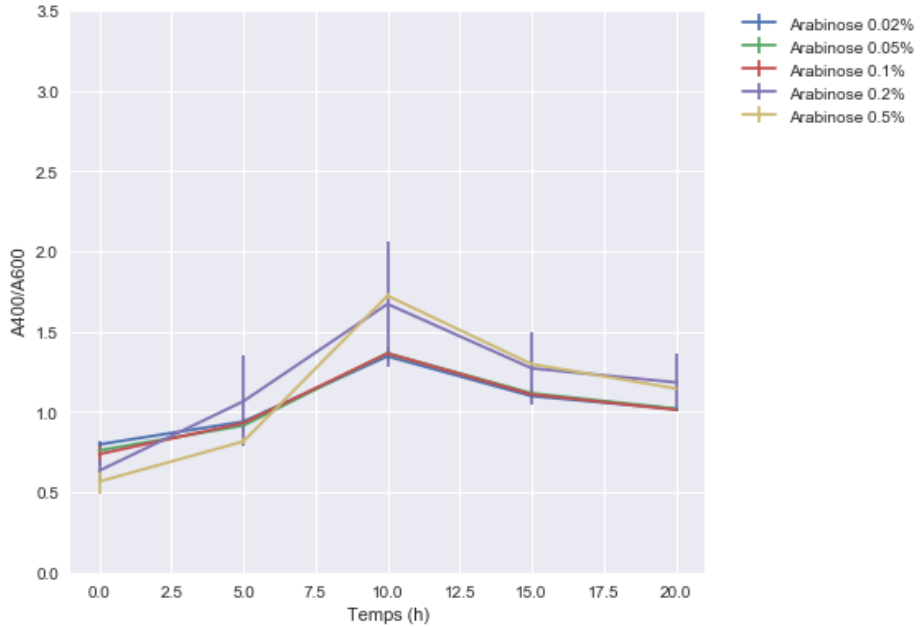


Figure 9 - Evolution de la production de pyoverdine (Ratio DO à 400 nm / DO à 600 nm) par rapport au pourcentage d'arabinose ajouté dans le milieu de culture chez la souche PP_P_{BAD} (0.02, 0.05, 0.1, 0.2 ou 0.5%).

ANNEXE 10 : ALIGNEMENT DES DOMAINES A DE PA1221, DhbF ET PvdD

```
PA1221                          DLYAHPTVVARFSEMAALHPHR---------------EAIRDRFG--SVDYRQLLDSAEQ
DhbF                            --EERHQVLKKWNETAHPHPEE-NFLQLFEKQAERIPEAIAVICEDQALSYTELNQQANR
PvdD                            EHDERERILGQWNQTQMAYPTKLGVYRLFEQQVCRTPDAVALRFGEQTLSYAELNRQANQ
                                    .  :: .:.:    :*                :*:       ::.* :*  .*:.

PA1221                          LSDYLLEHYPQPGVCLGVYGEYSRESITCLLAILLSGHHYLYIDLKQPAAWNAELCRQVD
DhbF                            LAHFLMEYGVGPEQYVALALPRSAEMVIAMLAVLKTGAAYLPLDLDYPDERIAFMLEDTK
PvdD                            LAHALRERGVGPEVLVGVAMPRGPRMLVGLLAIFKAGGAYVPLDPDYPAERLAYMIEDSG
                                *:  * *    *   :.:    .   :  :**:: :*  *: :* . *  . * :  :

PA1221                          CRLILDCSTTPTPANGLPCVPVRHLPAAPASVARPCFAADQIA---------YINFSSGT
DhbF                            PVCIVTSSSVQSKLSHFPSCSTIILDHPETEQAIKHYPDTNVPKTQSPLHPAYVIYTSGS
PvdD                            LGLLLTEQAVLARLQVPATVASLCLDTDTACYASA--AAEDLPLDVDADHPAYVIYTSGS
                                   ::  .:. :  .  .  .   *    :  *    .  ::.         *: ::**:

PA1221                          TGRPKAIACTHAGITRLCLGQSF-LAFAPQMRFLVNSPLSFDAATLEIWGALLNGGCCVL
DhbF                            TGKPKGVVVPFHSLNNFLLAMREKFALKEHDRLLAVTTIAFDISALEIFLPLISGASLVV
PvdD                            TGRPKGVTVRHGALVNFLTSMAVQPGIAASDRVLALTSLSFDIAGLELYLPLLHGASVVL
                                **.**.:.  . .: .:  .     .:    *.*. :.::** : **:: .*: *.. *:

PA1221                          -NDLGPLDPGVLRQLIGERGADSAWLTASLFNTLVDLD-PDCLGGLRQLLTGGDILSVPH
DhbF                            AKKETIQDPQALAAVISDKEITIMQATPTLWHMLVTHH-PDCIAGLR-VLVGGEALSSGL
PvdD                            LADQQNKDPFALLRVIEQQAVSVIQATPSTWRMLLDNAPPQALRGKR-VISGGEALSSEL
                                  .    ** .*  :* :.     . *.: :. *:    *:.: * * :: **: **


PA1221                          VRRALLRHPRLHLVNGYGPTENTTFTCCHVVTDDDLEEDDIPIGKAIAGTAVLLLDEHGQ
DhbF                            ASA--LHRLACEVTNLYGPTETTIWSTMSPLHPDDARA--PSIGRPIWNTQVYVLDEQLQ
PvdD                            AQR--LIDQAGHVWNLYGPTETTIWSGIEKVT--DSRQ--VWLGKPIGNTTFHVLDAQFD
                                .    *      : * *****.* ::    :   *       :*..* .* . :** : :

PA1221                          EIAEPDRAGEIVAFGAGLAQGYRNDAARTRASFVELPYRGRLLRAYRTGDRARYDEQGRL
DhbF                            PVP-PGVVGELYIAGSGLARGYLRRPDLTAERFVANPYGPPGSRMYRTGDLVRWRMDGSL
PvdD                            AVP-VGVSGELFIGGDGLARGYLKRPGLTAERFIPNPHGH--GRLYRTGDLVRYRDDGVL
                                 :.  .  **:   * ***.** . .  *   *:  *:     * ***** .*:  :* *
```

Les résidus ciblés pour la mutagénèse sont surlignés. Les fins des domaines d'adénylation sont indiqués en rouge.

REFERENCES

Barrero, J.M., Morino-Bondi, M.C., Pérez-Conde, M.C., and Cámara, C. (1993). A biosensor for ferric ion. Talanta *40*, 1619–1623.

Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J., and Ziessow, D. (1991). Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. Biochemical and Biophysical Research Communications *177*, 998–1005.

Boyer, H.W., and Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology *41*, 459–472.

Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., and Mattern, M.R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. Protein Expression and Purification *43*, 1–9.

Calcott, M.J., and Ackerley, D.F. (2014). Genetic manipulation of non-ribosomal peptide synthetases to generate novel bioactive peptide products. Biotechnol. Lett. *36*, 2407–2416.

Cleto, S., and Lu, T.K. (2017). An Engineered Synthetic Pathway for Discovering Nonnatural Nonribosomal Peptides in *Escherichia coli*. MBio *8*. e01474-17.

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., and Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. The EMBO Journal *16*, 4174–4183.

Cook, T.B., Rand, J.M., Nurani, W., Courtney, D.K., Liu, S.A., and Pfleger, B.F. (2018). Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in Pseudomonas putida. J Ind Microbiol Biotechnol *45*, 517–527.

von Döhren, H., Keller, U., Vater, J., and Zocher, R. (1997). Multifunctional Peptide Synthetases. Chem. Rev. *97*, 2675–2706.

Eppelmann, K., Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A. (2002). Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. Biochemistry *41*, 9718–9726.

Fischbach, M.A., Lai, J.R., Roche, E.D., Walsh, C.T., and Liu, D.R. (2007). Directed evolution can rapidly improve the activity of chimeric assembly-line enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 11951–11956.

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., and Schalk, I.J. (2015). Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. J. Inorg. Biochem. *148*, 27–34.

Geoffroy, V., and Regis, R.-C. (2017). Procédé de réduction par voie biologique de la quantité de magnésium et/ou de fer d'un déchet d'amiante. Brevet N° FR3040317 (A1).

Goss, R.J.M., Shankar, S., and Fayad, A.A. (2012). The generation of "unNatural" products: Synthetic biology meets synthetic chemistry. Natural Product Reports *29*, 870.

Grüschow, S., Rackham, E.J., Elkins, B., Newill, P.L.A., Hill, L.M., and Goss, R.J.M. (2009). New Pacidamycin Antibiotics Through Precursor-Directed Biosynthesis. ChemBioChem *10*, 355–360.

Ji, C., Juárez-Hernández, R.E., and Miller, M.J. (2012). Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. Future Medicinal Chemistry *4*, 297–313.

Knauf, V.C., and Nester, E.W. (1982). Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. Plasmid *8*, 45–54.

Kries, H. (2016). Biosynthetic engineering of nonribosomal peptide synthetases: Engineering NRPSs. Journal of Peptide Science *22*, 564–570.

Kries, H., and Stanišić, A. (2019). Adenylation domains in nonribosomal peptide engineering. ChemBioChem. *20*, 1347-1356.

Kries, H., Wachtel, R., Pabst, A., Wanner, B., Niquille, D., and Hilvert, D. (2014). Reprogramming Nonribosomal Peptide Synthetases for "Clickable" Amino Acids. Angewandte Chemie International Edition *53*, 10105–10108.

Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., and Chorus, I. (2002). Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis spp*. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). Microb. Ecol. *43*, 107–118.

Leoni, L., Orsi, N., Lorenzo, V. de, and Visca, P. (2000). Functional Analysis of PvdS, an Iron Starvation Sigma Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology *182*, 1481–1491.

Linne, U., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (2001). Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. Biochemistry *40*, 15824–15834.

Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2017). Molecular tools and emerging strategies for deep genetic/genomic refactoring of *Pseudomonas*. Current Opinion in Biotechnology *47*, 120–132.

Martínez-Núñez, M.A., and López, V.E.L. y (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. Sustainable Chemical Processes *4*.

Mashiach, R., and Meijler, M.M. (2013). Total Synthesis of Pyoverdin D. Org. Lett. *15*, 1702–1705.

Minowa, Y., Araki, M., and Kanehisa, M. (2007). Comprehensive Analysis of Distinctive Polyketide and Nonribosomal Peptide Structural Motifs Encoded in Microbial Genomes. Journal of Molecular Biology *368*, 1500–1517.

Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2014). Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. Metallomics *6*, 408–420.

Mitchell, C.A., Shi, C., Aldrich, C.C., and Gulick, A.M. (2012). Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. Biochemistry *51*, 3252–3263.

Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. a. P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ. Microbiol. *4*, 799–808.

Nikel, P.I., and de Lorenzo, V. (2018). Pseudomonas putida as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. Metab. Eng. *50*, 142–155.

Owen, J.G., Calcott, M.J., Robins, K.J., and Ackerley, D.F. (2016). Generating Functional Recombinant NRPS Enzymes in the Laboratory Setting via Peptidyl Carrier Protein Engineering. Cell Chem Biol *23*, 1395–1406.

Payne, J.A.E., Schoppet, M., Hansen, M.H., and Cryle, M.J. (2017). Diversity of nature's assembly lines – recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis. Molecular BioSystems *13*, 9–22.

Pupin, M. (2013). Modèles bio-informatiques pour les peptides non-ribosomiques et leurs synthétases. Mémoire pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches en informatique. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I.

Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., and Huson, D.H. (2005). Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). Nucleic Acids Res. *33*, 5799–5808.

Ravel, J., and Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. Trends Microbiol. *11*, 195–200.

Ren, D., Zuo, R., and Wood, T.K. (2005). Quorum-sensing antagonist (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol *66*, 689–695.

Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 8006–8011.

Ringel, M.T., and Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. Microbial Cell *5*, 424–437.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environ Sci Pollut Res *23*, 3984–3999.

Saisho, Y., Katsube, T., White, S., Fukase, H., and Shimada, J. (2018). Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin for Gram-Negative Bacteria, in Healthy Subjects. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *62*, e02163-17.

Schalk, I.J. (2018). A Trojan-Horse Strategy Including a Bacterial Suicide Action for the Efficient Use of a Specific Gram-Positive Antibiotic on Gram-Negative Bacteria. Journal of Medicinal Chemistry *61*, 3842–3844.

Schalk, I.J., and Mislin, G.L.A. (2017). Bacterial Iron Uptake Pathways: Gates for the Import of Bactericide Compounds. Journal of Medicinal Chemistry *60*, 4573–4576.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem. Biol. *6*, 493–505.

Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J., and Poole, K. (1998). Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. FEMS Microbiol Lett *166*, 341–345.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature *406*, 959.

Tarry, M.J., Haque, A.S., Bui, K.H., and Schmeing, T.M. (2017). X-Ray Crystallography and Electron Microscopy of Cross- and Multi-Module Nonribosomal Peptide Synthetase Proteins Reveal a Flexible Architecture. Structure *25*, 783-793.e4.

Thirlway, J., Lewis, R., Nunns, L., Al Nakeeb, M., Styles, M., Struck, A.-W., Smith, C.P., and Micklefield, J. (2012). Introduction of a Non-Natural Amino Acid into a Nonribosomal Peptide Antibiotic by Modification of Adenylation Domain Specificity. Angewandte Chemie International Edition *51*, 7181–7184.

Walsh, C.T., O'Brien, R.V., and Khosla, C. (2013). Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds. Angewandte Chemie International Edition *52*, 7098–7124.

Wirth, N.T., Kozaeva, E., and Nikel, P.I. (2019). Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI—mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. Microbial Biotechnology, *0*, 1-17.

Wu, Z., Chen, Z., Gao, X., Li, J., and Shang, G. (2019). Combination of ssDNA recombineering and CRISPR-Cas9 for Pseudomonas putida KT2440 genome editing. Appl. Microbiol. Biotechnol. *103*, 2783–2795.

Ye, L., Ballet, S., Hildebrand, F., Laus, G., Guillemyn, K., Raes, J., Matthijs, S., Martins, J., and Cornelis, P. (2013). A combinatorial approach to the structure elucidation of a pyoverdine siderophore produced by a *Pseudomonas putida* isolate and the use of pyoverdine as a taxonomic marker for typing P. putida subspecies. Biometals *26*, 561–575.

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. Amino Acids *38*, 1447–1459.

WEBOGRAPHIE

Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. Résultats. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2013. 181 p. Disponible à partir de l'URL (au 04/06/2019) : http://www.invs.sante.fr.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ; Communiqué de presse du 27 février 2017 : « L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques ». Disponible à partir de l'URL (au 04/06/2019) : https://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

ANNEXE

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Année universitaire : 2018/2019

Convention de stage entre

Nota : pour faciliter la lecture du document, les mots « stagiaire », « enseignant référent », « tuteur de stage », « représentant légal », « étudiant » sont utilisés au masculin

1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION

Nom : Université de Lorraine

Adresse : CS 25233 54052 Nancy

☎ .....

Représenté par (signataire de la convention) Stéphane FLAMENT

Qualité du représentant Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies

Composante/UFR ... : FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES - MASTER MICROBIOLOGIE

☎ 03 72 74 51 39

mél : karine.jacquot@univ-lorraine.fr

Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX

2 - *L'ORGANISME D'ACCUEIL*

Nom : CNRS...

SIRET **18008901300023**
code APE **7219Z**

Adresse : 23 rue du Loess 67037 Strasbourg Cedex.....

.....

Représenté par (nom du signataire de la convention) :

Patrice SOULLIE.....

Qualité du représentant: Délégué régional.....

Service dans lequel le stage sera effectué :

UMR7242 BSC.....

☎ 0368854860.....

mél : sylvie.douessin@unistra.fr.....

Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) : 300 Bd Sébastien Brant 67412 Illkirch.....

3 - LE STAGIAIRE

Nom : MATHIEU..... Prénom : Sébastien..... Sexe : F ☐ M ■ Né(e) le : 10/08/1996

Adresse : 1016 rue de la Proye 88200 Dommartin lès Remiremont.....

.....

☎ 0606405724..... , mél : sebastien.mathieu1@etu.univ-lorraine.fr.....

INTITULE DE LA FORMATION OU DU CURSUS SUIVI DANS L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : MASTER MICROBIOLOGIE

CNRS - DELEGATION ALSACE
Service des Ressources Humaines
11 JAN. 2019
ARRIVE COURRIER

SUJET DE STAGE Ingénierie métabolique d'une souche de Pseudomonas pour la production à façon du sidérophore pyoverdine et analogues

Dates : Du.....7/01/2019..... Au.....30/06/2019.....

Représentant une **durée totale** de ... 6 mois..... (Nombre de Semaines / de Mois (rayer la mention inutile)

Et correspondant à .....120..... Jours de présence effective dans l'organisme d'accueil.

Répartition si présence discontinue : .....35.....nombre d'heures par semaine ou nombre d'heures par jour (rayer la mention inutile).

Commentaire : .....

ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT

Nom et prénom de l'enseignant référent :

ORAND Frédéric

☎ 03.72.74.73.80

mél :frederic.jorand@univ-lorraine.fr

ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ORGANISME D'ACCUEIL

Nom et prénom du tuteur de stage : RIGOUIN Coraline.....

Fonction : Enseignante-Chercheuse.....

☎ ...0782346662..... mél : rigouin@unistra.fr

Caisse primaire d'assurance maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile du stagiaire sauf exception) : .....

.....

Page 1

Article 1 – Objet de la convention
La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

Article 2 – Objectif du stage
Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant(e) acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.
Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.
ACTIVITES CONFIEES : ...
Construire une souche châssis pour la production à façon de pyoverdine.....

Ingénierie enzymatique d'un domaine impliqué dans la voie de biosynthèse du sidérophore pour l'incorporation d'acides aminés non naturels

.....
.....
COMPETENCES A ACQUERIR OU A DEVELOPPER :
.....

Article 3 – Modalités du stage
La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de 35 heures sur la base d'un temps complet/ temps partiel *(rayer la mention inutile).*

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers : .....
.....

Article 4 – Accueil et encadrement du stagiaire
Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.
Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.
Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement.
L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer.
Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITES D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc)
.....
.....

Article 5 – Gratification - Avantages
En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.
Le montant horaire de la gratification est fixé à 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.
La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.
La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.
L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la

(article 5 suite) En cas de suspension ou de résiliation de la pr convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratis fonction de la durée du stage effectué.
La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du/de la stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à 3,75..... € par heure / *jour / mois (rayer les mentions inutiles)* soit 568,76€ /mois

Article 5 bis –Accès aux droits des salariés – Avantages (Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.
Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.
Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : .....
.....

Article 5ter – Accès aux droits des agents - Avantages (Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre leur domicile et leur lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.
Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.
Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : .....
.....

Article 6 – Régime de protection sociale
Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur.
Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.
Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

6-1 Gratification d'un montant maximum de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale :
La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.
Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la sécurité sociale.
En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2° de l'article L.418-2, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

nférieure ou égale à deux mois.

. – **Gratification supérieure** à 15 % du plafond horaire de la sécurité ociale :
Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15 % du plafond horaire de la Sécurité Sociale.
L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

6.3 – Protection Maladie du/de la stagiaire à l'étranger
1) Protection issue du régime étudiant français
- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).
- pour les stages effectués au Québec par les étudiant(e)s de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en université) ;
- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants peuvent exister entre les frais engagés et les tarifs français base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance Maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu du droit local (voir 2e ci-dessous).
2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil
En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :
☐ OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français
☐ NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant).
Si aucune case n'est cochée, le 6.3 – 1 s'applique.

6.4 Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger
1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :
- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;
- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;
- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.
Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.
2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.
3) La couverture concerne les accidents survenus :
• dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
• sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
• dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire

(6-4 suite)
• lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),
• lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.
4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1/ n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le/la stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.
5) Dans tous les cas :
• si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
• si l'étudiant remplit des missions limitées en-dehors de l'organisme d'accueil ou en-dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

Article 7 – Responsabilité et assurance
L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.
Pour les stages à l'étranger ou outremer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.
Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant
Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente.

Article 8 – Discipline
Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.
Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.
En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

Article 9 – Congés – Interruption du stage
En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.
Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.
NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :
.....
Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.
Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.
Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

et obligatoirement par ordre de mission,

(Article 9 suite)
En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

Article 10 – Devoir de réserve et confidentialité
Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues par eux pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.
Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.
Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 – Propriété intellectuelle
Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.
Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Article 12 – Fin de stage – Rapport - Evaluation
1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale ;
2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage.
Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.
3) Evaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent*(ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent)*.....
4) Modalités d'évaluation pédagogiques : le stagiaire devra *(préciser la nature du travail à fournir –rapport, etc.- éventuellement en joignant une annexe)*.....
NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) :
.....
.....
.....
5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

Article 13 – Droit applicable – Tribunaux compétents
La présente convention est régie exclusivement par le droit français.
Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

FAIT A .....STRASBOURG..... LE...3/12/2018.....

POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT
Nom et signature du représentant de l'établissement
Stéphane FLAMENT
Le Directeur du Secteur Biologie
Le Directeur de la Faculté des Sciences et Technologies
Lionel DOLLENJOUD

POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL
Nom et signature du représentant de l'organisme d'accueil... Patrice SOULIE.....

STAGIAIRE (ET SON REPRESENTANT LEGAL LE CAS ECHEANT)
Nom et signature
Sébastien MATHIEU.....

Pour le Délégué régional du CNRS
et par délégation,
l'Adjoint au Délégué régional,
Kevin GEIGER

Jean-Luc GALZI
Directeur de l'UMR 7242
Biotechnologie et signalisation cellulaire

L'enseignant référent du stagiaire
Frédéric JORAND

Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil
Nom et signature

RIGOUIN CORALINE

Fiches à annexer à la convention : ***① Attestation de stage*** *(page suivante)*
② Fiche stage à l'étranger *(pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr, pour fiches pays voir site diplomatie.gouv.fr)*

Page 4

Résumé :

Les synthétases à peptides non ribosomiques (NRPS) sont des enzymes à activité modulaire capables de produire à partir d'acides aminés, des métabolites complexes aux fonctions variées. L'ingénierie des NRPS est aujourd'hui en plein développement. L'un de ses objectifs est de muter les gènes codant pour les synthétases afin que ces dernières puissent intégrer dans la synthèse peptidique qu'elles réalisent, des acides aminés non-naturels. Les sidérophores sont parmi les produits de NRPS les plus étudiés, et notamment les pyoverdines produites par le genre *Pseudomonas*. Ces chélateurs de fer ont de nombreuses applications, mais il est aujourd'hui difficile d'en obtenir en quantité importante. Le premier objectif de mon stage est donc de concevoir une souche châssis permettant de surproduire la pyoverdine. Une preuve de concept a été réalisée chez la souche *P. aeruginosa* PAO1. Un mutant produit 10 fois plus de pyoverdine en milieu riche. Le second objectif de mon stage est de muter l'une des synthétases permettant la biosynthèse de la pyoverdine dans la souche *P. putida* KT2440. Le but est de modifier la spécificité de substrat pour incorporer la Propargylglycine, un acide aminé non-naturel possédant un groupement alcyne, et produire une pyoverdine fonctionnalisée facilement conjugable à d'autres molécules. Cela améliorera et élargira ainsi le développement de ses applications.

Mots clés : Sidérophores, Pyoverdine, Synthétases à peptides non ribosomiques, Ingénierie enzymatique.

Abstract:

Non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) are multimodular enzymes that are capable of producing complex metabolites with various functions from amino acids. NRPS engineering to create and design new synthetic pathways has raised a great interest. One of the goals is to mutate genes encoding synthetases to allow for the incorporation of non-natural amino acids. Siderophores are one of the most studied NRPS products, particularly pyoverdins produced by *Pseudomonas spp.* These iron chelators have several applications, but their production in significant amount is difficult. The first objective of my internship is to create a chassis strain for pyoverdin overproduction. A proof of concept was carried out in *P. aeruginosa* PAO1. We detect a tenfold increase of pyoverdin production in rich medium for a mutant. The second objective is to mutate one of the pyoverdin NRPS in *P. putida* KT2440. The aim is to modulate substrate specificity to incorporate Propargylglycine, a non-natural amino acid with an alkyne groupment, and produce functionalized pyoverdin. This will facilitate the conjugation to other molecules by click chemistry, improving and broadening the development of its applications.

Key words: Siderophores, Pyoverdin, Non-ribosomal peptide synthetases, Enzymatic engineering.