Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

LES SIDÉROPHORES PRODUITS PAR *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*

Par

Sok Gheck Tan

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	François Lépine INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Alain Stinzi Université d'Ottawa
Directeur de recherche	Éric Déziel INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Sok Gheck Tan, 2014

Résumé

Les sidérophores sont des chélateurs d'origine biologique présentant une très haute affinité pour le Fe^{3+}, un élément essentiel à la survie de la plupart des organismes vivants. Ces molécules sont produites et sécrétées entre autres par les bactéries et les levures en conditions limitantes en fer. Les sidérophores sont des facteurs de virulence puisqu'ils compétitionnent avec les protéines de l'hôte pour l'acquisition du fer permettant ainsi la survie d'un pathogène. Ce projet s'intéresse principalement aux sidérophores produits par la bactérie *Burkholderia thailandensis*, un bacille à Gram négatif utilisé comme modèle alternatif pour le pathogène *Burkholderia pseudomallei*, l'agent causatif de la mélioïdose. *B. thailandensis* est une espèce avirulente phylogénétiquement et phénotypiquement très similaire à *B. pseudomallei*. La production de sidérophores par *B. pseudomallei* a déjà été confirmée, mais très peu d'informations sont disponibles concernant les types de sidérophores produits ainsi que les gènes impliqués dans la régulation et la synthèse de ces molécules. Les principaux objectifs de ce projet sont d'identifier les sidérophores produits par *B. thailandensis* puis d'identifier les gènes impliqués dans la régulation et la synthèse de ceux-ci. Des analyses par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) ont permis de déterminer que la pyochéline, un sidérophore déjà connu, est produite chez cette bactérie. Des criblages par mutagenèse aléatoire par transposon ont permis d'identifier des gènes nécessaires à la production de la malléobactine, un sidérophore de la famille des hydroxamates. La production de ce sidérophore par *B. thailandensis* a été confirmée par CLHP-SM. Il a été déterminé que la malléobactine est en fait un groupe de sidérophores formé d'au moins trois congénères ayant des masses moléculaires différentes. De plus, il s'agit du sidérophore majoritairement produit chez cette bactérie. Des analyses par CLHP-SM, CLHP-SM en tandem et RMN ont été faites afin d'élucider la structure, encore inconnue au moment de cette étude, de la malléobactine.

Étudiante	Directeur de recherche

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Eric Déziel. Je le remercie de m'avoir permis de vivre cette belle expérience académique en me donnant l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Son soutien, ses nombreux conseils ainsi que sa grande patience ont été fort appréciés. Je remercie aussi le Professeur François Lépine pour son aide indispensable lors des analyses de CLHP-SM. Merci à Sylvain Milot pour son aide sur le CHLP-SM. Un grand merci à Marie-Christine Groleau pour tout son soutien et son aide.

Un merci particulier au Dr. Annelise Chapalain pour sa grande écoute et ses sages conseils! Un salut à tous les membres passés et actuels du laboratoire qui ont rendu cette expérience fort agréable. Merci pour les bons moments.

Merci à ma famille et mes amis pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Un chapitre important de ma vie se termine avec la remise de ce manuscrit.

Merci infini pour ce parcours mémorable!

Table des matières

Résumé....II

Liste des tableaux IX

Liste des abréviations....X

Introduction 1

Chapitre 1 – Revue de littérature....4

1.1. *Burkholderia* 5

1.1.1. Le complexe *Burkholderia cepacia* (BCC)....7

1.1.2. *Burkholderia pseudomallei*....7

1.1.3. *Burkholderia thailandensis*....8

1.2 Le *quorum sensing* 8

1.2.1. Systèmes de *quorum sensing* chez le complexe *Burkholderia cepacia*....10

1.2.2. Le *quorum sensing* chez *B. pseudomallei, B. thailandensis et B. mallei* 10

1.3 L'importance du Fer....11

1.4 Les systèmes d'acquisition du Fer 13

1.5 Les sidérophores 14

1.6 Sidérophore chez *B. pseudomallei* 16

1.7 Sidérophores chez *B. thailandensis*....19

Chapitre 2 – Caractérisation de la malléobactine produite par *Burkholderia thailandensis* ...21

2.1. La problématique....22

2.2. Les hypothèses du projet....22

2.3. Les objectifs....22

2.4. Méthodologie 23

2.4.1. Bactéries....23

2.4.2. Conditions de cultures 23

2.4.3. Détection des sidérophores 24

2.4.4. Mutagénèse, criblages....26

2.4.5. Courbes de croissance par BioScreen 27
2.4.6. Extraction ADN 27
2.4.7. PCR semi-aléatoire nichée en deux rondes 28
2.4.8. Préparation des échantillons pour l'analyse par CLHP-SM 30
2.4.9. CLHP-SM 31
2.4.10. Courbe de croissance par dosage de protéines totales 31
2.4.11. Extraction des sidérophores 32
2.4.12. CLHP Préparatif 33
2.5. Résultats 34
2.5.1. Détection des sidérophores 34
2.5.2. Détection de la pyochéline 34
2.5.3. Criblage 38
2.5.4. Caractérisation de la malléobactine 50
2.5.4.1. Identification des composés de la malléobactine 50
2.5.4.2. Nature chélatrice des composés 636, 620, 612 et 605 Da. 56
2.5.4.3. Similarité structurelle à l'ornibactine 59
2.5.4.4. Purification de la malléobactine 69
2.5.4.5. Détermination de la structure de la malléobactine 75
2.6. Discussion 76
2.7. Conclusion 79
Références 83
Appendice 90

Liste des Figures

Figure 1. Représentation schématique d'un système de *quorum sensing* LuxIR chez *Vibrio fisheri*. MI, membrane interne; ME, membrane externe. Adapté de (Waters *et al.*, 2005) 9

Figure 2. Classification des sidérophores selon leur fonction chimique : A) hydroxamate, B) phénolate, C) catécholate, D) carboxylate. 15

Figure 3. Exemples de sidérophores appartenant à la classe des catécholates (A), des phénolates (B), des hydroxamates (C), des carboxylates (D) et du groupe mixte (E). Tiré de : (Andrews *et al.*, 2003, Crosa *et al.*, 2002, Miethke *et al.*, 2007, Zajdowicz *et al.*, 2012).....15

Figure 4. Représentation structurelle de l'ornibactine. Image tirée de (H. Stephan *et al.*, 1993a). 17

Figure 5. Les gènes de la biosynthèse de l'ornibactine chez *B. cenocepacia* J2315 et les homologues chez *B. pseudomallei* K96243 et *B. thailandensis* E264 (www.burkholderia.com) 18

Figure 6. A) Présentation des gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de l'ornibactine chez *B. cenocepacia*. B) Schéma représentatif de l'organisation génétique de l'ornibactine. Le schéma montre entre autre les gènes impliqués dans la biosynthèse du sidérophore, les gènes engagés dans son transport à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule et les gènes impliqués dans la libération du fer. Tirée de l'article (Thomas, 2007).....19

Figure 7. Les gènes de la biosynthèse de la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* et chez les homologues de *Burkholderia*. 20

Figure 8. Effet du type d'agar sur l'efficacité de détection des sidérophores sur géloses Chrome Azurol S. 26

Figure 9. Représentation visuelle de la méthode PCR double-ronde semi-arbitraire. 30

Figure 10. Production de sidérophores sur gélose CAS. 34

Figure 11. Détection par CLHP-SM de la pyochéline dans des cultures de bactéries. 35

Figure 12. Fragmentogramme de l'ion pseudomoléculaire *m/z* 323 chez *B. cepacia* ATCC 25416. 36

Figure 13. Fragmentogramme de l'ion pseudomoléculaire *m/z* 323 chez *P. aeruginosa* PA14. 36

Figure 14. Chromatographie de MRM de la transition de l'ion précurseur *m/z* 323 vers l'ion fille *m/z* 222 pour la détection de la pyochéline.....37

Figure 15. Exemple d'une plaque de criblage effectué sur *B. thailandensis* E264. 39

Figure 16. Exemple d'une plaque de criblage effectué sur le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*. 40

Figure 17. Sélection de transposants d'intérêts sur gélose CAS.....41

Figure 18. Courbes de croissance de mutants obtenus par criblage différentiel phénotypique 42

Figure 19. Production de sidérophores sur géloses CAS par des mutants. 50

Figure 20. Comparaison de la production des molécules 790, 762 et 636 Da chez *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264 et *AhlΔmbaF*. 52

Figure 21. Chromatographies des molécules de 790 Da et de 762 Da 53

Figure 22. Fragmentogramme des ions précurseurs *m/z* 791 et *m/z* 761 chez *B. thailandensis* E264. 53

Figure 23. Analyse des chromatogrammes des surnageants de *E264AhlΔmbaF*, *B. thailandensis* E264 et *AhlΔmbaS.* 54

Figure 24. Spectre de masses au temps de rétention 6 à 9 minutes chez le mutant *AhlΔmbaF*. Ions d'intérêts : *m/z* 606, *m/z* 613, *m/z* 621 et *m/z* 637.....55

Figure 25. Comparaison, par CLHP-SM, de la production des molécules d'intérêts 605 Da, 612 Da, 620 Da et 636 Da chez *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264, *AhlΔmbaF* et *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*. 56

Figure 26. Chromatogramme d'un surnageant du mutant *AhlΔmbaF* avec l'ajout de gallium [13 mM] 58

Figure 27. Chromatogramme d'un surnageant du mutant *AhlΔmbaF* avec l'ajout de fer [13 mM] 58

Figure 28. Effet de l'ajout de sérine et ornithine sur la production de la malléobactine chez le mutant *AhlΔmbaF*.....60

Figure 29. Analyse par CLHP-SM de l'ornibactine-C6 en mode positif. 61

Figure 30. Spectre de masses au R_t de l'ornibactine-C6. 62

Figure 31. Spectre de masses des ions simplement chargés de l'ornibactine-C6.....63

Figure 32. Spectre de masses des ions doublement chargés de l'ornibactine-C6. 63

Figure 33. Fragmentation de l'ion précurseur de l'ornibactine-C6.....64

Figure 34. Chromatogrammes correspondant à l'ornibactine-C6 et l'ornibactine-C8. 65

Figure 35. Spectre de masses au R_t de l'ornibactine-C6 et de l'ornibactine-C8 chez *B. cepacia* ATCC2 5146. 66

Figure 36. Fragmentogramme de l'ion précurseur de l'ornibactine-C8 (*m/z* 737) et de l'ornibactine-C6 (*m/z* 709) chez *B. cepacia* ATCC2 5146. 67

Figure 37. Fragmentation de l'ion précurseur doublement chargé de l'ornibactine-C8 (*m/z* 369) et de l'ion précurseur doublement chargé de l'ornibactine-C6 (*m/z* 355) chez *B. cepacia* ATCC2 5146. 67

Figure 38. Fragmentogramme des ions précurseurs des molécules d'intérêts chez le mutant *AhlΔmbaF.* 68

Figure 39. Production de la malléobactine en fonction de la croissance durant 100 heures chez *B. thailandensis*.....70

Figure 40. Production de la malléobactine 636 Da en fonction de la croissance durant 160 heures chez *B. thailandensis*.....71

Figure 41. Représentation schématique de l'extraction de la malléobactine. 72

Figure 42. Évaluation quantitative de la malléobacine de 636 Da lors des étapes d'extraction avec la résine Amberlite XAD-4 (partie 1).....73

Figure 43. Évaluation quantitative de la malléobactine de 636 Da lors des étapes d'extraction avec la résine Amberlite XAD-4 (partie 2).....74

Figure 44. Évaluation structurelle des congénères de la malléobactine et de leur précurseurs. 75

Figure 45. Représentation structurelle de la malléobactine et ses dérivés. Image adapté de Franke *et al.* (Franke *et al.*, 2013).....80

Figure 46. Gènes de la biosynthèse de la mallébactine selon (Franke *et al.*, 2013).....81

Liste des tableaux

Tableau 1. Amorces utilisées lors de cette étude.....29

Tableau 2. Réactifs utilisés pour l'amplification PCR, ronde 1 et ronde 2. 29

Tableau 3. Étapes de réaction pour les amplifications PCR, ronde 1 et ronde 2.....30

Tableau 4. Quantification de la pyochéline chez les bactéries d'intérêts.....38

Tableau 5. Résultats des criblages effectués sur *B. thailandensis* E264 souche sauvage et le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* 43

Tableau 6. Récapitulatif des gènes préalablement connus pour être reliés à la malléobactine, obtenus lors des criblages.....49

Tableau 7. Ions attendu sur les chromatogrammes s'il y a activité chélatrice 57

Liste des abréviations

QS	*Quorum Sensing*
BCC	complexe *Burkholderia cepacia*
FK	Fibrose kystique
MGC	Maladie granulomateuse chronique
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLHP-SM	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
CLHP-SM/SM	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
R_t	Temps de rétention
AHL	*N*-acyl-homosérine lactone
C_6-HSL	*N*-hexanoyl-HSL
C_8-HSL	*N*-octanoyl-HSL
C_{10}-HSL	*N*-décanoyl-HSL
3-OHC_8-HSL	*N*-3-hydroxy-octanoyl-HSL
3-OHC_{10}-HSL	*N*-3-hydroxy-décanoyl-HSL
3-OC_{14}-HSL	*N*-3-oxo-tétradécanoyl-HSL
MM9	Milieu minimal M9
MM9C	Milieu minimal M9 chelexé
MM9M	Milieu minimal M9 chelexé et enrichi de 10 mM L-sérine et L-ornithine
CAS	Milieu Chrome Azurol S
MRM	*Multiple Reaction Monitoring*
RMN	Résonnance magnétique nucléaire

Introduction

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires retrouvées dans pratiquement tous les types d'environnements. Mesurant que quelques micromètres, ces dernières font parties des plus petits et des plus nombreux organismes vivants sur terre. À l'encontre des cellules de type eucaryotes que l'on retrouve chez les organismes complexes comme les animaux et les plantes, les bactéries sont des procaryotes, c'est-à-dire dépourvus de noyau et autres organelles encapsulées dans des membranes. La diversité étonnante des bactéries se mesure entre autres à la capacité de certaines à croître dans des conditions diverses et même parfois hostiles telles que les milieux aux pH extrêmes, les environnements à très haute et/ou basse température, aux milieux très salins ainsi qu'aux conditions de haute pression.

La majorité d'entre elles sont inoffensives et même considérées bénéfiques pour les organismes dits « supérieurs » tels les animaux. De manière naturelle, pensons ici aux bactéries dans la flore intestinale qui vivent en symbiose avec d'autres microorganismes pour aider à la digestion ou même aux bactéries qui décomposent la matière organique et la transforme en source d'énergie et en nutriments. Dans la même ligne de pensée, les axes d'applications possibles sont aussi nombreux et diversifiés que les environnements où peuvent croître ces organismes vivants. Par exemple, il n'est pas rare d'utiliser certaines bactéries dans l'alimentation pour leur propriété probiotique et/ou de conservation, d'exploiter les vertus de « décomposeurs » des bactéries dans l'environnement pour la dépollution de produits dangereux des sols et eaux contaminés ou même d'épandre ces microorganismes en agriculture comme agents de biocontrôle pour la défense des plantes contre les insectes et les champignons envahissants.

D'autre part, certaines bactéries sont considérées néfastes et même mortelles pour l'humain. Parmi les maladies causées par des bactéries, on peut compter l'anthrax, la tuberculose, la méningite et sans oublier les maladies respiratoires qui sont parfois sans conséquence pour les gens en santé, mais qui peuvent devenir fatales pour une personne immunodéficiente. Pour contrer ces microorganismes, les antibiotiques sont intensément utilisés. Cependant, avec le temps et en raison d'un excès d'exposition aux antibiotiques, certaines bactéries sont devenues résistantes à leur effet et leur nombre ne cesse de croître.

Pour ces raisons, au cours des dernières décennies, les scientifiques cumulent les recherches afin de trouver de nouvelles approches pour remédier à cette problématique alarmante. Une effervescence se fait sentir pour la découverte et l'élucidation des mécanismes et des stratégies qu'emploient les bactéries pour contourner le système

immunitaire et ainsi infecter l'hôte. Une de leurs stratégies est notamment leur capacité à communiquer entre elles ainsi qu'avec leur environnement via ce qu'on appelle le *quorum sensing* (QS). Effectivement, les bactéries ont toujours été considérées et étudiées comme des cellules individuelles. La découverte d'une communication intercellulaire entre certains organismes procaryotes vient donc révolutionner la manière d'étudier ces derniers et un intérêt grandissant s'est manifesté à l'égard de leur agissement en communauté. Le QS est déclenché par l'atteinte d'un seuil critique de la densité de population en lien direct avec la détection de molécules de signalisation libérées dans l'environnement par les bactéries. Ce phénomène alerte les bactéries qu'elles sont en nombre suffisant pour activer ou réprimer l'expression de gènes cibles. Ces gènes regroupent plusieurs facteurs de virulence tels que la production d'exoenzymes (cellulases, protéases, pectinases) de toxines et même de sidérophores.

Les sidérophores sont des molécules chélatrices présentant une très haute affinité pour le Fe^{3+}, un élément essentiel à la survie de la plupart des organismes vivants. Ces molécules sont produites et sécrétées entre autres par les bactéries et les levures en conditions limitantes en fer. Les sidérophores sont considérés comme des facteurs de virulence puisqu'ils compétitionnent avec les protéines de l'hôte (p. ex. transferrine, lactoferrine et ferritine) pour l'acquisition du fer, permettant ainsi à un pathogène de survivre et d'établir une infection.

Ce projet s'intéressait tout d'abord aux sidérophores produits par la bactérie *Burkholderia thailandensis*, un bacille à Gram négatif utilisé comme modèle alternatif pour le pathogène *Burkholderia pseudomallei*, l'agent causatif de la mélioïdose. Il a été confirmé que les deux bactéries produisent deux types de sidérophores soit la pyochéline et la malléobactine.

Les objectifs principaux de ce projet étaient de caractériser la malléobactine puisque la structure de cette dernière n'avait pas encore été élucidée et d'identifier les gènes impliqués dans sa production.

Durant l'étude, la caractérisation structurelle de la malléobactine chez *B. thailandensis* fut cependant rapportée par l'équipe de Christian Hertweck (Franke, Ishida *et al.* 2013). On confirme dans cet article l'hypothèse émise par Alice *et al.* (Alice, Lopez *et al.* 2006) que la malléobactine est constituée d'un groupe de molécules comportant des masses moléculaires différentes tout comme l'ornibactine, un sidérophore produit chez quelques membres du *complexe Burkholderia cepacia* (BCC). Ce groupe de chercheurs a également identifié les gènes impliqués dans la régulation et la synthèse de la malléobactine. La majorité des résultats présentés dans ce mémoire concordent fortement avec les résultats obtenus dans l'article de Franke *et al.* (Franke, Ishida *et al.* 2013). Ceci démontre que les expériences

effectuées auraient éventuellement mené aux mêmes conclusions que celles émises par l'équipe de Christian Hertweck.

Chapitre 1 – Revue de littérature

1.1. *Burkholderia*

Le genre *Burkholderia* est un groupe de bactéries à Gram négatif hautement versatiles pouvant nicher dans divers environnements. La première espèce de ce genre, initialement nommé *Pseudomonas cepacia*, a été découverte en 1949 par le pathologiste Américain Walter Hagemeyer Burkholder, un pionnier dans la taxonomie bactérienne. Il a décrit cette bactérie comme étant l'agent étiologique du « *sour skin* » qui est en fait la pourriture des bulbes d'oignions (Burkholder, 1950).

En 1992, Yabuuchi *et al.* (Yabuuchi *et al.*, 1992) proposent et créent le genre *Burkholderia*, nom donné en hommage à Bukholder, afin de réunir quelques bactéries appartenant au groupe d'homologie II du genre *Pseudomonas*. Ces chercheurs se sont basés sur l'étude de données telles que des séquençages d'ARNr 16S, d'homologies ADN-ADN, des compositions de lipides et d'acide gras cellulaires et des caractéristiques phénotypiques pour ainsi créer le nouveau genre (Coenye *et al.*, 2001, Woods *et al.*, 2006). De nos jours, selon le LPSN « *List of Prokaryotic names with Standing in Normenclature* » (http://www.bacterio.net), le genre comprend 74 espèces dont l'espèce type est *Burkholderia cepacia* (Burkholder, 1950, Palleroni *et al.*, 1981).

Tel que mentionné plus haut, les microorganismes appartenant au genre *Burkholderia* sont reconnus comme étant des bactéries ubiquitaires ayant des niches écologiques très variées. En effet, on peut les retrouver dans le sol, la rhizosphère, l'eau ainsi que chez l'humain, les insectes, les animaux et les plantes (Stoyanova *et al.*, 2007). Initialement, on les considérait comme étant des bactéries saprophytes affectant les plantes et la rhizosphère, à l'exception de deux espèces soit *B. pseudomallei* et *B. mallei,* qui sont deux pathogènes primaires chez l'humain et l'animal. Chez les plantes, les *Burkholderiaceae* peuvent jouer des rôles contradictoires. En effet, certains d'entre eux sont connus pour avoir une interaction bénéfique envers les plantes tandis que d'autres sont d'importants phytopathogènes. Par exemple, *Burkholderia phymatum* et *Burkholderia tuberum* vivent en symbiose avec les fabacées en formant des nodosités pour la fixation de l'azote atmosphérique (Moulin *et al.*, 2001, Vandamme *et al.*, 2002).

À l'opposé, parmi les phytopathogènes, on peut inclure entre autres *B. caryophylli* qui occasionne le flétrissement chez les œillets (Kawanishi *et al.*, 2009)*, Burkholderia andropogonis* qui cause d'importantes taches brunes et lésions sur les feuilles, les bourgeons et les tiges chez une grande variété de plantes telles le trèfle blanc et l'œillet. Ce pathogène fait également des dégâts dans les récoltes plus commerciales et importantes comme les récoltes du maïs, de pois chiche, du café et du citron (Duan *et al.*, 2009) .

En raison de leur grande versatilité, certaines espèces du genre *Burkholderia* peuvent s'avérer utiles pour l'environnement et l'agriculture. En effet, ces bactéries ont le potentiel d'être d'efficaces agents de biocontrôle, de bioremédiation et de promoteurs pour la croissance des plantes. Cependant, l'utilisation des BCC dans des applications biotechnologiques reste proscrite pour l'instant puisque certaines espèces sont des pathogènes opportunistes de l'humain et que la possibilité d'infection reste un enjeu encore trop important (Vial *et al.*, 2011).

1.1.1. Le complexe *Burkholderia cepacia* (BCC)

Les BCC sont des microorganismes hautement adaptifs retrouvés dans des niches écologiques très diverses (Vial et *al.* 2011). Ce sont d'importants pathogènes opportunistes chez l'humain pouvant causer de graves infections respiratoires. Ces microorganismes ne sont pas considérés comme une menace pour la population en santé, mais peuvent vite engendrer des complications aggravantes et même mortelles pour les personnes souffrant de Fibrose kystique (FK), les gens immunodéprimés ainsi que les personnes atteintes de la maladie granulomatose septique chronique (MGC). Des études taxonomiques approfondies ont révélé que le complexe *Burkholderia cepacia* est composé de 17 espèces très similaires qui se différencient seulement en combinant une multitude de diagnostics moléculaires (Sousa *et al.*, 2011).

1.1.2. *Burkholderia pseudomallei*

B. pseudomallei, comme la majorité des autres espèces du genre *Burkholderia*, est dit saprophyte et est retrouvé dans des niches environnementales diverses comme l'eau, les sols humides et les rizières (Brook *et al.*, 1997). Il s'agit cependant de l'agent étiologique de la mélioïdose, une maladie infectieuse endémique au Sud-est de l'Asie et au nord de l'Australie (Dance, 1991). Au même titre que *B. mallei* qui est l'agent responsable de la morve chez les animaux, cette bactérie est considérée un pathogène primaire tant chez les humains que chez les animaux (Coenye *et al.*, 2003). Les individus qui contractent la mélioïdose peuvent être asymptomatique ou développer de multiples manifestations cliniques comme des infections pulmonaires et cutanées pouvant rapidement devenir des pneumonies aigue ou chronique, des abcès, et même évoluer vers une septicémie fatale (Cheng *et al.*, 2005). L'infection par la bactérie se fait surtout par contact de plaies avec des sols ou des eaux contaminés, par inhalation de particules infectieuses et plus rarement par ingestion (Leelarasamee *et al.*, 1989). Les traitements par antibiotiques contre cette bactérie s'avèrent longs, fastidieux et parfois inefficaces puisque le microorganisme est naturellement résistant à une panoplie d'antibiotiques. La forme latente peut se maintenir sur des périodes étendues et des rechutes de la mélioïdose ont même été observées après un traitement réussi. De plus, ce pathogène est considéré comme une arme biologique potentielle qui peut présenter un risque de bioterrorisme. Pour ces raisons, cette bactérie nécessite d'être manipulée avec précaution et requiert un confinement de niveau 3 (Rotz *et al.*, 2002).

1.1.3. *Burkholderia thailandensis*

L'espèce *B. thailandensis* fut créée lorsque des groupes de chercheurs se sont penchés sur l'étude de la pathogénicité de *B. pseudomallei* en comparant des souches virulentes et avirulentes. Les dissimilitudes observées dans les profils biochimiques, phénotypiques et génotypiques ont permis de conclure que les souches avirulentes de *B. pseudomallei* représentaient en fait une nouvelle espèce à part entière (Brett *et al.*, 1997, Wuthiekanun *et al.*, 1996). Ce n'est qu'après une analyse phylogénétique de l'ADNr 16s de *B. thailandensis* E264, dont le nom initial fut « *B. pseudomallei*-like E264 », et de *B. pseudomallei* 1026b, un isolat clinique virulent, que l'on confirma définitivement la présence d'une nouvelle espèce. En effet, l'accumulation d'informations sur les différences au niveau de leurs séquences d'ADNr 16s, de leurs profils biochimiques ainsi que de leur virulence prouve suffisamment qu'il s'agit bien de deux espèces distinctes et ce même si *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* possède un très haut niveau de similarité dans leurs séquences génomiques (Brett *et al.*, 1998).

Cette découverte a rendu possible une panoplie d'études sur la pathogénicité de *B. pseudomallei*. Par exemple, *B. thailandensis* possède la capacité d'assimiler le L-arabinose comme source de carbone à l'opposé de *B. pseudomallei* ainsi que de *B. mallei* qui ne possèdent pas l'opéron d'assimilation de l'arabinose. Cette particularité génétique suggère que les gènes qui encodent l'assimilation de l'arabinose pourrait être considérés comme « antivirulents » et que la perte de cette capacité autant chez *B. pseudomallei* que chez *B. mallei* serait liée à l'augmentation de la virulence chez ces derniers (Moore *et al.*, 2004).

Cette ressemblance au niveau de la séquence génomique entre *B. thailandensis* et sa consœur pathogène ainsi que la non-nécessité d'un confinement de niveau 3, en raison de son absence de virulence pour l'humain, fait de *B. thailandensis* le modèle alternatif idéal pour étudier ses consœurs pathogènes.

1.2 Le *quorum sensing*

Le QS est un système de communication intercellulaire bien reconnu chez les bactéries. Cette stratégie permet à ces dernières de déclencher l'expression coordonnée de gènes particuliers en réponse à une densité précise de leur population (Williams, 2007). À leur tour, ces gènes dont l'expression est coordonnée par la coopération de la population rendent possible des phénomènes de groupe tels la formation de biofilm, la motilité de type *swarming*, la bioluminescence, ainsi que l'expression de divers facteurs de virulence tels que

la production d'exoenzymes, d'antibiotiques et de toxines (Miller *et al.*, 2001, Wade *et al.*, 2005, Whitehead *et al.*, 2002). Le phénomène du QS a été identifié pour la première fois chez la bactérie *Vibrio fischeri*, une bactérie marine bioluminescente qui colonise les organes à lumière de certains poulpes (Ruby *et al.*, 1999). Chez ce microorganisme, les gènes de la bioluminescence (*lux*) sont contrôlés par le système LuxIR (Bassler, 2004). Des études plus approfondies du mécanisme ont permis d'établir qu'il y avait production d'une molécule de signalisation diffusible nommée auto-inducteur par une autoinducteur-synthase (I) qui est le produit du gène *luxI*. Lorsqu'il est synthétisé, l'auto-inducteur diffuse dans le milieu extracellulaire et s'accumule. À forte densité cellulaire, sa concentration atteint un certain seuil qui permet à cette dernière de se lier à un régulateur transcriptionnel (R) qui est le produit du gène *luxR*. Cette association permet l'activation de gènes cibles en plus d'activer l'autoinducteur-synthase elle-même (Figure 1). Il s'agit donc également d'une boucle de rétroactivité positive, une des caractéristiques majeur du QS (Fuqua *et al.*, 1994). Étant donné que ce système est le premier à avoir été décrit, on parlera d'homologues au système LuxIR pour les protéines jouant le même rôle chez d'autres bactéries (Fuqua *et al.*, 1994).

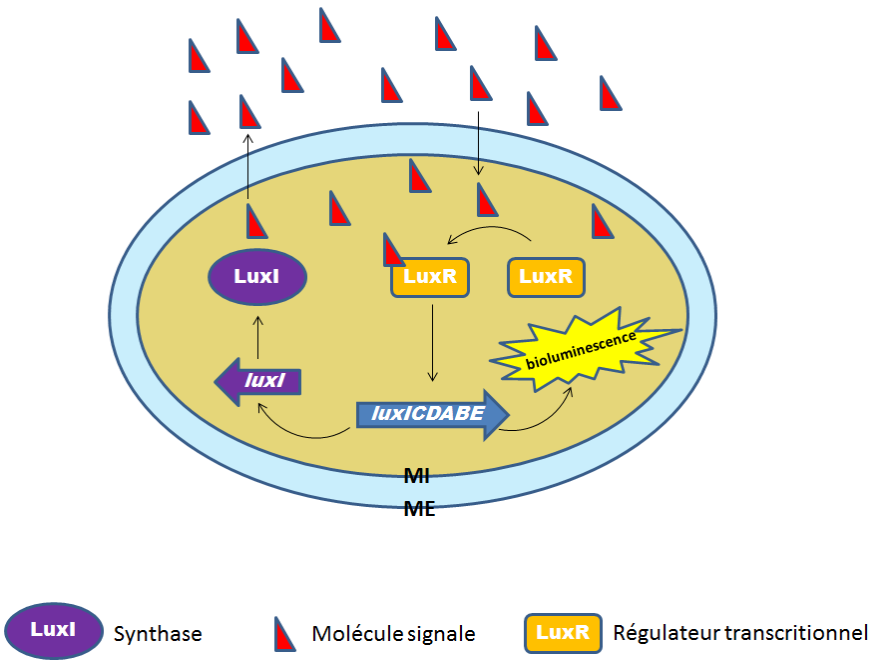


Figure 1. Représentation schématique d'un système de *quorum sensing* LuxIR chez *Vibrio fisheri*. MI, membrane interne; ME, membrane externe. Adapté de (Waters *et al.*, 2005)

Des systèmes de QS ont été identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif ainsi que chez certaines mycètes. La majorité des bactéries à Gram négatif produisent des dérivés d'acides gras nommés N-acyl-homosérine lactones (AHLs) comme

molécules de signalisation tandis que chez les Gram positif, la communication se fait plutôt par l'entremise d'acides aminés et d'oligo-peptides (Miller *et al.*, 2001).

1.2.1. Systèmes de *quorum sensing* chez le complexe *Burkholderia cepacia*

Chez les BCC, la présence d'un système de QS a été mise en évidence lors d'une expérience qui consistait à additionner du surnageant de culture de *Pseudomonas aeruginosa* contenant des AHLs dans la culture de *B. cepacia*. Cette co-culture a stimulé la production de facteurs de virulence tels des sidérophores, des protéases et des lipases chez *B. cepacia*. (McKenney *et al.*, 1995). Cette observation a permis d'appuyer le principe qu'une communication entre différentes espèces est possible en raison de la haute conservation génétique des éléments de régulation du QS et de la similarité existante entre la structure des AHLs produits par ces différentes bactéries. L'identification de gènes homologues à *LuxIR* chez *B. cepacia* a été réalisée par la suite grâce à une mutagénèse aléatoire par transposon Tn5-OT182 sur la bactérie *B. cepacia* K56-2. L'observation de mutants hyperproducteurs de sidérophore sur le milieu solide chrome azurol S (CAS) a tout d'abord permis l'identification d'un gène homologue à *luxR*. Cet homologue a été nommé *cepR*. Au cours de la même étude, l'homologue de *luxI*, nommé *cepI*, a été identifié à 727 pb en amont de *cepR*. La synthase CepI produit majoritairement du C_6-HSL et du C_8-HSL (Lewenza *et al.*, 1999). Des études subséquentes révèlent que toutes les espèces du BCC possèdent le système CepIR et produisent du C_6-HSL et du C_8-HSL (Gotschlich *et al.*, 2001, Lutter *et al.*, 2001).

1.2.2. Le *quorum sensing* chez *B. pseudomallei, B. thailandensis et B. mallei*

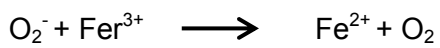
B. pseudomallei, *B. thailandensis* ainsi que *B. mallei* possèdent des systèmes de QS homologues (Majerczyk *et al.*, 2014, Smith *et al.*, 1997). Cependant, la complexité de ces systèmes est plus remarquable chez ces derniers que pour les espèces de BCC. En effet, on leur associe plusieurs orthologues LuxIR qui produisent une panoplie de molécules de signalisation différentes. *B. pseudomallei* et *B. thailandensis* possèdent trois paires LuxIR (LuxIR-1, LuxIR-2 et LuxIR-3) ainsi que deux homologues de LuxR (LuxR-4 et LuxR-5) dits « orphelins » puisqu'aucun homologue LuxI ne leur ai encore associé (Majerczyk *et al.*, 2014). Le système LuxIR-2 est absent chez *B. mallei*, ce qui serait le résultat d'une délétion de la région encodant ce système chez cette espèce (Ong *et al.*, 2004).

Chez les trois bactéries, le système LuxIR-1 contrôle la production du C_8-HSL (Duerkop *et al.*, 2007, Song *et al.*, 2005). Chez *B. pseudomallei*, les systèmes LuxIR-2 et LuxIR-3 produisent quant à eux du 3-OH-C_{10}-HSL et du 3-OH-C_8-HSL, respectivement (Gamage *et al.*, 2011). Chez *B. thailandensis*, le système LuxIR-2 produit majoritairement du 3-OHC_{10}-HSL ainsi qu'une petite quantité de 3-OHC_8-HSL et le système LuxIR-3 contrôle la production du 3-OHC_8-HSL. Il est rapporté que *B. thailandensis* synthétise un antibiotique qui agit contre des bactéries Gram positif et que la production de cet antibiotique est sous le contrôle de LuxIR-2. Le système LuxIR-3 contrôle également la production du 3-OHC_8-HSL chez *B. mallei* (Chandler *et al.*, 2009, Duerkop *et al.*, 2009, Ulrich *et al.*, 2004). Le QS chez *B. pseudomallei*, nommé BpsIR, est requis pour sa pathogénicité chez des modèles murins. Le système serait entre autre impliqué dans la sécrétion de quelques facteurs de virulences tel la phospholipase C et les sidérophores (Chan *et al.*, 2005, Song *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2004). Par homologie, chez *B. thailandensis*, le système de QS est appelé BtaIR.

1.3 L'importance du Fer

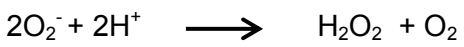
Le fer est un élément fondamental pour la survie des organismes vivants, incluant les microorganismes. Ce métal agit comme cofacteur pour de nombreuses enzymes impliquées dans des processus biologiques divers et essentielles comme le transfert d'électrons, le cycle de Krebs, ainsi que la synthèse de l'ADN (Andrews *et al.*, 2003, Caza *et al.*, 2013). Le fer existe principalement sous deux formes naturellement réversibles c'est-à-dire le fer ferreux Fe^{2+} (forme réduite) ainsi que le fer ferrique Fe^{3+} (forme oxydée). Malgré son abondance dans l'environnement, le fer est très peu biodisponible pour les êtres vivants. En effet, en présence d'oxygène, le fer ferreux tend à s'oxyder spontanément en fer ferrique qui est très peu soluble à pH neutre. De plus, dans l'environnement, le Fe^{3+} réagit avec les ions de OH^- pour former des complexes très stables d'hydroxydes ferriques $Fe(OH)_3$. Tous ces facteurs font en sorte que la concentration du fer ferreux disponible pour l'utilisation des microorganismes dans l'environnement n'est que de l'ordre de 10^{-19} à 10^{-18} M (Miethke *et al.*, 2007). Dans un hôte mammifère, le fer est vigoureusement séquestré par des protéines spécialisées telle l'hémoglobine, la ferritine, la lactoferrine et la transferrine afin de maintenir une homéostasie stricte de cet élément (Miethke *et al.*, 2007, H. M. Yang *et al.*, 1991). En effet, malgré l'importance de son implication dans les réactions biologiques, le fer est un élément potentiellement très toxique en raison de la formation intracellulaire de radicaux hydroxylé OH• (Braun, 1997). Ces radicaux libres se forment suite à une chaîne de réactions chimiques impliquant entre autres la réduction du fer ferrique en fer ferreux ainsi que la

production de dérivés réactifs de l'oxygène qui est en fait une conséquence naturelle liée à la vie aérobie.



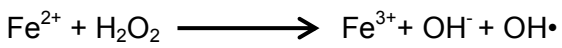
$$O_2^- + Fer^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Tout débute lorsque des molécules d'oxygène se transforment en radical anion superoxyde O_2^- suite à l'acceptation d'un électron. Lorsque cet ion acquiert un deuxième électron, un ion peroxyde O_2^{2-} se forme. De prime à bord, cet ion n'est pas toxique. Cependant, ce dernier se transforme spontanément, à pH physiologique, en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et en dioxygène O_2 suivant la réaction suivante :



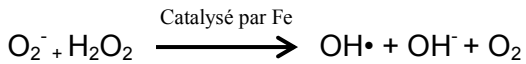
$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Lorsque le peroxyde d'hydrogène rencontre le fer ferreux, il se forme une réaction dite « de Fenton » qui implique l'oxydation du fer ferreux. Le mélange de ces deux réactifs produit spontanément un radical hydroxyle OH•.



$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$$

Une autre réaction peut également subvenir si le radical anion superoxyde O_2^- vient à rencontrer le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Il y a alors formation du radical hydroxyle OH• suivant la réaction de Haber – Weiss (Andrews *et al.*, 2003, Halliwell *et al.*, 1984) :



$$O_2^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalysé par Fe}} OH\bullet + OH^- + O_2$$

Le radical hydroxyle OH• est de loin le plus destructeur puisqu'il peut réagir fortement et endommager plusieurs molécules organiques cellulaires, telles que la membrane lipidique, les protéines cellulaires ainsi que l'ADN (Cadet *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 1999). Pour ces raisons, la régulation, le transport, le stockage ainsi que l'utilisation du fer sont rigoureusement contrôlés chez les êtres vivants. Encore une fois, en raison de tous ces facteurs, la concentration du fer biodisponible est très faible, de l'ordre du 10^{-24} M environ dans le sérum (Cornelis, 2010, Raymond *et al.*, 2003, Wandersman *et al.*, 2004). Ces

concentrations de fer biodisponible ne sont pas suffisantes considérant qu'une cellule bactérienne nécessite entre 10^5 à 10^6 d'ions ferriques afin de maintenir une concentration interne d'environ 10^{-6} M (Braun *et al.*, 1999, Raymond *et al.*, 2003).

1.4 Les systèmes d'acquisition du Fer

Comme mentionné plus tôt, le fer est primordial pour la croissance des microorganismes incluant les bactéries. La capacité d'un pathogène d'acquérir le fer d'un hôte est un des préalables essentiels pour l'établissement et le maintien d'une infection (Caza *et al.*, 2013, Payne *et al.*, 1978, H. M. Yang *et al.*, 1991).

Pour faire face à la rareté du fer biodisponible, les bactéries ont établi plusieurs stratégies d'acquisition. La mise en œuvre de ces mécanismes est dépendante de plusieurs facteurs dont la disponibilité du fer dans l'environnement, du degré d'oxydation de ce dernier ainsi que la forme sous laquelle il subsiste (ionique ou complexé) (Andrews *et al.*, 2003).

Il existe deux catégories de mécanismes d'acquisition du fer, la façon directe et la façon indirecte. De manière directe, le fer ionique peut être assimilé par des perméases suite à l'action de réductases ou de ferroxidases. Cette méthode d'acquisition se produit normalement lorsque la concentration du fer est suffisante dans le milieu. L'assimilation du fer peut également se faire par l'incorporation des protéines de l'hôte qui sont liées à des ions de fer. On parle ici de protéines spécialisées comme les lactoferrines, les transferrines, les ferritines les hèmes ainsi que les hémoprotéines. Le grand désavantage avec l'assimilation des protéines de l'hôte, c'est la nécessité d'un récepteur spécifique pour chacune de ces sources de fer (Miethke *et al.*, 2007).

Une autre manière d'acquérir le fer, de façon indirecte cette fois-ci, est la sécrétion de molécules capables d'aller s'associer fortement (chélater) au fer disponible et même d'aller « extirper » le fer des protéines de l'hôte. Ces molécules sont nommées sidérophores (Ratledge *et al.*, 2000). Ces dernières sont considérées des facteurs de virulence en raison de cette capacité d'entrer en compétition avec les protéines d'un hôte pour l'acquisition du fer et de maintenir la survie d'un pathogène.

1.5 Les sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faibles masses moléculaires, généralement moins de 1 kDa, qui possèdent une très haute affinité pour le fer ferrique (Faraldo-Gomez *et al.*, 2003). Ces chélateurs sont synthétisés et utilisés par une grande variété de bactéries, de levures, de moisissures et même par certaines plantes (Crowley *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1984). Les sidérophores sont produits seulement durant des périodes importantes de carence intracellulaire en fer. Présentement on compte environ 500 sidérophores isolés et caractérisés (Boukhalfa *et al.*, 2002, Lamont *et al.*, 2002).

Les sidérophores forment souvent des liaisons hexadentates avec le fer ferrique satisfaisant ainsi les six sites de coordination sur l'ion ferrique. Ce complexe extrêmement stable fait d'eux les plus efficaces ligands du fer retrouvés dans la nature (Winkelmann, 2002). Ces molécules sont classées en cinq grands groupes selon leur structure chimique et le groupement impliqué dans la liaison au Fer (Figures 2 et 3). Tout d'abord, il y a la famille des catécholates dont fait partie l'entérobactine, un sidérophore produit entre autres par les bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Crosa *et al.*, 2002). Il s'agit du sidérophore ayant la plus puissante affinité connue pour le fer ferrique, K_d de 10^{-52} M (Caza *et al.*, 2013).

La deuxième classe de sidérophores est les hydroxamates, incluant par exemple le ferrichrome, un sidérophore produit par le basidiomycète *Ustilago maydis* (Neilands, 1995). Ces derniers sont considérés d'excellents ligands du fer ferrique puisqu'ils forment également des liaisons hexadentates avec l'ion. La troisième catégorie de sidérophore est celle des phénolates. Les sidérophores de ce type sont très semblables aux catécholates avec cependant un hydroxyle de moins sur l'anneau de benzène. On considère parfois les 2 groupes comme un seul ensemble. On associe la pyochéline, produit par *P. aeruginosa*, ainsi que la yersiniabactine, produit par *Yersinia pestis*, à ce groupe (Ankenbauer *et al.*, 1988, Carniel, 1999).

Le quatrième groupe est celui des carboxylates qui se distinguent par leurs groupements carboxyles. La particularité avec ces sidérophores est qu'ils possèdent un pK_a se situant entre 3,5 et 5. Ceci fait d'eux des chélateurs de fer très efficaces lors des conditions de pH faible (Miethke *et al.*, 2007). Parmi les carboxylates les plus connus, on peut nommer la staphyloferrine A produite par *Staphylococcus* ainsi que l'achromobactine produite par *Dickeya dadantii* (Konetschny-Rapp *et al.*, 1990, Munzinger *et al.*, 2000).

Le dernier groupe de sidérophore est en fait un mélange des 4 groupes précédents. En effet, plus les recherches s'approfondissent sur l'étude de ces molécules, plus la classification

devient complexe. La découverte de nouveaux sidérophores montre qu'il est possible de retrouver des structures chimiques pouvant appartenir à au moins deux familles différentes sur une seule molécule, engendrant ainsi la classification d'un groupe plus hétéroclite, dont fait partie la mycobactine T produit par la bactérie M*ycobacterium tuberculosis* (De Voss et *al*., 2000).

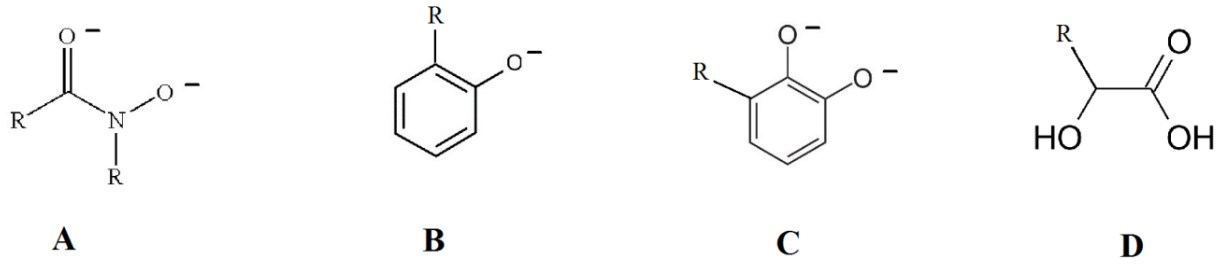


Figure 2. Classification des sidérophores selon leur fonction chimique : A) hydroxamate, B) phénolate, C) catécholate, D) carboxylate.

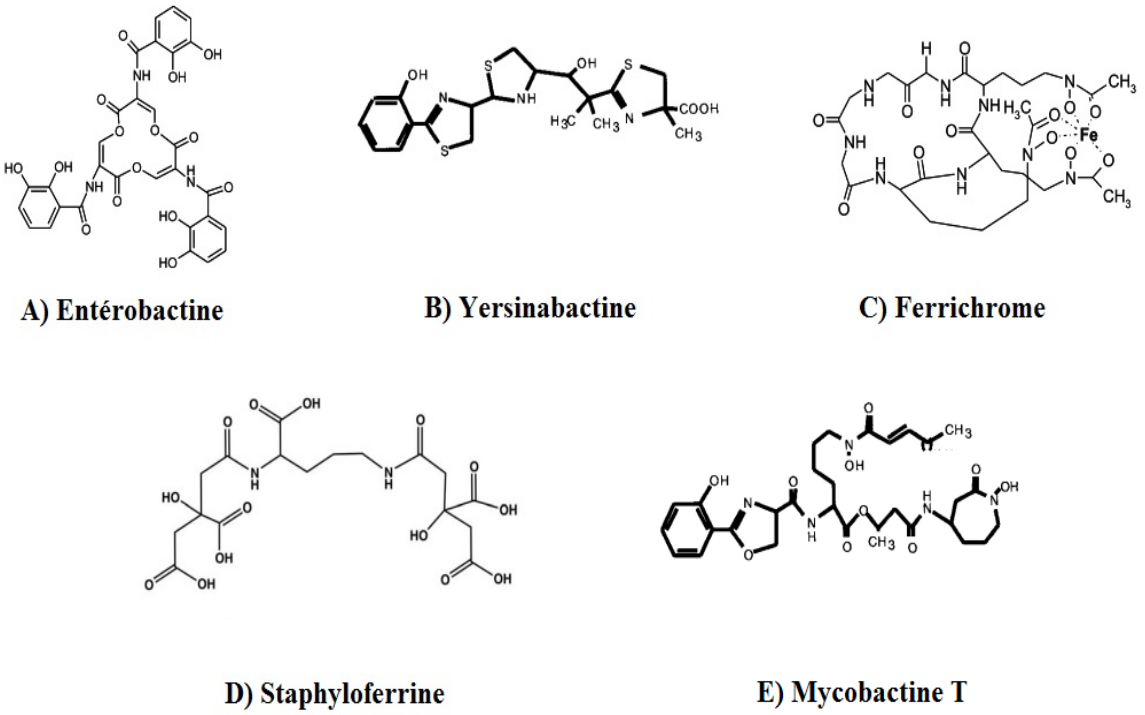


Figure 3. Exemples de sidérophores appartenant à la classe des catécholates (A), des phénolates (B), des hydroxamates (C), des carboxylates (D) et du groupe mixte (E). Tiré de : (Andrews *et al.*, 2003, Crosa *et al.*, 2002, Miethke *et al.*, 2007, Zajdowicz *et al.*, 2012)

1.6 Sidérophore chez *B. pseudomallei*

B. pseudomallei produit de la pyochéline, un sidérophore de la famille des phénolates bien connu chez *P. aeruginosa* ainsi qu'un sidérophore de la famille des hydroxamates nommé la malléobactine (Brandel *et al.*, 2012, H. M. Yang *et al.*, 1991). La malléobactine a été décrite pour la première fois par Yang *et al.* (1991) comme étant un sidérophore d'une masse moléculaire inférieure à 1 kDa provenant de la famille des hydroxamates. On relate dans cet article que la malléobactine a la capacité d'extirper le fer des transferrines et qu'elle jouerait un rôle probable dans la pathogénicité de *B. pseudomallei*. Elle permettrait en effet la multiplication de l'organisme dans le tissu de l'hôte ainsi que sa survie dans le sang.

Peu de temps après, l'équipe de Pamela Sokol (H. Yang *et al.*, 1993) confirme que la malléobactine peut en effet extraire le fer des transferrines, et ce à des pH variés. Néanmoins, les données montrent que c'est à pH 7,4 que l'efficacité de la malléobactine à acquérir le fer des transferrines est la plus élevée. Il a également été confirmé que ce sidérophore pouvait entrer en compétition pour le fer avec les lactoferrines à des pH allant de 5 à 7,4. Cette information est très pertinente puisque la lactoferrine est retrouvée notamment sur les surfaces mucosales où elle joue un rôle important dans la première ligne de défense de l'hôte contre les infections et l'inflammation (Ward *et al.*, 2002). Puisque les infections causées par *B. pseudomallei* sont principalement initiées dans les régions mucosales, cette capacité de la malléobactine d'extirper le fer des lactoferrines pourrait jouer un rôle important durant le stade initial d'une infection. Alice *et al.* (Alice *et al.*, 2006) ont ensuite rapporté des masses moléculaires de la malléobactine et stipulent qu'il ne s'agirait pas d'une seule molécule mais bien d'un groupe de molécules, tout comme l'ornibactine (Figure 4), un sidérophore produit par les BCC (Agnoli *et al.*, 2006, Meyer *et al.*, 1995). Notamment, on rapporte une certaine similitude entre la malléobactine et l'ornibactine. En effet, on leur reconnaît des structures de base analogue, la masse des différents congénères est très rapprochée, et finalement, il a été observé que malléobactine peut rétablir la croissance d'un mutant de *B. cenocepacia* déficient en production d'ornibactine (Alice *et al.*, 2006).

Pour mieux comprendre cette similitude entre l'ornibactine et la malléobactine, une comparaison entre les gènes impliqués dans la production des sidérophores chez *B. cenocepacia* (identifiés par Agnoli et al. 2006), *B. pseudomallei* (Alice et al.2006) et *B. thailandensis* a été effectuée à partir du site **www.burkholderia.com.**

Bien que les opérons codant pour les fonctions reliées à la malléobactine et à l'ornibactine présentent des similitudes (Figure 5), il est possible de remarquer quelques différences importantes. Tout d'abord, *B. pseudomallei* ne possède pas les gènes *orbK et orbL* qui

codent pour des protéines similaires à des *N*-acétyltransferases, protéines essentielles à la biosynthèse de l'ornibactine (Figure 6) (Agnoli *et al.*, 2006). De plus, *B. pseudomallei* possède un gène supplémentaire (BPSL1780) situé en aval du gène BPSL1779, un gène homologue à *orbE* chez *B. cenocepacia* qui code pour un transporteur à *ATP Binding Cassette* (ABC), et dont la fonction est encore inconnue. Jusqu'à maintenant, malgré toutes ces informations, il n'est pas encore clair si la malléobactine et l'ornibactine sont deux sidérophores distincts ou il s'agit de la même molécule.

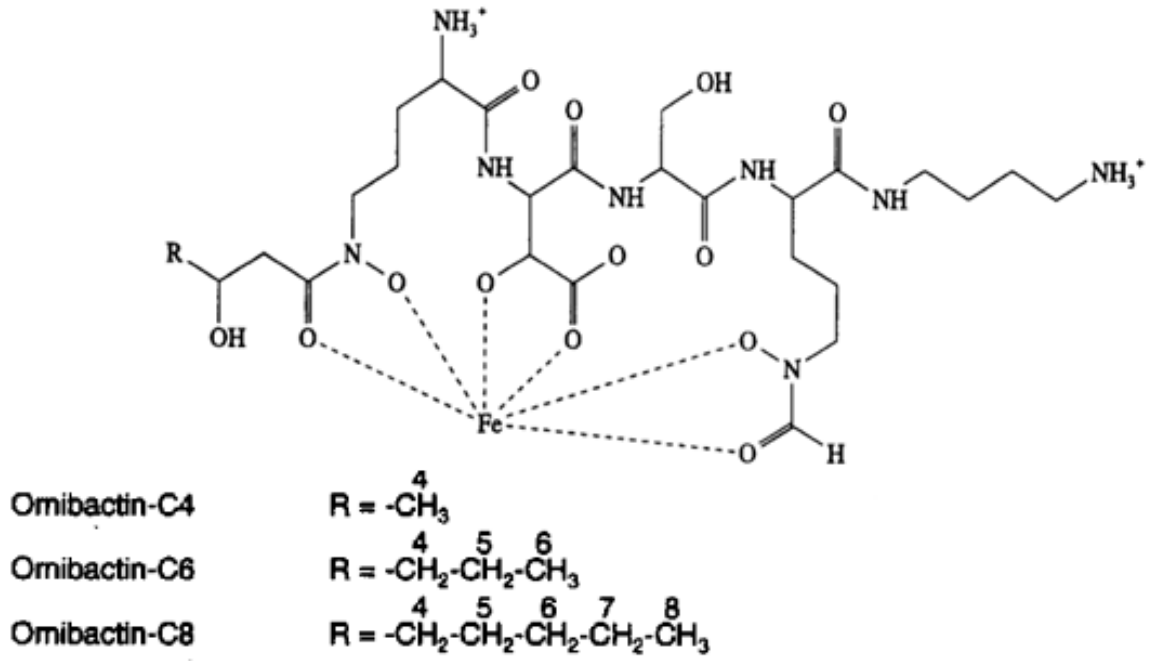


Figure 4. Représentation structurelle de l'ornibactine. Image tirée de (H. Stephan *et al.*, 1993a).

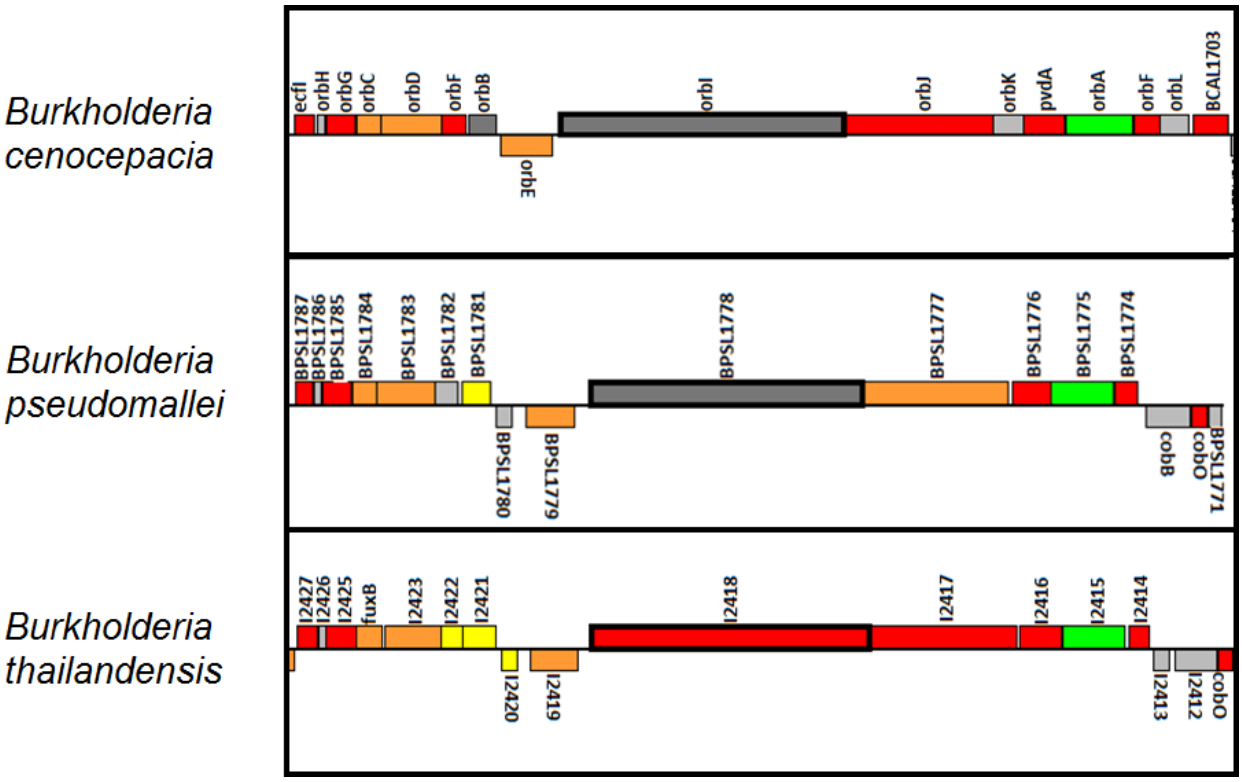


Figure 5. Les gènes de la biosynthèse de l'ornibactine chez *B. cenocepacia* J2315 et les homologues chez *B. pseudomallei* K96243 et *B. thailandensis* E264 (www.burkholderia.com)

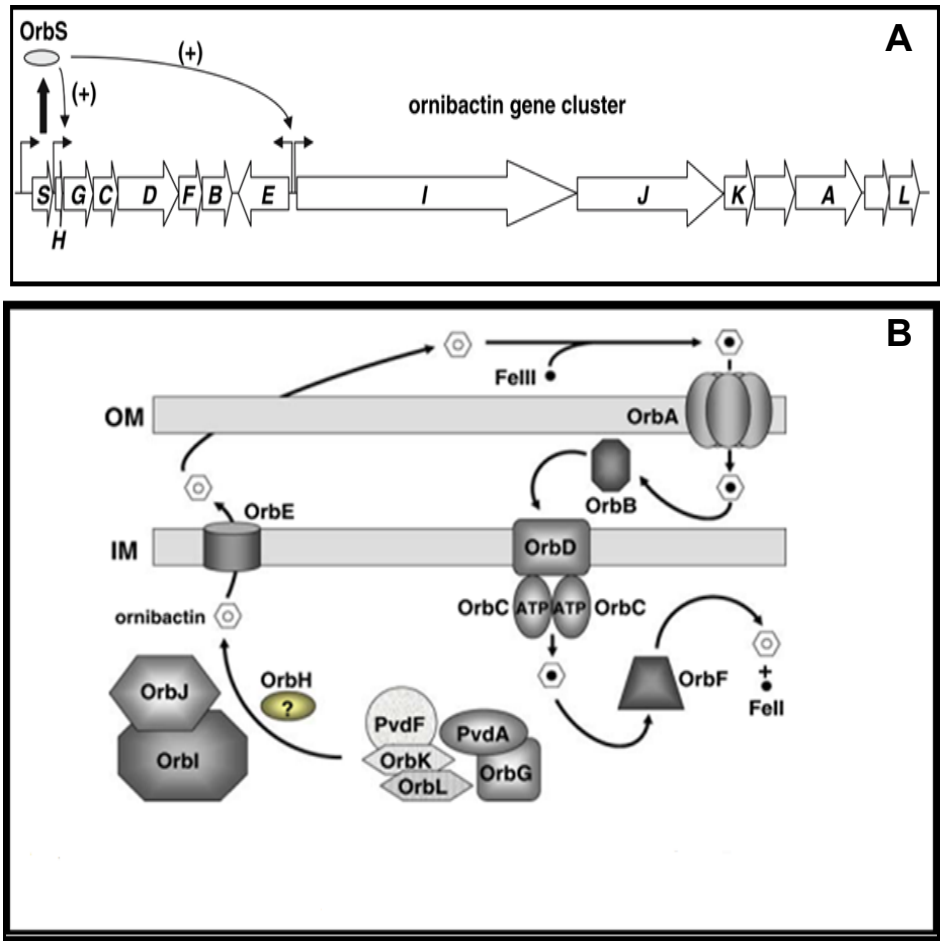


Figure 6. A) Présentation des gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de l'ornibactine chez *B. cenocepacia*. B) Schéma représentatif de l'organisation génétique de l'ornibactine.

Le schéma B montre entre autre les gènes impliqués dans la biosynthèse du sidérophore, les gènes engagés dans son transport à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule et les gènes impliqués dans la libération du fer. Tirée de l'article (Thomas, 2007).

1.7 Sidérophores chez *B. thailandensis*

B. thailandensis produirait une pyochéline analogue à celle produite par *P. aeruginosa et B. pseudomallei*. D'après la Figure 7, les gènes bien connus de la biosynthèse de la pyochéline de *P. aeruginosa s*ont retrouvés chez *B. thailandensis.* La seule différence remarquée sur les gènes de biosynthèse du sidérophore est l'absence d'un homologue au gène *fptB* (PA4220) chez *B. thailandensis* et chez *B. pseudomallei*. Ce gène fait partie de l'opéron *fptABCX* (PA4218_PA4221) qui est impliqué dans le transport de la ferri-pyochéline chez *P. aeruginosa*. Cependant, une mutation sur *fptB* ainsi que sur *fptC* (PA4219) n'a aucun impact sur l'utilisation et la production de la pyochéline alors qu'une mutation sur les gènes *fptA* et *fptX* (PA4218) affecte l'utilisation de la pyochéline et diminue la production de cette dernière

(Michel *et al.*, 2007). Ceci suggère que l'absence de ce gène n'affecterait pas la production de la pyochéline chez *B. thailandensis* et de même chez *B. pseudomallei*.

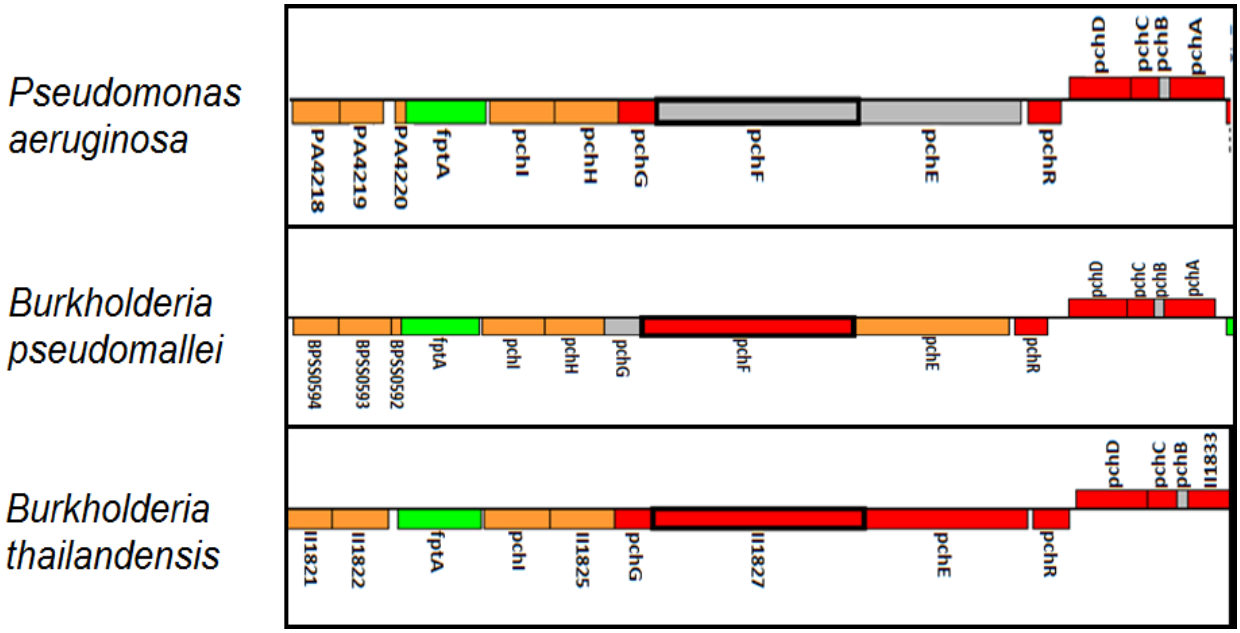


Figure 7. Les gènes de la biosynthèse de la pyochéline chez *Pseudomonas aeruginosa* et chez les homologues de *Burkholderia*.

Les gènes nécessaires à la synthèse et la régulation de la pyochéline chez *P. aeruginosa* PAO1 sont aussi retrouvés chez *B. pseudomallei* souche K96243 et *B. thailandensis* E264 (www.burkholderia.com et www.pseudomonas.com).

Tout comme chez *B. pseudomallei*, les gènes homologues à la biosynthèse de l'ornibactine sont également retrouvés chez *B. thailandensis* (Figure 5). Notons que les mêmes différences entre les gènes de biosynthèse de l'ornibactine chez *B. cenocepacia* et *B. pseudomallei* sont également retrouvées chez *B. thailandensis* (absence d'homologues aux gènes *orbK* et *orbL* et présence d'un gène supplémentaire (BTHI2420) homologue à BPSL1780). Par similitude, *B. thailandensis* pourrait produire un sidérophore semblable sinon identique à la malléobactine. Cependant, tout comme mentionné pour *B. pseudomallei*, il reste à savoir si la malléobactine est bien un sidérophore distinct de l'ornibactine.

Chapitre 2 – Caractérisation de la malléobactine produite par *Burkholderia thailandensis*

2.1. La problématique

Étant phénotypiquement et phylogénétiquement très similaire à *B. pseudomallei* (Brett *et al.*, 1998, Haraga *et al.*, 2008), il n'est pas surprenant de retrouver chez *B. thailandensis* des gènes homologues aux gènes de la biosynthèses et de la régulation de la malléobactine décrits chez *B. pseudomallei* (Figure 5) (Alice *et al.*, 2006). Ceci est un bon indicateur que *B. thailandensis* serait en mesure d'utiliser un système impliquant les sidérophores pour l'acquisition du fer très similaire à celui exprimé par *B. pseudomallei*. De plus, chez *B. thailandensis*, l'identification d'un groupe de gènes (BTH_II1821 à BTH_II1833) ressemblant fortement aux gènes de la biosynthèse de la pyochéline chez *P. aeruginosa* suggère que *B. thailandensis* serait également en mesure de produire de la pyochéline. Malgré ces observations, aucune étude concrète n'avait été menée sur *B. thailandensis* pour confirmer cette hypothèse. De plus, aucune information, au moment de cette étude, n'était encore connue sur la structure de la malléobactine. Cette information est pertinente afin de confirmer si la malléobactine est bel et bien un sidérophore distinct de l'ornibactine.

2.2. Les hypothèses du projet

L'hypothèse du travail était que *B. thailandensis* produit de la pyochéline et de la malléobactine et que cette dernière possède une structure différente de l'ornibactine.

2.3. Les objectifs

Les objectifs du projet étaient de confirmer la production de la pyochéline et de la malléobactine chez *B. thailandensis*, d'identifier les gènes reliés à la biosynthèse et la régulation de la malléobactine et finalement d'élucider la structure de cette dernière. Pour confirmer si un système d'acquisition du fer est fonctionnel chez cette bactérie, la mise en évidence de la production de sidérophores chez *B. thailandensis* E264 a été effectuée sur géloses CAS (Schwyn *et al.*, 1987). Des analyses par CLHP-SM ont permis la détection de la pyochéline et de la malléobactine. Des criblages par mutagenèse aléatoire par transposon ont permis d'identifier des gènes nécessaires à la production de la malléobactine. Des analyses par CLHP-SM, CLHP-SM en tandem et RMN ont été faites afin d'élucider la structure de la malléobactine.

2.4. Méthodologie

2.4.1. Bactéries

Les bactéries étudiées au cours de ce projet étaient la souche E264 de *B. thailandensis* isolée en Thaïlande par l'équipe de Donald Woods (Brett *et al.*, 1998), le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* qui provient d'une mutation par échange allélique non-marqué sur *B. thailandensis* E264 (Chandler *et al.*, 2009), la bactérie *P. aeruginosa*, plus précisément la souche clinique UCBPP-PA14 (PA14) (Rahme *et al.*, 1995) ainsi que la souche LMG1222 de *B. cepacia* (ATCC 25416) qui est la souche référence des BCC (Palleroni *et al.*, 1981). Le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* est un mutant qui ne produit plus d'AHLs. Lors d'une étude antérieure non-publiée, il a été observé que ce mutant surproduit des sidérophores comparé à la souche sauvage (observation faite sur milieu CAS). C'est en effet par cette même observation qu'il a été possible de confirmer que *B. thailandensis* produisait bel et bien des sidérophores. Ce mutant sera entre autre utile lors du criblage pour la détection de mutants sous-producteurs de sidérophores. Toutes les bactéries étaient conservées dans 15% de glycérol à -70˚C, dans des tubes cryogéniques.

2.4.2. Conditions de cultures

Les souches étaient cultivées en pré-culture dans des tubes en verres contenant 3 ml de Tryptic Soy Broth (TSB) (BD – Difco Laboratories). Les tubes étaient incubés à 37°C avec agitation dans un tambour rotatif à 240 tours/minute. Le temps d'incubation se situait entre 18 et 24 heures. Lorsque nécessaire, le milieu était supplémenté d'antibiotique.

Le milieu minéral M9 (MM9) contenant par litre de H_2O (milli-Q) : 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 1 g NH_4Cl, 0,5 g NaCl et 3 mg $CaCl_2$ a été utilisé comme milieu limitant en fer pour favoriser la production de sidérophores. Avant utilisation, le milieu était supplémenté avec 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et 0,2% dextrose comme source de carbone. Pour extraire les ions de fer du MM9 afin de le rendre pauvre en fer, le milieu était traité avec 5 g/L de résine Chelex-100 (Sigma). Le milieu de culture avec résine était mélangé durant 5 heures à température pièce (TP). La résine était ensuite retirée du milieu par décantation suite à la stérilisation de ce dernier par passage sur filtre 0,2 µm. La résine Chelex-100 est une résine échangeuse d'ions utilisée pour extraire les métaux de transition. Il est à noter ici que le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ doit être ajouté après le traitement du milieu MM9 avec la résine puisque le Chelex-100 possède la propriété de complexer également le Mg, diminuant ainsi l'efficacité de la résine à complexer le fer.

L'inoculation du milieu MM9C (MM9 chelexé) se fait avec une suspension bactérienne provenant d'une pré-culture effectuée dans du TSB. Les cellules sont tout d'abord lavées deux fois avec du MM9C puis un aliquote est utilisé pour ensemencer du milieu MM9C afin d'avoir une densité optique à 600 nm (DO_{600}) initiale de 0,05.

Pour promouvoir la production des sidérophores de *B. thailandensis*, le milieu MM9C a été parfois enrichi avec deux acides aminés, 10 mM L-sérine et 10 mM L-ornithine (Sigma). Ce milieu enrichi portera le nom de MM9M. La croissance se fait à 37°C durant une période de 24 à 100 heures d'incubation dépendamment de l'expérience. Lorsque nécessaire, l'antibiotique tétracycline (45 $\mu g \cdot ml^{-1}$) était ajouté aux milieux de culture

2.4.3. Détection des sidérophores

Pour détecter la production de sidérophores par les bactéries, un milieu de culture contenant un colorant, le Chrome Azurol S (CAS), lié à un ion de fer a été utilisé. Lorsque des sidérophores sont produits, ces derniers brisent la liaison du complexe colorant-fer libérant ainsi le colorant. Ceci résulte à un changement de coloration du milieu passant du bleu-vert à une couleur orangé (Schwyn *et al.*, 1987). La préparation du milieu nécessite les préparations et les étapes suivantes :

Solutions mères

MM9 (10x)

- KH_2PO_4 3 g/L
- NaCl 5 g/L
- NH_4CL 10 g/L
- H_2O 1 L

Autoclaver

1mM $FeCl_3 \bullet 6H_2O$ dans 10 mM HCl

- 432 µl de HCl pure dans 500 ml H_2O
- 0,135g de $FeCl_3 \bullet 6H_2O$

100mM $CaCl_2$

- 0,147g dans 10 ml de H_2O

Autoclaver

HDTMA (Sigma)

- 0,365 g dans 200 ml de H_2O

HDTMA-CAS

- Chrome azurol S 0,605 g/L
- H_2O 500 ml/L
- Solution $FeCl_3$ 100 ml/L
- HDTMA (Ajouter lentement) 400 ml/L

Autoclaver

Casamino acide déferré

- 10 g de casamino acide dans 100 ml de H_2O
- Extraire le fer avec du 3,8-hydroxyquinoline dans du chloroforme
  - 3 g dans 100 ml de chloroforme
  - mélanger les 2 solutions de 100 ml
  - mélanger pendant 1 heure

Extraire avec un volume égale de chloroforme. Mélanger 1 heure et faire autoclaver

1M $MgCl_2$

- 2,03 g dans 10 ml de H_2O

Faire autoclaver

Glucose 20%

- 20 g dans 100 ml de H_2O

Faire filtrer

Préparation du milieu CAS

Étape 1 : Solution principale

- H_2O 750 ml/L
- NaOH 6 g/L
- Pipes (Sigma) 30,24 g/L
- Mm9 (10x) 100 ml/L (voir dans les solutions mères)
- agar 15 g/L

Mélanger ces ingrédients et autoclaver, puis refroidir à 50°C

Étape 2 : Ajouter au mélange refroidit

- Casamino acide déferrer 30 ml/L (voir dans les solutions mères)
- Glucose 20% 10 ml/L
- $MgCl_2$ 1M 1 ml/L (voir dans les solutions mères)
- $CaCl_2$ 100mM 1 ml/L (voir dans les solutions mères)
- HDTMA-CAS 100 ml/L (voir dans les solutions mères)

Mélangez et coulez.

À la préparation de ce milieu, nous avons découvert que l'utilisation de l'agar Noble (Difco) était préférable à un agar granulé standard (Difco) L'agar Noble est purifié et est normalement utilisé pour tester des conditions nutritionnelles nécessitant l'absence de contaminants. Dans notre cas, la différence entre les deux types d'agar se voit surtout dans la qualité et le contraste des halos produits par les sidérophores. En effet, l'agar Noble donne un teint vert au milieu comparativement à la couleur bleu-vert normalement observé. De plus, dans un milieu CAS préparé avec de l'agar Noble, la dimension des halos formés autour des colonies est beaucoup plus importante (Figure 8). Ceci permet une meilleure

analyse visuelle, le but visé par cette amélioration dans le protocole. Notons que l'eau utilisée pour faire le milieu est de l'eau milli-Q.

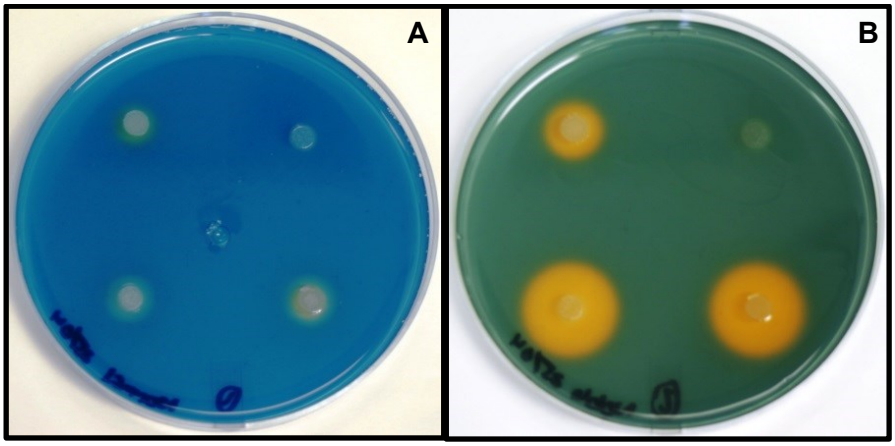


Figure 8. Effet du type d'agar sur l'efficacité de détection des sidérophores sur géloses Chrome Azurol S.

Différence entre un milieu CAS contenant A) de l'agar granulé standard et B) de l'agar noble.

2.4.4. Mutagénèse, criblages

Un criblage a été effectué pour trouver des mutants affectés dans des gènes impliqués dans la production de sidérophores. La méthode utilisée pour les criblages sur les bactéries *B. thailandensis* E264 et le triple mutant Δ*btaI1*Δ*btaI2*Δ*btaI3* est la mutagénèse aléatoire par insertion d'un transposon. La méthode impliquait le transfert du plasmide pIT2 portant le transposon IS*lacZ*/hah (6,16 kpb) par conjugaison avec la bactérie *Escherichia coli* souche χ7213 (Δ*asd*) (Jacobs *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2002). pIT2 est un vecteur suicide non-réplicatif chez *Burkholderia*, alors que *χ7213* est un auxotrophe pour le diaminopimelate (DAP), permettant d'éliminer facilement la souche donneuse. De plus, le transposon ISlacZ/hah contient un gène résistance à la tétracycline, permettant d'effectuer une sélectivité des transposants d'intérêts.

Seules les étapes du criblage sur *B. thailandensis* E264 ont été décrites pour éviter une redondance d'informations puisque les mêmes étapes sont utilisées pour le criblage du triple mutant *E264*Δ*btaI1*Δ*btaI2*Δ*btaI3*.

Tout d'abord, une culture sur la nuit à 37°C avec agitation de *B. thailandensis* E264 et d'*E. coli* χ7213 a été effectué respectivement dans du TSB ou du TSB modifié contenant 150 $\mu g \cdot ml^{-1}$ tétracycline et 62,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ DAP.

Les cultures ont été par la suite diluées dans du TSB à DO_{600} de 0,05 pour croître jusqu'à une DO_{600} de 0,5. Un volume de 100 µl de chaque culture a été mélangé ensemble. Le mélange a été centrifugé à 6 200 x *g* durant trois minutes. Le culot de bactérie a ensuite été resuspendu dans 100 µl NaCl 0,8 %. Des aliquotes de 25 µl ont été déposés sur gélose TSB contenant 62,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ DAP puis incubé à 37°C pour 24h. Les cellules ont finalement été recueillies puis resuspendues dans 15 ml NaCl 0,8 %.

Le criblage a été fait sur des plaques de polystyrène de 20 cm x 20 cm contenant 200 ml de milieu gélosé CAS avec 150 $\mu g \cdot ml^{-1}$ tétracycline pour la sélectivité. Chaque plaque a été incubée à 37°C pour 72 h et contenait environ 500 colonies. Les colonies produisant un halo orangé significativement différent de la souche receveuse ont été recueillies puis transférées dans des plaques de 96 puits contenant du milieu TSB frais. Les plaques de 96 puits ont ensuite été incubées à 37°C pour 24 h. Par après, les mutants candidats ont été déposés sur gélose CAS (plaque de 20 cm x 20 cm) sans tétracycline pour une meilleure évaluation de la formation de halo orangé par rapport aux souches contrôles, soit *B. thailandensis* E264 ou soit le triple mutant *E264*Δ*btaI1*Δ*btaI2*Δ*btaI3.* Les mutants d'intérêts ont ensuite été identifiés puis conservés à -20˚C dans du glycérol 15 %.

2.4.5. Courbes de croissance par BioScreen

La vérification de l'absence d'un défaut de croissance des mutants d'intérêts a été effectuée avec un appareil BioScreen (OY Growth Curves AB, Ltd, Helsinki, Finlande). Cet instrument permet l'incubation, l'agitation et le suivi de la croissance par spectrophotométrie. L'appareil a été programmé pour faire une cinétique de croissance durant 24 heures afin de remarquer les défauts de croissance potentiels de certains mutants. L'inoculation des cultures a été faite dans du TSB à partir de cultures de 16 heures et ajusté à une DO_{600} initiale de 0,05. L'incubation a été faite à 37ºC et les cultures ont été effectuées en triplicata. La croissance cellulaire par densité optique (DO) (mode balayage, 420-580 nm) a été prise à chaque 15 minutes pour toutes les cultures.

2.4.6. Extraction ADN

L'ADN génomique des transposants sélectionnés a été extrait afin de pouvoir procéder à une PCR double ronde semi-aléatoire. Pour ce faire, la technique de l'extraction rapide a été utilisée. À partir d'une pré-culture, 1 ml de culture a été prélevé puis centrifugé à 13 000 x *g* durant 1 minute. Le culot a ensuite été lavé deux fois avec 200 µl de PBS puis a été resuspendu dans 200 µl de PBS et incubé durant 10 minutes à 100˚C. Les tubes ont ensuite

été transférés sur la glace pour 10 minutes, puis centrifugés 10 minutes à 13 000 x *g*. Finalement, le surnageant, contenant l'ADN, a été transféré dans un nouveau tube puis conservé à -20˚C.

2.4.7. PCR semi-aléatoire nichée en deux rondes

Suite à l'extraction de l'ADN des transposants considérés intéressants selon leur phénotype au cours des criblages fait sur *B. thailandensis* E264 ou le triple mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3,* le site d'insertion du transposon était identifié par la méthode PCR double-ronde semi-aléatoire (Jacobs *et al.*, 2003). En résumé, la méthode consistait à faire une « première ronde » de PCR avec l'amorce lacZ-211 spécifique au transposon (Tableau 1). L'amorce est couplée à trois amorces aléatoires (CEKG2A, CEKG2B et CEKG2C). Ceci permet de générer une banque d'amplicons de longueurs différentes ayant comme origine commune l'extrémité du transposon. La « deuxième ronde » de PCR amplifie les produits spécifiques de la « première ronde ». Cette fois-ci, une autre amorce interne (lacZ-148) spécifique au transposon remplace l'amorce lacZ-211. Cette amorce est couplée avec une autre amorce (CEKG4) qui est spécifique aux amorces aléatoires de la « première ronde ». La Figure 9 montre un exemple visuel de la méthode PCR double-ronde semi-arbitraire. Les réactifs et les étapes de réaction pour les amplifications PCR sont présentés au Tableau 2 et 3. Suite à l'amplification, les produits des PCR ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec (Université McGill) ou au Centre de la Biologie moléculaire et génomique fonctionnelle (Institut de la recherche clinique de Montréal) pour le séquençage de l'extrémité 5' du transposon.

Tableau 1. Amorces utilisées lors de cette étude.

Amorce	Séquence (5' à 3')	Réference
lacZ-211	TGCGGGCCTCTTCGCTATTA	(Jacobs *et al.*, 2003)
lacZ-148	GGGTAACGCCAGGGTTTTCC	(Jacobs *et al.*, 2003)
lacZ-124L	CAGTCACGACGTTGTAAAACGACC	(Jacobs *et al.*, 2003)
CEKG2A	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNAGAG	(Jacobs *et al.*, 2003)
CEKG2B	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC	(Jacobs *et al.*, 2003)
CEKG2C	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT	(Jacobs *et al.*, 2003)
CEKG4	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	(Jacobs *et al.*, 2003)

Tableau 2. Réactifs utilisés pour l'amplification PCR, ronde 1 et ronde 2.

A) Ronde 1

Réactif	µl par réactif
R_x Tampon maison 10X	1
dNTPs 10 mM	0.2
lacZ-211 (10 pmol/µL)	0.5
CEKG 2A (10 pmol/µL)	2
CEKG 2B (10 pmol/µL)	1
CEKG 2C (10 pmol/µL)	1
H_2O (mili-Q)	2.3
Taq enz (0.5 U/µL)	1
ADN (matrice purifiée)	1
TOTAL:	10

B) Ronde 2

Réactif	µl par réactif
R_x Tampon maison 10X	5
dNTPs 10 mM	1
lacZ-148 (10 pmol/µL)	2.5
CEKG 4 (10 pmol/µL)	20
H_2O (mili-Q)	9.5
Taq enz (0.5 U/µL)	2
Produit de la ronde 1	10
TOTAL:	50

Tableau 3. Étapes de réaction pour les amplifications PCR, ronde 1 et ronde 2.

A) Ronde

Programme PCR		
# cycles	Température	Temps (min)
1X	95°C	02:00
6X	95°C	00:30
	30°C	00:30
	72°C	01:30
30X	95°C	00:30
	45°C	00:30
	72°C	02:00
1X	72°C	05:00
∞	4°C	∞

B) Ronde 2

Programme PCR		
# cycles	Température	Temps (min)
1X	95°C	01:00
30X	95°C	00:30
	52°C	00:30
	72°C	02:00
1X	72°C	05:00
∞	4°C	∞

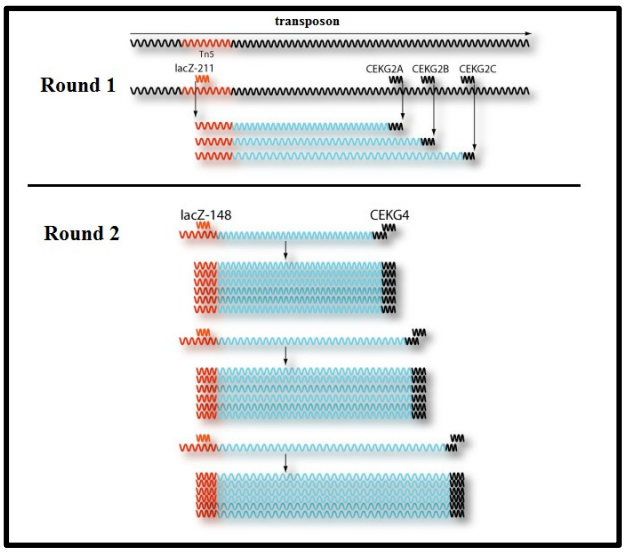


Figure 9. Représentation visuelle de la méthode PCR double-ronde semi-arbitraire.

Image tirée de Tremblay, J. (2007)

2.4.8. Préparation des échantillons pour l'analyse par CLHP-SM

Les sidérophores présents dans les cultures de bactéries ont été détectés et analysés par CLHP-SM. Pour préparer les échantillons pour l'analyse, 1 ml de culture bactérienne était centrifugé à 16 000 x *g* durant 15 minutes à température ambiante (25°C) pour enlever les

cellules. Le surnageant est séparé du culot et les deux phases sont conservées. Un volume de 500 µl du surnageant a été prélevé et transféré dans un vial en borosilicate et le reste du surnageant était conservé pour des futurs tests, si nécessaire. À ce 500 µl de surnageant, une quantité de standards interne, le 4-hydroxy-2-heptyquinoline marqué au deutérium (HHQ-D4) conservé dans du méthanol, a été ajoutée pour une concentration finale de 5 mg/L (Lepine *et al.*, 2003). La quantification des sidérophores a été faite en intégrant l'aire sous la courbe des pics chromatographiques correspondants aux ions pseudomoléculaire (*m/z*) cibles obtenue par CLHP-SM. Cette intégration est par la suite comparée à celle du standard interne et un calcul s'en suit avec la concentration du standard interne.

2.4.9. CLHP-SM

Les analyses par CLHP-SM ont été effectuées sur un module CLHP séparatif Waters Alliance HT *2795* couplée au spectromètre de masse Micromass Quattro Premier XE (Waters Corporation Milford, Massachusetts, USA). Les échantillons ont été injectés dans une colonne Phenomenex Kinetex-C8 2.6µ 4.6 mm X 100 mm à un débit de 400 µl / min. Le programme d'élution passe par un gradient H_2O/acétonitrile contenant 1% d'acide acétique. La phase mobile est initialement composée à 100% H_2O. Un changement linéaire des concentrations entre l'H_2O et l'acétonitrile s'effectue jusqu'à un ratio de 100% acétonitrile à 7 minutes. Cette phase mobile est maintenue à 100% acétonitrile jusqu'à 11 minutes puis le gradient retourne graduellement à 100% H_2O pour le reste du programme, c'est-à-dire un total de 15 minutes. La sortie du CLHP passe par un séparateur en T de type « Valco » avant d'être injectée dans le spectromètre de masse. Les analyses ont été effectuées par électronébulisation en mode négatif ou en mode positif, tout dépendent de l'expérience. Le voltage du capillaire était de 3 kV et le voltage du cône était de 30 V. L'intervalle de masses allant de *m/z* 200 à *m/z* 800 a été programmé pour la détection des sidérophores en mode balayage.

La spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) est effectuée dans les mêmes conditions que le mode balayage. Le voltage variait entre 18 V et 35 V pour la seconde collision. Le standard interne HHQ-D4 est détecté à un *m/z* de 248 en mode positif et à un *m/z* 246 en mode négatif.

2.4.10. Courbe de croissance par dosage de protéines totales

B. thailandensis forme parfois des agrégats cellulaires dans le milieu MM9 rendant ainsi l'évaluation de la croissance cellulaire impossible par mesure de DO_{600}. La croissance

cellulaire était donc évaluée par dosage de protéines totales plutôt que par DO_{600}. Pour ce fait, la méthode de Bradford a été employée.

Tout d'abord, il est nécessaire de préparer une solution de NaOH 0.1 N. Par la suite, une solution réactionnelle de Bradford est préparée. Pour un volume de 100 ml, 80 ml de NaOH 0.1 N est ajouté à 20 ml de réactif de Bradford (Bio-rad). La solution est conservée à 4°C dans un tube de 50 ml enveloppé de papier d'aluminium.

La deuxième étape consiste à préparer les échantillons à analyser. Les culots bactériens conservés à l'étape 2.4.9 sont individuellement resuspendus dans 1 ml de NaOH 0.1 N. Les mélanges sont vortexés puis les échantillons sont incubés à 70°C durant 60 minutes. Après le temps d'incubation, les solutions sont vortexées à nouveau. Pour chaque échantillon, 1 µl est ajouté à 1 ml de la solution réactionnelle de Bradford et le tout est mélangé. Le blanc est préparé avec 1 ml de la solution réactionnelle de Bradford.

L'absorbance est mesurée avec des cuvettes spectrophotométriques à 595 nm et la quantification des protéines totales est calculée par rapporté à une courbe standard préparée avec du *Bovine serum albumin* (BSA).

2.4.11. Extraction des sidérophores

La résine Amberlite XAD-4 (Sigma) a été employée afin d'extraire les sidérophores des surnageants. Cette résine est conservée dans une solution d'eau contenants des sels comme le chlorure de sodium et le carbonate de sodium afin de retarder la croissance bactérienne.

Pour activer la résine, il faut effectuer un lavage et se défaire des sels. La résine est tout d'abord trempée et agitée dans un excès d'eau milli-Q à proportion de 10% p/v durant 30 minutes et est ensuite laissée décanter. L'eau est ensuite retirée puis la résine est transférée dans du méthanol à proportion de 10% p/v durant 30 minutes jusqu'à la décantation. Par la suite, un rinçage rapide au méthanol est répété trois fois. La résine activée est finalement trempée dans une solution d'eau milli-Q à proportion de 50 % p/v avant d'être utilisée.

Une quantité de résine active (10% p/v) est ajoutée au surnageant de la culture bactérienne. La solution résine-surnageant est mélangée durant 16 heures à 4°C. La résine est ensuite récupérée par filtration sur du verre fritté. La résine est lavée dans un volume égal d'eau purifiée. Les molécules absorbées, incluant les sidérophore, sont ensuite éluées de la résine avec un excès de méthanol durant 4 heures. Le méthanol est par la suite recueilli par filtration. La résine est lavée trois fois avec du méthanol. Tous les volumes de méthanol sont recueillis et combinés. Le méthanol est ensuite évaporé au Rotovap (pompe à vide). Le

ballon contenant le résidu est pesé afin d'évaluer la quantité recueillie en mg. Un volume d'H_2O est ensuite ajouté au ballon. La solution est ensuite filtrée sur une membrane de PTFE 0.2 µm pour enlever les particules résiduelles restantes. La solution extraite est à nouveau concentrée à sec au Rotovap. Le ballon est encore une fois pesé pour évaluer la quantité recueillie en mg. Un dernier volume d'H_2O est ajouté au ballon afin d'avoir une concentration finale du matériel extrait (sidérophores) de 100 mg/ml.

2.4.12. CLHP Préparatif

La mixture de sidérophores produite par *B. thailandensis* a été séparée par CLHP préparatif. Le module utilisé est le Waters Delta Prep 4000 couplé au détecteur Waters 486 (Waters Corporation Milford, Massachusetts, USA). La séparation des congénères de la malléobactine s'est effectuée en phase inverse sur une colonne Phenomenex Curosil-PFP 5µ 250 mm x 10.00 mm à un débit de 4 ml/min. Le programme d'élution passe par un gradient H_2O/acétonitrile. La phase mobile est initialement composée à 95 % H_2O. Un changement linéaire des concentrations entre l'H_2O et l'acétonitrile s'effectue jusqu'à un ratio de 100% acétonitrile à 22 minutes. Cette phase mobile est maintenue à 100% acétonitrile jusqu'à 28 minutes puis le gradient retourne graduellement à 95 % H_2O pour le reste du programme, c'est-à-dire un total de 35 minutes. La détection se fait à une longueur d'onde de 220 nm.

2.5. Résultats

2.5.1. Détection des sidérophores

Suite à 24 heures d'incubation à 37°C, *B. thailandensis* E264 et le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* démontrent tous les deux une production de sidérophores sur géloses CAS (Figure 10). Le triple mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* présente toutefois une formation de halo nettement plus importante que la souche sauvage, ce qui indique une production supérieure de sidérophores. Notons cependant que cela ne nous informe pas sur la nature du ou des sidérophore(s) produit(s).

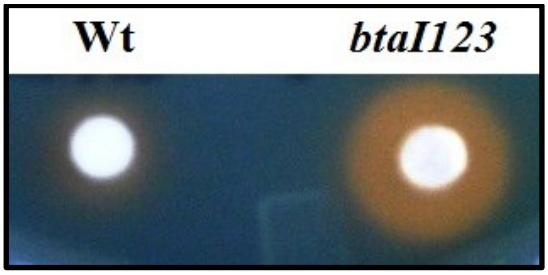


Figure 10. Production de sidérophores sur gélose CAS.

WT) La souche sauvage *B. thailandensis* E264 et *btal123*) le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* ont été ensemencés en déposant une goutte de 5 µl de culture sur la surface, puis la gélose ensemencée a été incubée pendant 24h à 37°C.

2.5.2. Détection de la pyochéline

L'analyse du génome de la souche E264 montre la présence de gènes codant pour les enzymes impliqués dans la synthèse de la pyochéline (voir section 1.7). Pour confirmer que *B. thailandensis* produit bel et bien de la pyochéline, une analyse par CLHP-SM a été effectuée à partir du surnageant de cette bactérie. Une culture de 72 heures dans un milieu MM9C a été utilisée pour l'analyse. L'expérience s'est faite par électronébulisation négative en mode balayage. Cette première expérience ne fut pas très concluante puisqu'aucun ion pseudomoléculaire de la pyochéline, *m/z* 323, n'a pu être identifié sur le chromatogramme. L'hypothèse d'un manque de sensibilité dans la détection de la molécule dans ces conditions expérimentales a donc été émise. Une autre stratégie, celle d'effectuer une spectrométrie de masse en tandem (CLHP-SM/SM) en mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), a donc été envisagée. Cette méthode permettra premièrement d'abaisser significativement les limites de détection en minimisant le bruit de fond et deuxième d'effectuer une quantification de la

pyochéline. Pour se faire, il était question de trouver tout d'abord les ions « filles » de l'ion « précurseur » de la pyochéline. Sachant que *B. cepacia* et *P. aeruginosa* produisent ce sidérophore, nous avons tout d'abord évalué la production de la pyochéline chez ces deux bactéries (Figure 11).

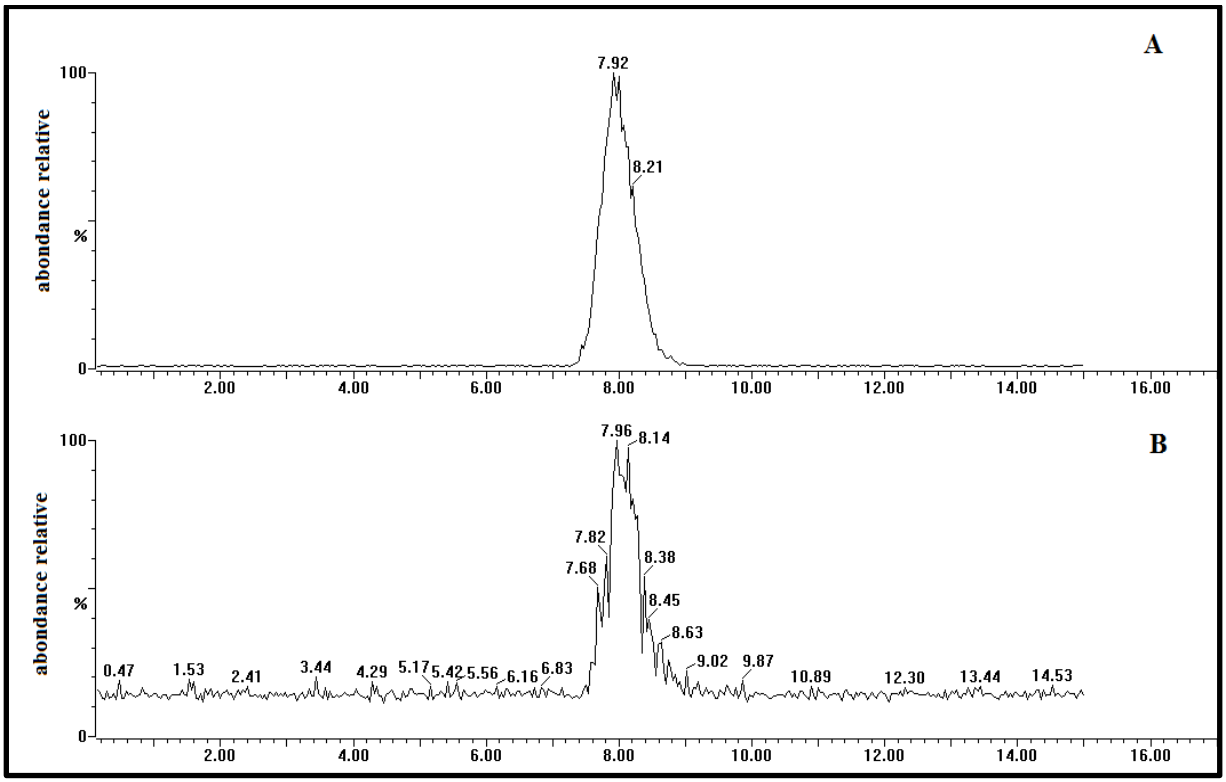


Figure 11. Détection par CLHP-SM de la pyochéline dans des cultures de bactéries.

(A) chez *B. cepacia* ATCC 25416 et chez (B) *P. aeruginosa* PA14. L'analyse a été faite par électronébulisation négative en mode balayage. Le temps de rétention de la pyochéline est d'environ 8 minute dans ces conditions et l'ion pseudomoléculaire suivi est *m/z* 323 puisque la pyochéline possède une masse de 324 Da. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu MM9C à 37°C durant 24h. Aucune extraction de sidérophores n'a été effectuée. Le surnageant a été directement injecté.

La détection de la pyochéline dans les deux cultures bactériennes confirme la validité de notre méthode. Afin de déterminer les ions filles, une fragmentation de l'ion précurseur de la pyochéline a été effectuée pour les deux échantillons. Aux Figures 12 et 13, on remarque que les ions précurseurs fragmentés présentes des patrons identiques de spectre de masses confirmant ainsi que les deux bactéries produisent des pyochélines identiques. Les ions « filles » les plus abondants sont les suivants : *m/z* 118, *m/z* 178, *m/z* 189, *m/z* 222 et *m/z* 245.

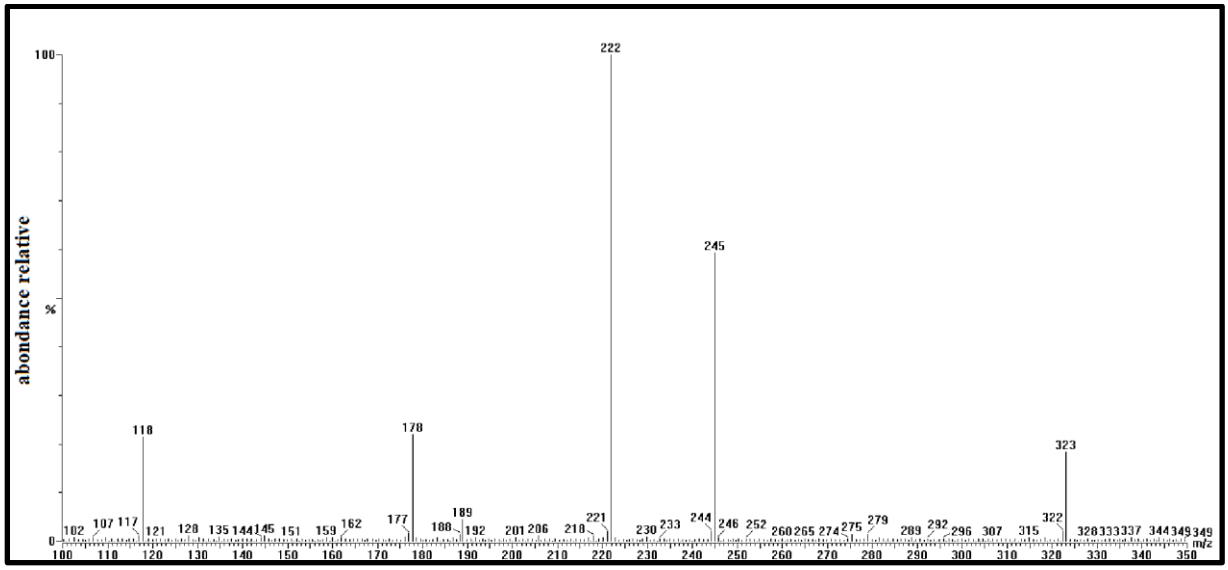


Figure 12. Fragmentogramme de l'ion pseudomoléculaire *m/z* 323 chez *B. cepacia* ATCC 25416.

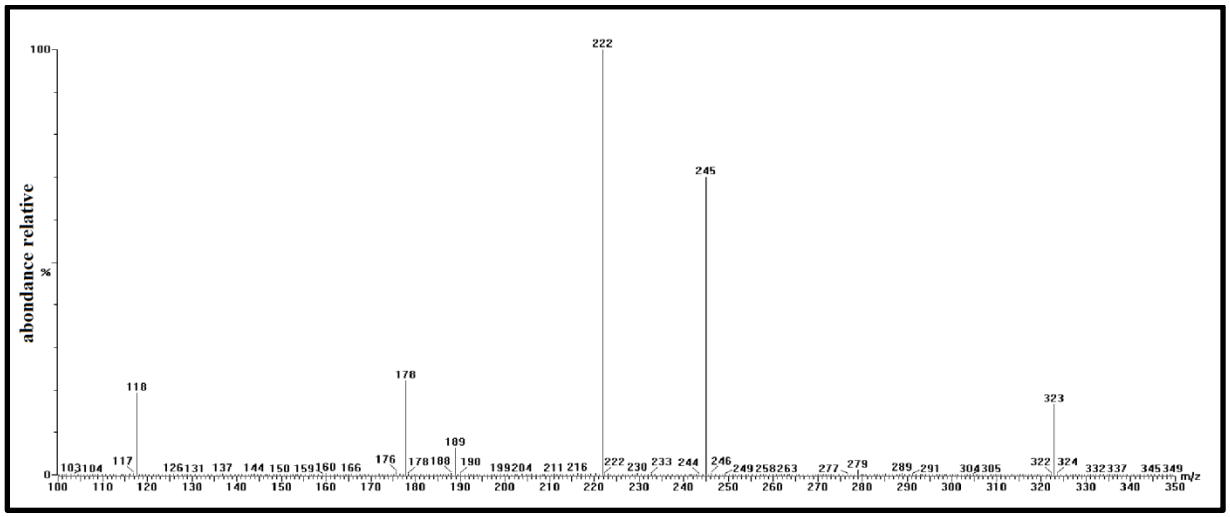


Figure 13. Fragmentogramme de l'ion pseudomoléculaire *m/z* 323 chez *P. aeruginosa* PA14.

Suite à ces résultats, l'ion fille *m/z* 222 est considéré le plus abondant. Cet ion sera donc choisi pour faire un suivi MRM de la transition de l'ion précurseur vers l'ion fille, c.-à-d. *m/z* 323 > *m/z* 222.

La quantification de la pyochéline dans chaque souche bactérienne a été calculée par rapport au standard interne qui est le HHQ-D4. Ce standard interne a été ajouté au surnageant de chaque échantillon à une concentration de 5 mg/L. La molécule HHQ-D4 possède quatre hydrogènes qui ont été remplacés par des ions deutérium (D) afin d'avoir une molécule synthétique comme standard de quantification. La quantification est donc arbitraire car non ajustée versus un standard de pyochéline pure.

Tel que présenté dans la Figure 14 et le Tableau 4, nous avons été en mesure de quantifier la production de la pyochéline chez *B. cepacia* ATCC 25416, *P. aeruginosa* PA14, le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* ainsi que *B. thailandensis* E264. Avec les résultats obtenus, il est possible de conclure que *B. thailandensis* possède bien la capacité de produire de la pyochéline mais que ce dernier n'est pas produit par la souche sauvage dans nos conditions expérimentales. Cependant, un mutant surproducteur de sidérophores, tel que montré par le résultat sur gélose CAS (Figure 10), nous permet de bien voir la production. Notons aussi que *B. cepacia* est un grand producteur en comparaison avec *P. aeruginosa*.

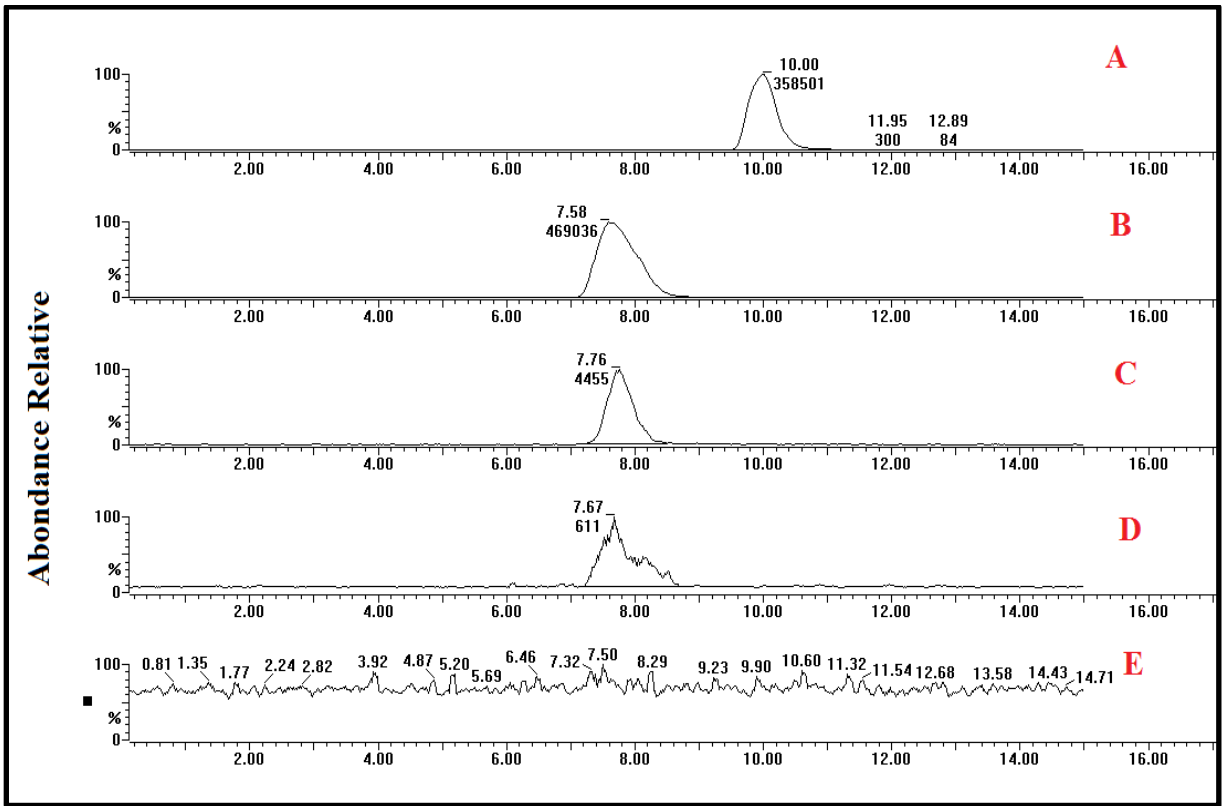


Figure 14. Chromatographie de MRM de la transition de l'ion précurseur *m/z* 323 vers l'ion fille *m/z* 222 pour la détection de la pyochéline.

A) Standard interne HHQ-D4, Détection de la pyochéline chez B) *B. cepacia* ATCC 25416, C) *P. aeruginosa* PA14, D) mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3 et E*) *B. thailandensis* E264.

Tableau 4. Quantification de la pyochéline chez les bactéries d'intérêts

Identification de la Figure 12	Standard interne et bactéries	Quantité relative de pyochéline produit[1]
A	HHQ-D4	5 mg/L
B	*B. cepacia* ATCC 25416	6,5 mg/L
C	*P. aeruginosa* PA14	63 µg/L
D	mutant *E264 Δbtal1 Δbtal2 Δbtal3*	9 µg/L
E	*B. thailandensis E264*	Aucune détection significative

Quantité relativement calculée par rapport au standard interne HHQ-D4 dont la concentration injecté est de 5 mg/L. Résultat d'une seule injection, d'une seule culture. Les bactéries ont été cultivées dans du milieu MM9C à 37°C durant 24h. Aucune extraction de sidérophores n'a été effectuée. Le surnageant a été directement injecté.

2.5.3. Criblage

Afin d'identifier des gènes impliqués dans la production de sidérophores chez *B. thailandensis*, nous avons effectué un criblage par mutagénèse aléatoire sur la souche sauvage E264 ainsi que sur le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*. La bactérie *E. coli* χ7213 portant le transposon IS*lacZ*/hah sur le plasmide pIT2 a été utilisée comme souche donneuse. Le but de ces criblages était de trouver des gènes de la biosynthèse et de la régulation de la malléobactine. Le motif d'effectuer deux criblages a été initié par le fait qu'il est techniquement difficile de visualiser les mutants produisant moins de sidérophores que la souche sauvage *B. thailandensis*, car elle ne produit pas un très grand halo sur gélose CAS (Figure 10). D'autre part, nos travaux préliminaires avaient révélé que le triple mutant des gènes *btal*, ne produisant donc aucune AHL, est un surproducteur de sidérophores. Ce dernier a donc été utilisé comme souche receveuse pour identifier des mutants produisant moins de sidérophores.

La Figure 15 montre un exemple de plaque de gélose CAS produite pour le criblage sur la souche E264. Approximativement 29 650 colonies ont été analysées par Myriam Burns, une stagiaire d'été.

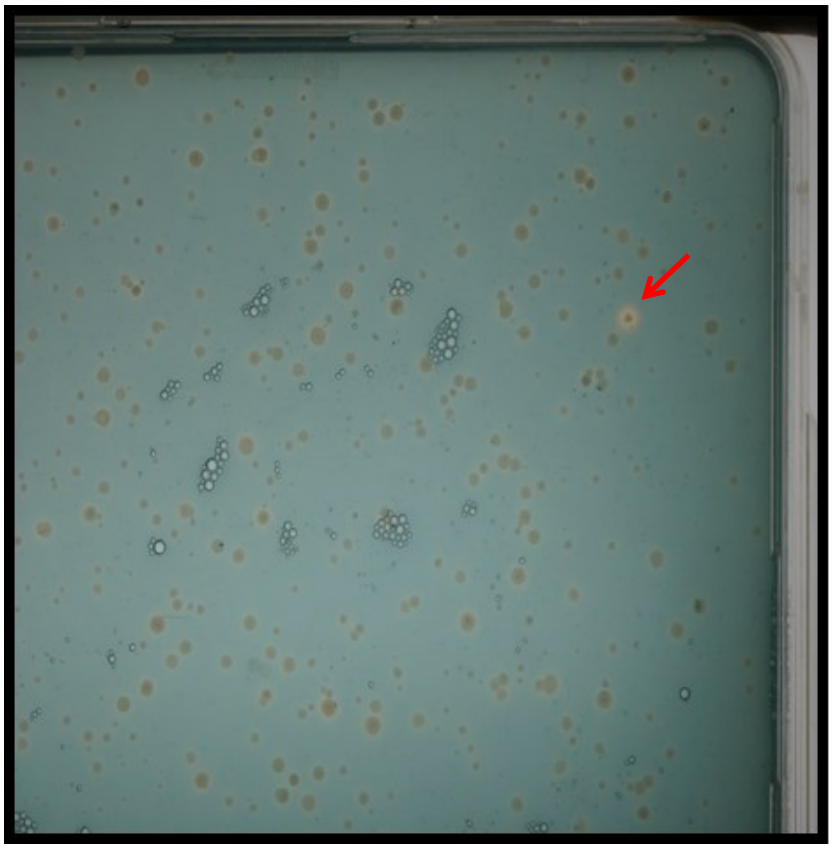


Figure 15. Exemple d'une plaque de criblage effectué sur *B. thailandensis* E264.

Les transposants sont étalés sur des géloses CAS contenant l'antibiotique tétracycline à une dilution permettant d'observer des colonies bien définies. Après 72h d'incubation à 37°C, le diamètre du halo autour des colonies est noté. La flèche rouge indique une colonie surproductrice. (photo : Myriam Burns)

À la Figure 16, il est possible de voir un exemple de colonie formée par un transposant sous-producteur obtenue lors d'un criblage avec le mutant surproducteur comme souche receveuse. Approximativement 31 000 transposants ont été analysés durant ce deuxième criblage pour un total d'environ 60 000 colonies analysées. La taille du génome de *B. thailandensis* E264 est d'environ 6.72 Mb codant près de 5713 gènes prédits. Le nombre de mutants criblés est considéré suffisant pour l'identification des gènes de biosynthèses de la malléobactine.

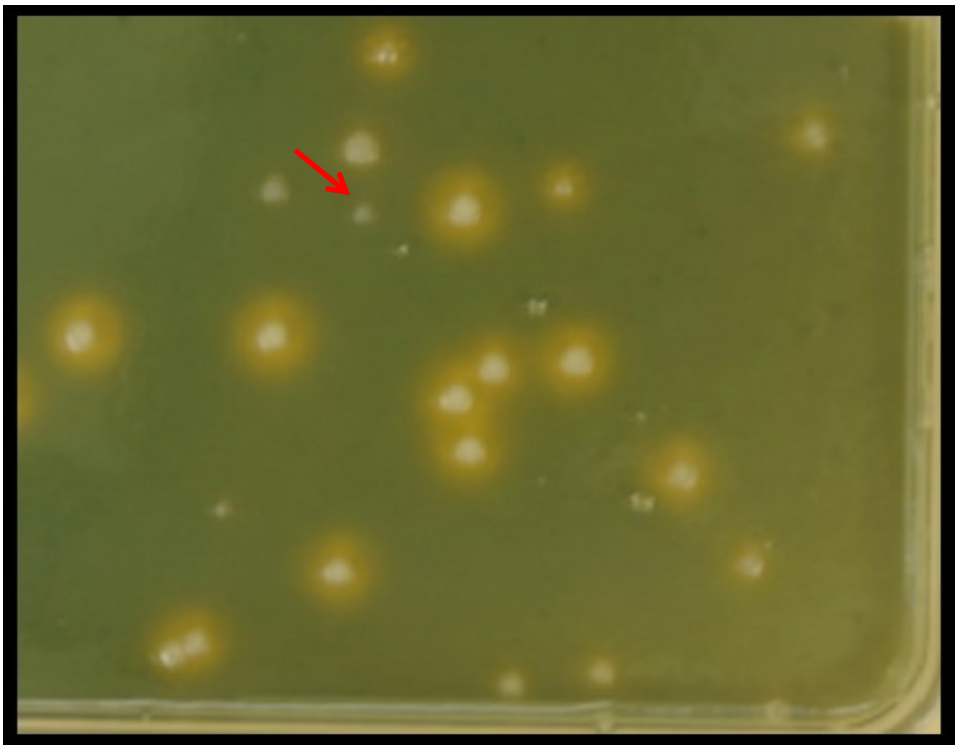


Figure 16. Exemple d'une plaque de criblage effectué sur le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*.

Les transposants sont étalés sur des géloses CAS contenant l'antibiotique tétracycline à une dilution permettant d'observer des colonies bien définies. Après 72h d'incubation à 37°C, le diamètre du halo autour des colonies est noté. La flèche rouge indique une colonie sous-productrice.

En se basant sur la formation de leur halo, près de 6000 candidats ont été présélectionnés et répliqués sur une nouvelle gélose CAS. La Figure 17 présente un exemple de confirmation de transposants sur géloses CAS en comparaison avec les souches receveuses *B. thailandensis* E264 et le triple mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3.*

Suite à cette confirmation, 204 transposants ont été considéré des surproducteurs et 164 ont été confirmé comme sous-producteurs.

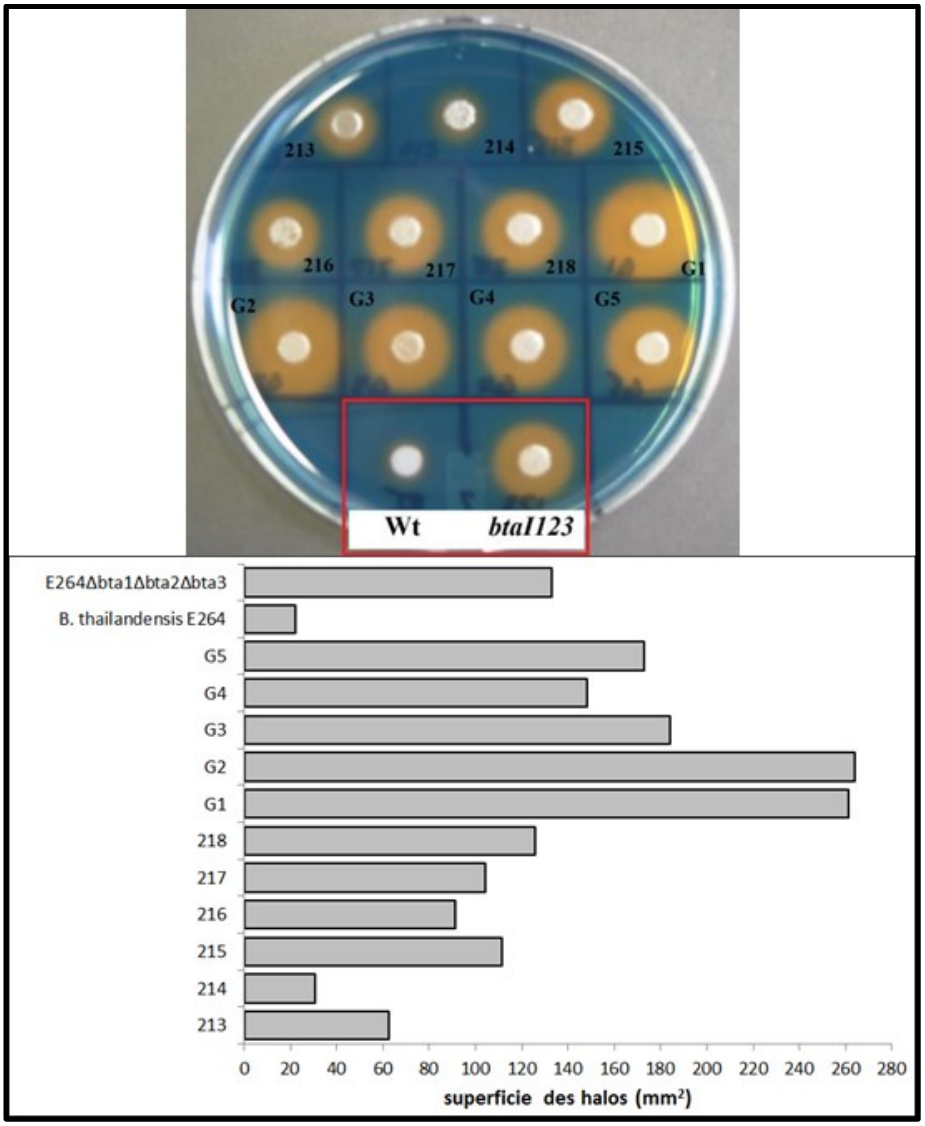


Figure 17. Sélection de transposants d'intérêts sur gélose CAS.

Les mutants sont comparés aux témoins selon la mesure de leur halo. (Wt, *B. thailandensis* E264 souche sauvage ; *btaI123*, mutant *E264Δbta1Δbta2Δbta3*). Tous les mutants de cette figure proviennent du criblage effectué sur le triple mutant *E264Δbta1Δbta2Δbta3.*La mesure des halos n'est qu'à titre indicatif, elle n'a pas été effectuée en triplicata. Il était question ici de faire une présélection (visuelle) arbitraire des mutants d'intérêts comme les mutants 214 et 213 qui présentent une bonne diminution de la production de sidérophore (une production presque égale à la souche sauvage) comparé au triple mutant *E264Δbta1Δbta2Δbta3.*

La Figure 18 montre un exemple de courbes de croissance des mutants choisis suite à l'évaluation de leur halo sur gélose CAS en comparaison avec les témoins. Seuls les mutants ne montrant ni défaut ou retard de croissance ont été sélectionnés pour être séquencés. On compte approximativement 15 mutants montrant un retard de croissance par rapport à la souche sauvage. Le tableau 5 montre la liste des mutants pour lesquels le site d'insertion du transposon a été déterminé.

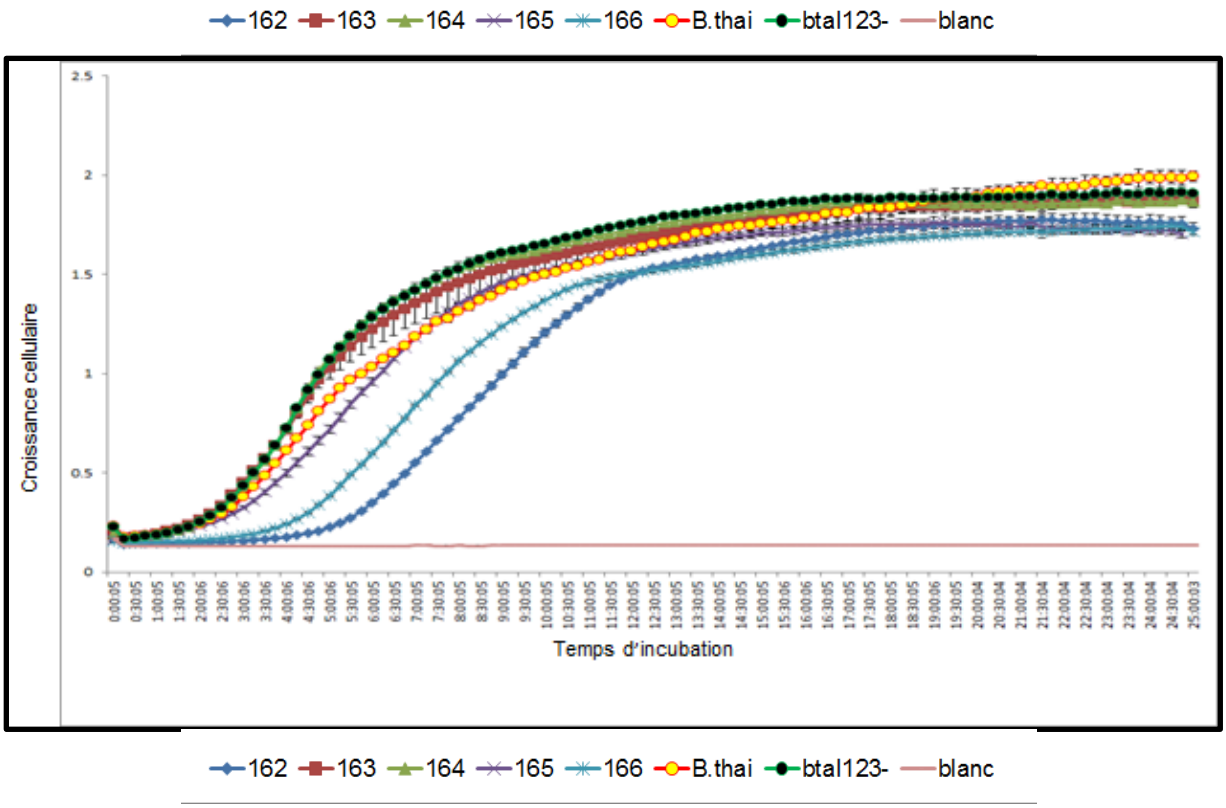


Figure 18. Courbes de croissance de mutants obtenus par criblage différentiel phénotypique sur milieu gélosé CAS.

Les cultures témoins sont la souche sauvage E264 et le triple mutant *E264Δbta1Δbta2Δbta3*. Du TSB non-ensemencé a été utilisé comme témoin négatif (blanc). Les souches (en triplicata) ont été cultivées dans du TSB liquide. Les prélèvements de densité optique (balayage 420-580 nm) pour les courbes de croissance ont été effectués par Bioscreen (Growth Curves AB) sur une période de 24h d'incubation à 37°C.

Tableau 5. Résultats des criblages effectués sur *B. thailandensis* E264 souche sauvage et le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*

Mutants[1]	Chromosome	Gènes (redondance) / nom	Position du transposon (pb à partir du début du gène)[2]	Brin[3]	Position du gène dans l'opéron	Production de Sidérophores[4] (sous-production : - surproduction : +) VS la souche receveuse	Fonction du gène[5]
1		2670521 - 2670793	51			-	Région intergénique (entre BTH_II2171 et BTH_II2172)
m64	1	BTH_I2534	270	-	1/2	+	Régulateur de réponse contenant un domaine de récepteur de type CheY, ATPase de type AAA, domaines de liaison à l'ADN
m34	1	BTH_I2751	24	+	1/2	+	GalM, enzyme Galactose mutarotase et autres enzymes reliées
104	1	1242806 - 1242992	64	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_I1099 et BTH_I1100)
88	1	2936270 - 2936689	127	N/A	N/A	-	Région intergénique (entre BTH_I2569 et BTH_I2570)
141	1	BTH_I0658 / rfaF	636	-	N/A	-	Processus relié à la biosynthèse de la lipopolysaccharide
54	1	3571672 - 3573270	815	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_I3133 et BTH_I3134)
m56	2	1101623 - 1102704	436	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_II0937 et BTH_II0936)
m43	1	1580151 - 1581042	10	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_I1403 et BTH_I1404)
108	1	BTH_I0007	1058	+	1/3	+	Voie de sécrétion de Type II, composant PulD
42	1	BTH_I0116 (4)	1744	+	2/2	-	bactériophage phiC31, protéine de résistance pglZ
131	1	BTH_I0188	312	+	2/5	+	Épimérase L-alanine-DL-glutamate et enzymes reliés à la superfamille des

							énolases
193	1	BTH_I0250	478	+	1/3	-	Protéine FlgK associée au flagelle
190	1	BTH_I0432	574	+	1/5	-	Protéine hypothétique
G3	1	BTH_I0640 (2)	1026	-	N/A	+	Transporteur de type « major facilitator family »
m53	1	BTH_I0727	730	-	N/A	+	Synthétases acyl-CoA réductase (formation AMP) / ligases AMP-acide II
90	1	BTH_I0738	402	-	N/A	+	3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
103	1	BTH_I0781	273	-	N/A	+	Protéine de réparation d'ADN (RadC)
133	1	BTH_I1094	394	-	N/A	+	Régulateur de réponse contenant un domaine de récepteur CheY et un domaine de liaison à l'ADN HTH
13	1	BTH_I1099 (4)	2522	+	N/A	+	23S ribosomal ARN
104	1	BTH_I1101	-123	+	1/2	+	Transposase et dérivés inactivés
214	1	BTH_I1195	1698	+	N/A	-	transketolase
99	1	BTH_I1268	518	-	3/4	+	Paraquat inductible protéine B
m5	1	BTH_I1403 (7) / *hmqR*	179	-	1/3	+	Régulateur transcriptionnel de type LysR
G5	1	BTH_I1457	-295	+	1/2	+	Co-chaperon GroES (HSP10)
14	1	BTH_I1531	159	-	N/A	+	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase
130	1	BTH_I1615 (2)	16	-	1/2	+	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransférase sous-unité A et autres amidases reliées
208	1	BTH_I1658	666	+	N/A	-	Protéine du domaine radical SAM
110	1	BTH_I1756	1411	-	N/A	+	Système de transport multidrogue de type ABC, ATPase et composants perméase
m47	1	BTH_I1878	68	+	2/2	+	Domaine DnaJ- contenant protéines 1 (co-chaperon HscB; Provisoir)
109	1	BTH_I1882	114	-	N/A	+	Lipoprotéine membrane externe

70	1	BTH_I1951	1031	-	1/3	+	RND – efflux multidrogue-protéine membranaire MexE
151	1	BTH_I2059	0	-	N/A	+	transporteur
147	1	BTH_I2127	330	+	2/2	+	Homologue de la sous-unité gamma-décarboxylase carboxymuconolactone
46	1	BTH_I2417 (2) / *mbaJ*	4	-	2/4	-	Modules peptide synthétase non-ribosomique et protéines apparentées
40	1	BTH_I2418 / *mbaI*	7733	-	1/4	-	Modules peptide synthétase non-ribosomique et protéines apparentées
m8	1	BTH_I2423 / *mbaD*	1898	-	3/3	+	Sous-unité de transporteur perméase d'un complexe fer-hydroxamate
m9	1	BTH_I2424 / *mbaC*	737	-	4/4	+	Systèmes de transport de type ABC cobalamine/Fe3 +-sidérophores, composants ATPase
152	1	BTH_I2427 / *mbsS*	-14	-	1/4	-	Facteur sigma-70, fonction extracytoplasmique
198	1	BTH_I2503	-72	-	N/A	-	Protéine hypothétique
62	1	BTH_I2519	1901	-	N/A	-	Exoribonucléase R
180	1	BTH_I2535(4)	1772	-	9/9	-	helicase/secretion, protéine de type TadE
m29	1	BTH_I2537	264	-	7/9	+	Flp protéine d'assemblage de pili TadD, contient des répétions TPR
m20	1	BTH_I2539 (4)	545	-	5/9	+	Flp protéine d'assemblage de pili TadB
m45	1	BTH_I2554 / *lpdA-1*	114	-	2/2	+	Complexe Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogénase, composante dihydrolipoamide dehydrogénase (E3), et enzymes reliées
7	1	BTH_I2569	90	-	N/A	+	Régulateur transcriptionnel de type LysR
105	1	BTH_I2705	2196	-	1/5	+	Élément Rhs, protéine Vgr
216	1	BTH_I2716	317	-	N/A	-	Régulateur transcriptionnel de type LysR
m35	1	BTH_I2954	2483	+	2/3	+	protéine du système de sécrétion Type

							VI, composante VasK
m70	1	BTH_I3014	4832	-	1/2	+	Glutamate synthase (GltS), amidotransférases de glutamine classe II (Gn-AT)
141	1	BTH_I3127	-266	+	N/A	-	Protéine hypothétique
54	1	BTH_I3134	-784	+	N/A	+	Prediction d'un régulateur transcriptionnel avec un domaine CBS en C-terminal
22	1	BTH_I3136 (2)	1725	+	N/A	+	Transporteur de type ABC, sous-unité de liaison d'ATP, système alcool déshydrogénase PQQ-dépendante
33	1	BTH_I3208	160	-	N/A	+	Protéine hypothétique
58	1	BTH_I3221	48	-	N/A	+	Protéine de type AraC, domaine de liaison à l'ADN
m58	1	3679320 - 3682589	1502	N/A	N/A	+	Région intergénique (entreBTH_I3230 et BTH_I3231)
149	2	BTH_II0035	227	-	N/A	+	Régulateur transcriptionnel Crp/FNR
m10	2	BTH_II0164 / *flhB*	186	-	6/7	+	Voie de biosynthèse des flagelles, composante FlhB
m19	2	BTH_II0169	868	-	1/7	+	Protéine flagellaire FliM
89	2	BTH_II0186	432	+	3/3	+	Protéine flagellaire (flgD)
92	2	BTH_II0295	132	-	2/2	-	Transporteur pour la résistance aux médicaments de la famille EmrB/QacA : perméase efflux Arabinose
m69	2	BTH_II0480	1802	+	2/4	+	Cytochrome oxydase d'ubiquinol o, sous-unité I
m42	2	591314 - 592175	818	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_II0499 et BTH_II0500)
199	2	BTH_II0715	-163	-	N/A	-	Predicttion d'une acyltransférases
m55	2	944125 - 944778	223	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_II0805 et BTH_II0806)
31	2	BTH_II0937 (2)	1099	+	N/A	+	Protéine hypothétique

210	2	BTH_II1515	104	+	N/A	+	Prédiction d'un transducteur de signal : protéine contenant le domaine CBS et une liaison cAMP
m67	2	BTH_II1576 / *hmqL*	-65	+	N/A	+	Activité oxidoréductase, jouant le rôle d'un donneur singulier en incorporant une molécule d'oxygène
m26	2	BTH_II1929 (2) / *hmqG*	723	-	N/A	+	Protéine hypothétique
m32	2	BTH_II1933 / *hmqC*	410	-	3/7	+	3-oxoacyl-(protéine de type acyl-transporteur) synthase III (processus de biosynthèse des HMAQ)
m27	2	BTH_II2024 (2)	38	+	1/3	+	Protéine périplasmique TonB, relie la membrane interne et externe
m6	2	BTH_II2032	1047	-	4/4	+	Polyferredoxin
55	2	BTH_II2070	422	+	1/2	-	Protéine de la famille des aldehyde dehydrogénase
2	2	BTH_II2072	1083	+	1/2	-	Transporteur de type « major facilitator family »: Arabinose efflux perméase
m17	2	BTH_II2188	-1	-	2/4	+	methylcitrate synthase
m1	2	BTH_II2189 / *prpB*	760	-	1/4	+	Actvité methylisocitrate lyase (PEP phosphonomutase et enzymes reliées)
188	2	BTH_II2341	316	-	N/A	-	Protéine hypothétique
34	2	BTH_II2342	848	-	7/7	+	Protéine hypothétique
m23	1	BTH_I3190 (2)	120	+	N/A	+	Perméase reliée à l'assimilation du Glycerol (Major Intrinsic Protein Family)
m61	1	BTH_I1878 / *hscB*	63	+	1/2	+	Protéine servant à l'assemblage du Fe-S (co-chaperon HscB)
m33	2	1846389 - 1846961	558	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_II1575 et BTH_II1576)
m4	1	2163997 - 2164929	599	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_I1915 et BTH_I1916)
m13	2	1846389 - 1846961	470	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_II1575 et BTH_II1576)

m28	1	1102582 - 1102694	20	N/A	N/A	+	Région intergénique (entre BTH_I1915 et BTH_I1916)
G1	1	BTH_I2422 (3) / *mbaF*	688	-	2/3	+	Protéine réducatase (FhuF) du complexe sidérophore-Fer

1. L'identification numérique précédée d'un « m » représente les mutants trouvés chez la bactérie *B .thailandensis* E264 souche sauvage. Les autres ont été générés dans le mutant surproducteur
2. Le signe (-) signifie que la position du transposon débute avant le gène
3. Le signe + ou – fait référence au brin codant identifié par BLAST (http://www.burkholderia.com)
4. La production de sidérophores est basée sur la mesure du halo des mutants sure Pétri CAS comparé à leur contrôle référent (*B. thailandensis* souche sauvage ou mutant *E264Δbta1Δbta2Δbta3*)
5. Les fonctions prédites des gènes sont listés sur le site web *Burkholderia* (http://www.burkholderia.com

Le criblage nous a donné des résultats très intéressants. Notamment, il a été possible d'identifier, chez *B. thailandensis*, quelques gènes de la biosynthèse et de la régulation de la malléobactine tels que décrit dans l'article d'Alice *et al.* 2006, ce qui valide l'approche expérimentale choisie.

Par homologie avec les gènes de la biosynthèse et de la régulation de l'ornibactine chez *B. cenocepacia*, une interruption des gènes *mbaI*, *mbaJ* et *mbaS* (gènes directement reliés à la biosynthèse de la malléobactine) devrait résulter en une diminution dans la production du sidérophore. Cette hypothèse est confirmée avec nos résultats du criblage. À l'opposée, une interruption des gènes *mbaD*, *mbaC* et *mbaF* (gènes reliés à la régulation de la malléobactine) devrait augmenter la production du sidérophore. Encore une fois, cette observation est confirmée dans les résultats du criblage. Notons ici que les noms donnés aux gènes de la malléobactine proviennent de l'article Alice *et al.* 2006 (Tableau 6).

Tableau 6. Récapitulatif des gènes préalablement connus pour être reliés à la malléobactine, obtenus lors des criblages.

Homologues chez *B. cenocepacia*	Gènes mutés chez *B. thailandensis*	Production de sidérophores par rapport à la souche sauvage E264	Fonction
BCAL1697 / *orbJ*	BTH_I2417 / *mbaJ*	-	Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins
BCAL1696 / *orbI*	BTH_I2418 / *mbaI*	-	Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins
BCAL1692 / *orbD*	BTH_I2423 / *mbaD*	+	iron-hydroxamate transporter permease subunit
BCAL1691 / *orbC*	BTH_I2424 / *mbaC*	+	ABC-type cobalamin/Fe3+-sidérophores transport systems, ATPase components
BCAl1688 / *orbS*	BTH_I2427 / *mbaS*	-	extracytoplasmic-function sigma-70 factor
BCAL1693 / *orbF*	BTH_I2422 / *mbaF*	+	sidérophore-iron reductase FhuF

L'identification de mutants dans les gènes *mbaS* et *mbaF* se révèle très utile pour la continuation du projet. En effet, comme le montre la Figure 19, le mutant *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3ΔmbaS* (renommé *AhlΔmbaS*) et le mutant *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3ΔmbaF* (renommé *AhlΔmbaF*) démontrent une variation très marquée dans la production de sidérophores. En effet, *AhlΔmbaS* ne produit presque

pas de halo comparé à la souche sauvage tandis que *AhlΔmbaF* produit un halo similaire au surproducteur *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3* c'est-à-dire une surproduction par rapport à la souche sauvage. Ce résultat est très pertinent puisque la presque absence de halo autour du mutant *AhlΔmbaS* montre que la malléobactine serait très probablement le sidérophores principalement produit chez *B. thailandensis*. Ces deux mutants seront utilisés ultérieurement pour étudier d'avantage la caractérisation de la malléobactine chez *B. thailandensis.*

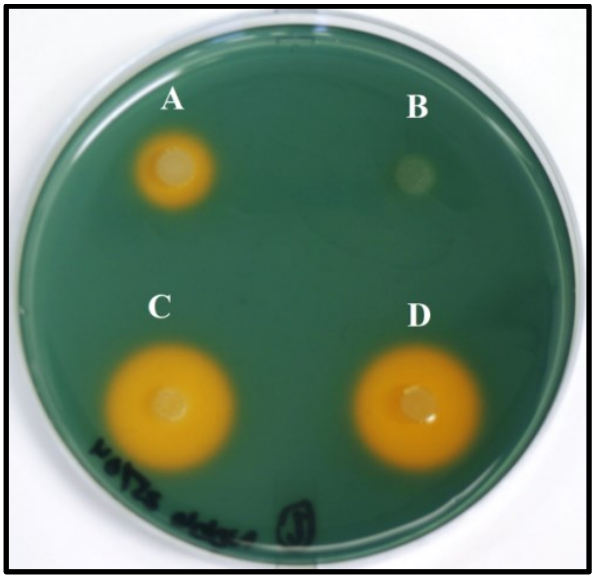


Figure 19. Production de sidérophores sur géloses CAS par des mutants.

A) *B. thailandensis* souche sauvage B) mutant *AhlΔmbaS* C) mutant E264Δ*btaI1*Δ*btaI2*Δ*btaI3* et D) mutant *AhlΔmbaF* Les bactéries ont été ensemencées en déposant une goutte de 5 µl de culture sur la surface, puis la gélose ensemencée a été incubée pendant 24h à 37°C.

2.5.4. Caractérisation de la malléobactine

2.5.4.1. Identification des composés de la malléobactine

Selon la littérature, nous savons que la malléobactine est un sidérophore de la famille des hydroxamates similaire à l'ornibactine (Agnoli *et al.*, 2006, Majerczyk *et al.*, 2014, H. M. Yang *et al.*, 1991). Nous savons également que la malléobactine serait en fait un groupe de molécules avec des masses moléculaires de 790 Da, 762 Da et 636 Da. L'article d'Alice *et al.* 2006 suggère que les deux composés de masses 790 et 762 Da identifiés comme étant la malléobactine seraient en fait de l'ornibactine, plus précisément de l'ornibactine-C8 et de l'ornibactine-C6

respectivement. Il n'est pas précisé dans l'article s'il est question des formes apo ou ferri (sans ou avec ion de fer) mais ces masses suggéreraient plutôt des formes ferri-ornibactine (H. Stephan *et al.*, 1993a) .

Comme mentionnée plus tôt, trois composés, dont les masses sont 790, 762 et 636 Da ont été identifiés comme étant de la ferri-malléobactine (Alice *et al.*, 2006). Nous avons investigué les surnageants, par CLHP-SM, de *B. thailandensis* E264, *AhlΔmbaS et AhlΔmbaF* afin d'identifier la présence de ces trois composés.

Curieusement, seules les molécules de masses 790 et 762 Da étaient visibles en mode négatif tandis que la molécule de 636 Da était seulement visible en mode positif. De plus, les deux molécules de 790 et 762 Da possèdent des temps de rétention supérieurs au standard interne HHQ-D4 tandis que la molécule de 636 Da possède un temps de rétention inférieur au standard interne. Ces informations nous indiquent déjà qu'il y a une différence dans la nature de ces molécules contrairement à ce qu'il est décrit dans Alice *et al.* 2006.

Autre observation importante, la production des composées 790 et 762 Da ne concorde pas avec la nature de la mutation chez *AhlΔmbaS* et *AhlΔmbaF*. En effet, une mutation sur le gène *mbaS* devrait montrer une réduction dans la production de la malléobactine et une mutation sur le gène *mbaF* devrait montrer une augmentation de cette production, hors tel n'est pas le cas observé. Comme le montre la Figure 20, la molécule 790 Da est également produite dans les trois souches tandis que la molécule de 762 Da est sous produite chez *AhlΔmbaS* et *AhlΔmbaF* par rapport à la souche sauvage. Seule la production du composé 636 Da est en concordance avec les attentes. Ceci indique fortement que Alice *et al.* ont tiré des conclusions erronées concernant l'identité de ces molécules puisque les molécules de 790 et 762 Da ne semblent pas du tout être reliées à la malléobactine.

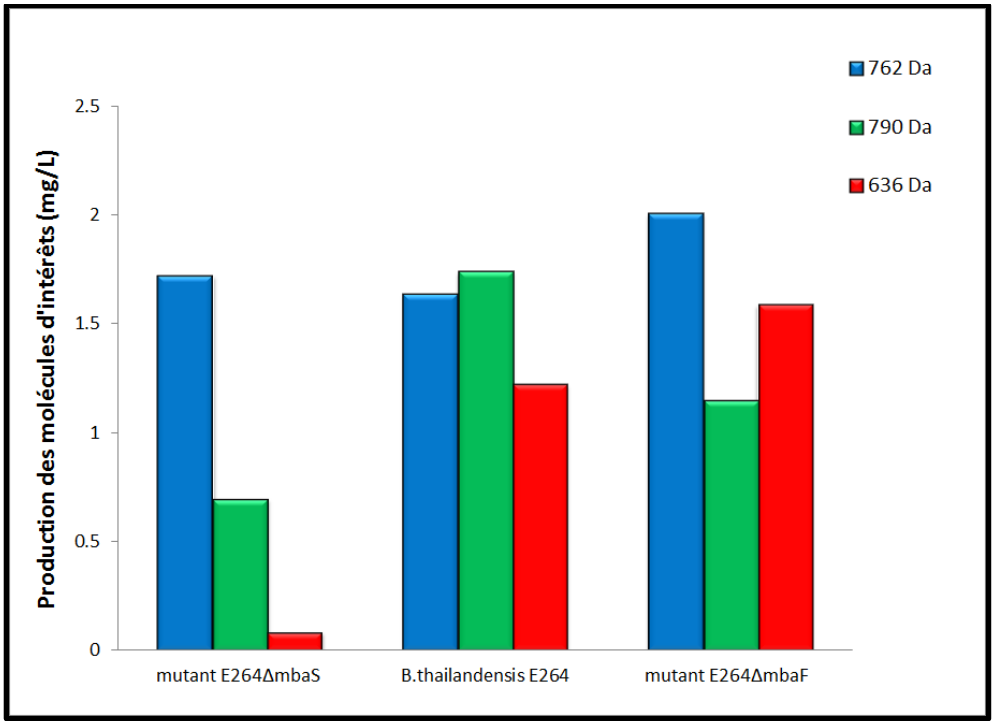


Figure 20. Comparaison de la production des molécules 790, 762 et 636 Da chez *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264 et *AhlΔmbaF*.

Quantification arbitraire basée sur le standard interne HHQ-D4. Les analyses ont été effectuées par électronébulisation positif en mode balayage. Les bactéries ont été cultivées dans du MM9C durant 72h à 37°C. Le graphique est dépourvu d'écart-type car l'analyse a été faite en un seul exemplaire. Le but ici était d'observer si une variation dans la production des molécules 790, 762 et 636 était observable chez *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264 et *AhlΔmbaF.* Des analyses subséquentes confirment cependant ces résultats.

Une fragmentation SM/SM a été effectuée sur les deux composés 790 et 762 Da. Les résultats montrent des patrons de fragmentation relativement semblables (Figure 21 et 22). Les ions filles les plus abondants sont les suivants : *m/z* 163, *m/z* 205, *m/z* 225 et *m/z* 535. Avec les informations cumulées jusqu'à maintenant au sujet de ces deux molécules, nos analyses indiquent que les molécules de 790 et 762 Da décrites dans l'article de Alice *et al.* 2006 seraient en fait des congénères de rhamnolipides, des glycolipides que nous avons précédemment découverts dans les surneageants de cultures de *B. thailandensis* (Dubeau *et al.*, 2009). Pour être plus spécifique, il s'agirait des composés Rhamnose-Rhamnose-C_{14}-C_{14} et Rhamnose-Rhamnose-C_{14}-C_{16} dont les masses molécules sont de 762 Da et 790 Da respectivement (Dubeau *et al.*, 2009).

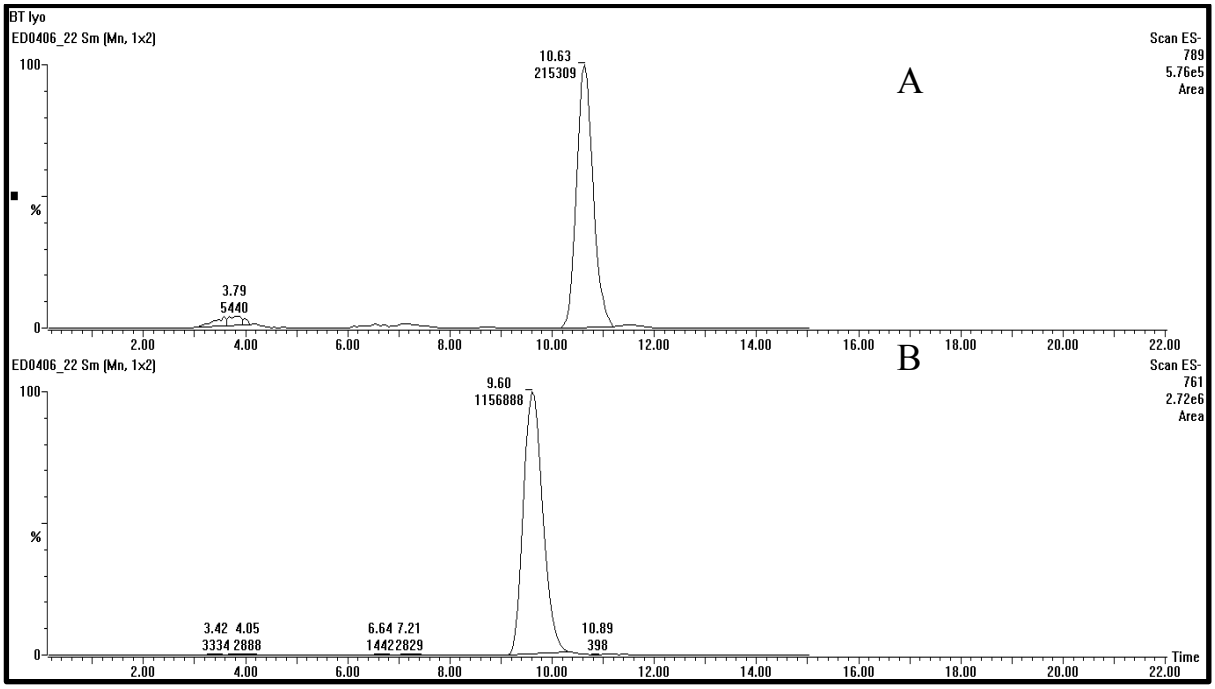


Figure 21. Chromatographies des molécules de 790 Da et de 762 Da

Les molécules ont été analysées chez *B. thailandensis* E264. L'analyse a été faite par électronébulisation négative en mode balayage. La bactérie a été cultivée dans du MM9C durant 72h à 37°C.

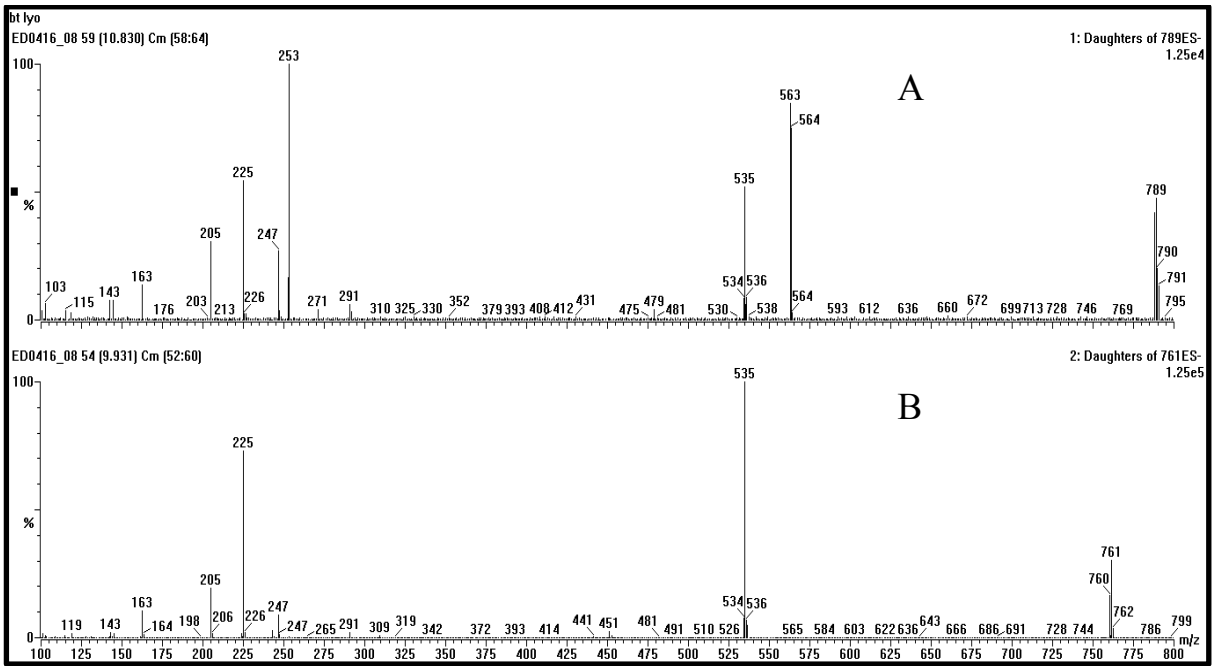


Figure 22. Fragmentogramme des ions précurseurs *m/z* 791 et *m/z* 761 chez *B. thailandensis* E264.

La fragmentation des ions pseudomoleculaires *m/z* 791 et *m/z* 761 montre des spectres de masses très similaires aux spectres de masses des congénères de rhamnolipides présentés dans l'article de Dubeau *et al.,* 2009.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de continuer notre investigation des surnageant des mutants *AhlΔmbaS* et *AhlΔmbaF*, ainsi que de la souche sauvage à la recherche de masses pouvant être associées à la malléobactine. La stratégie est d'identifier des différences dans les chromatogrammes des bactéries par analyse CLHP-SM. Effectivement, en analysant les surnageants des trois bactéries, nous remarquons la présence de composés sortant après 6 à 9 minutes d'élution chez *AhlΔmbaF* et qui ne sont pas présent chez *B. thailandensis* souche sauvage et *AhlΔmbaS* (Figure 23). L'analyse du spectre de masses à cet intervalle de temps montre un groupe d'ions forts intéressants dont fait partie l'ion *m/z* 637 (Figure 24).

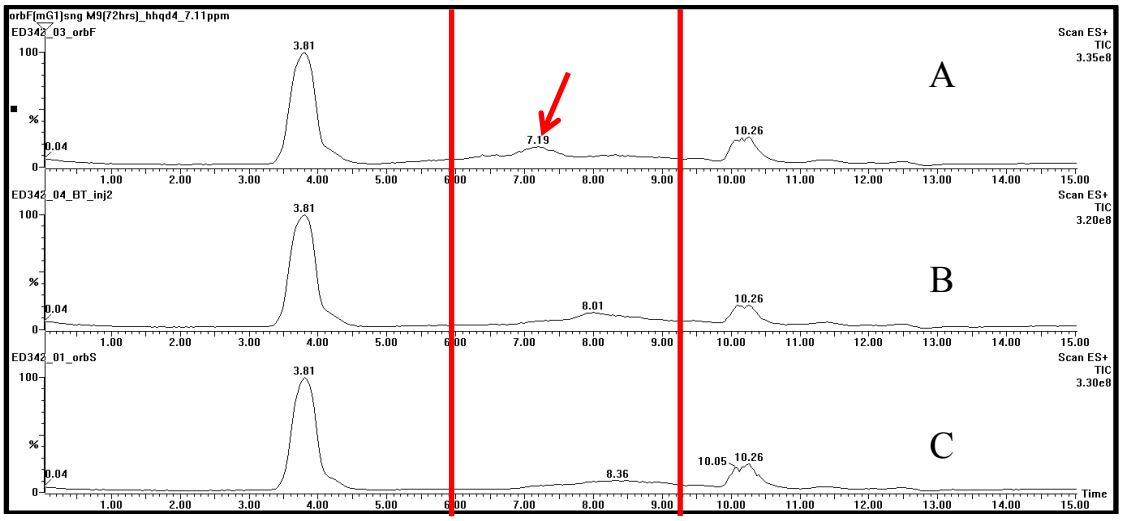


Figure 23. Analyse des chromatogrammes des surnageants de *E264AhlΔmbaF*, *B. thailandensis* E264 et *AhlΔmbaS*.

Les analyses ont été effectuées par électronébulisation positif en mode balayage. Les bactéries ont été cultivées dans du MM9C durant 72h à 37°C.

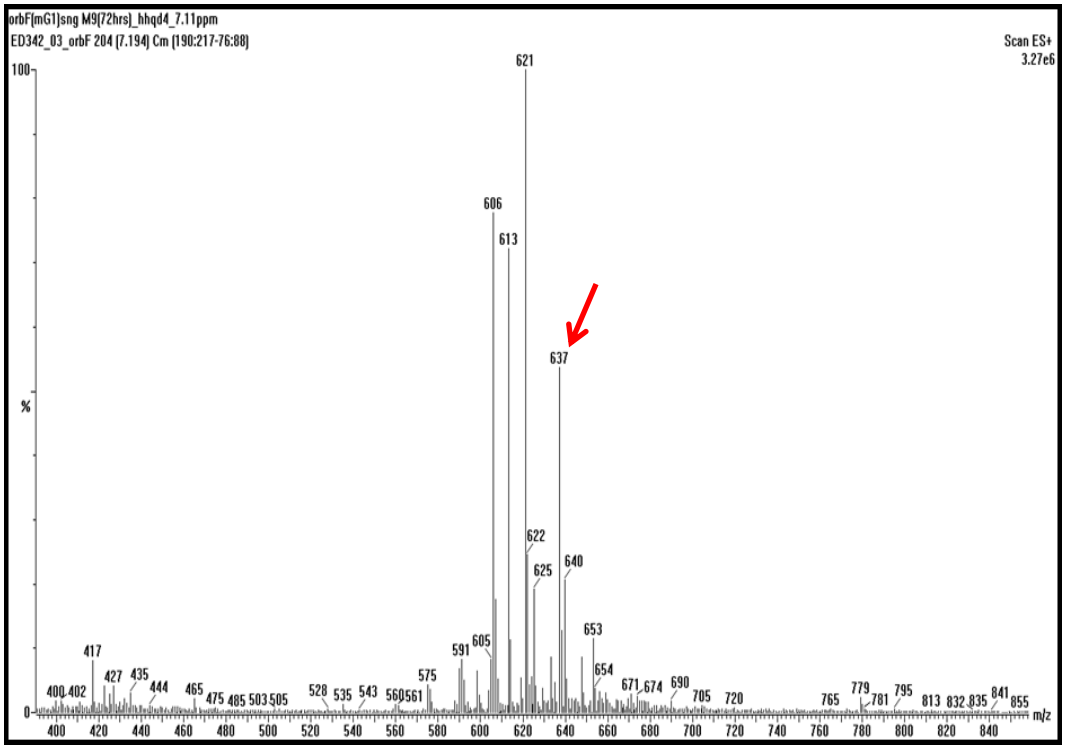


Figure 24. Spectre de masses au temps de rétention 6 à 9 minutes chez le mutant *AhlΔmbaF*. Ions d'intérêts : *m/z* 606, *m/z* 613, *m/z* 621 et *m/z* 637.

En évaluant la production de ces composés chez le mutant *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264, *AhlΔmbaF* et *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3* (Figure 25), nous remarquons qu'il y a une concordance avec la nature des mutations. C'est-à-dire que *AhlΔmbaS* produit peu de ces molécules tandis que *AhlΔmbaF* et *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3* surproduisent ces molécules comparé à la souche sauvage, comme attendu d'après les observations sur géloses CAS.

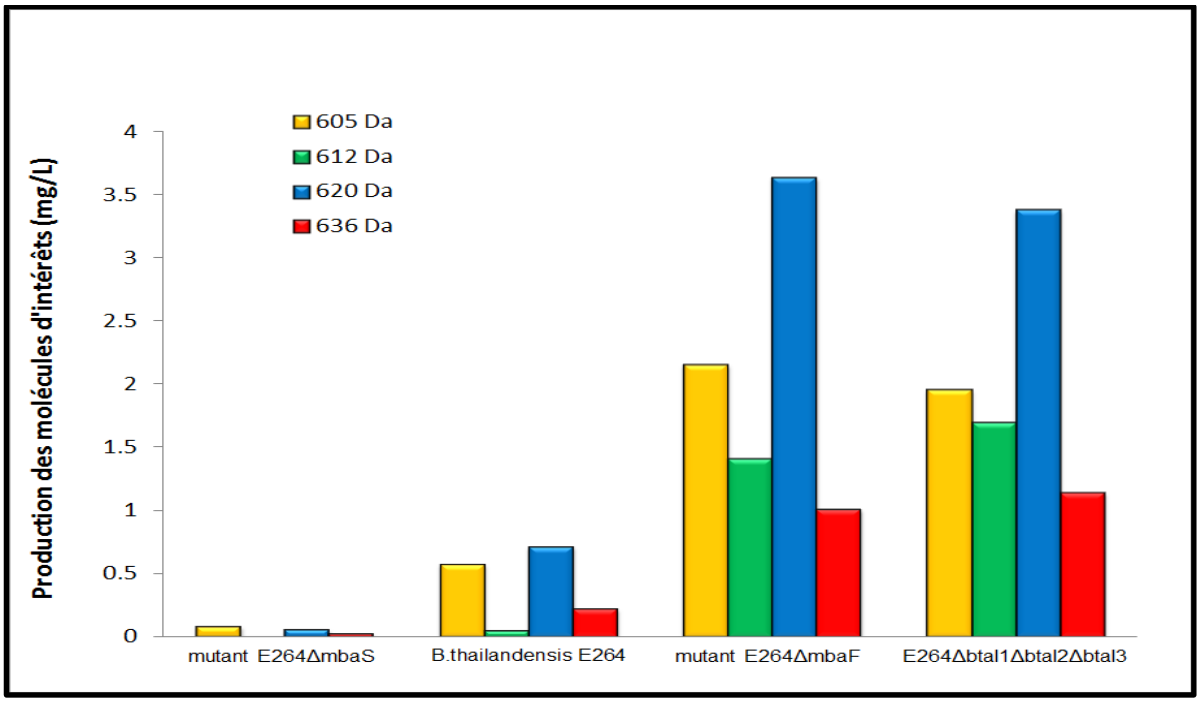


Figure 25. Comparaison, par CLHP-SM, de la production des molécules d'intérêts 605 Da, 612 Da, 620 Da et 636 Da chez *AhlΔmbaS*, *B. thailandensis* E264, *AhlΔmbaF* et *E264ΔbtaI1ΔbtaI2ΔbtaI3*.

Quantification arbitraire basée sur le standard interne HHQ-D4. Les analyses ont été effectuées par électronébulisation positif en mode balayage. Les bactéries ont été cultivées dans du MM9C durant 72h à 37°C. Le graphique ne montre pas d'écart-type dû au fait qu'il s'agit d'analyses sur des anciennes injections au CLHP-MS. Il s'agit en fait du même chromatogramme présenté à la figure 20.

2.5.4.2. Nature chélatrice des composés 636, 620, 612 et 605 Da.

Jusqu'à maintenant, nous avons été en mesure d'identifier des masses pouvant être associées à la malléobactine. Un groupe de molécules ont étés constatées au même temps de rétention que la molécule de 636 Da qui a déjà été identifiée comme étant un plausible congénère de la malléobactine par (Alice *et al.* 2006). De plus, la production de ces molécules concorde bien avec les mutations chez *B. thailandensis* qui affectent certains gènes de la biosynthèse et la régulation de la malléobactine.

Pour faire suite aux expériences, nous avons voulu vérifier les propriétés chélatrices de ces molécules. Pour se faire, nous avons utilisé deux métaux trivalents, c'est-à-dire le gallium (Ga(III)) ainsi que le fer (Fe(III)) pour l'expérience. La masse moléculaire du gallium est de 69,72 g/mol avec la perte de 3 charges, nous devons ajouter une masse de 66 Da à nos molécules d'intérêts. Le même principe est employé pour le fer dont la masse est de 55,84 g/mol. Avec la perte de 3 charges, on doit additionner 53 Da. Si nos molécules d'intérêts sont en mesure de complexer un de ces métaux, nous devrions observer l'apparition de pics correspondant aux ions de chaque molécule plus 66 Da (pour le gallium) ou plus 53 Da (pour le fer) (Tableau 7).

Tableau 7. Ions attendu sur les chromatogrammes s'il y a activité chélatrice

Ions des molécules d'intérêts (*m/z*)	Ions des molécules d'intérêt + Ga(III)	Ions des molécules d'intérêt + Fe(III)
606	672	659
613	679	666
621	687	674
637	703	690

D'après les résultats présentés aux Figure 26 et 27, les molécules d'intérêts présentent des propriétés chélatrices de métaux. En effet, les molécules 605 Da, 620 Da et 636 Da sont en mesure de chélater le gallium (III) ainsi que le fer (III). La même conclusion est tirée pour la molécule de 612 Da même si les ions ne sont pas très apparents sur le chromatogramme.

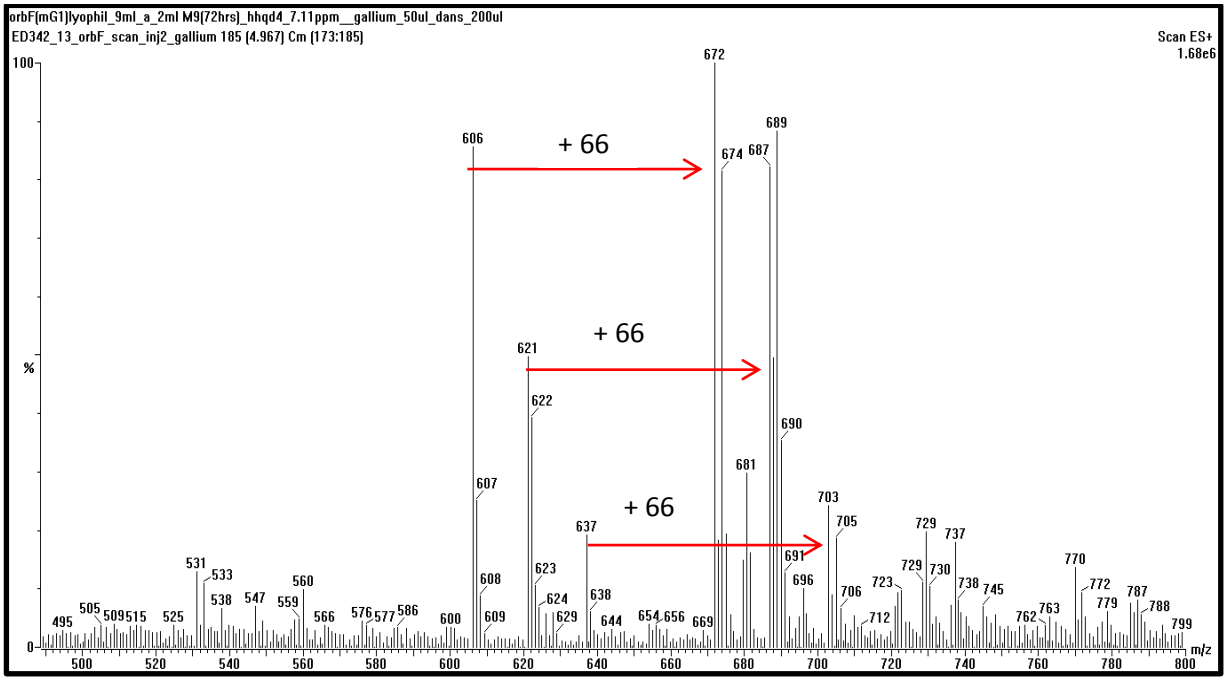


Figure 26. Chromatogramme d'un surnageant du mutant *AhlΔmbaF* avec l'ajout de gallium [13 mM]

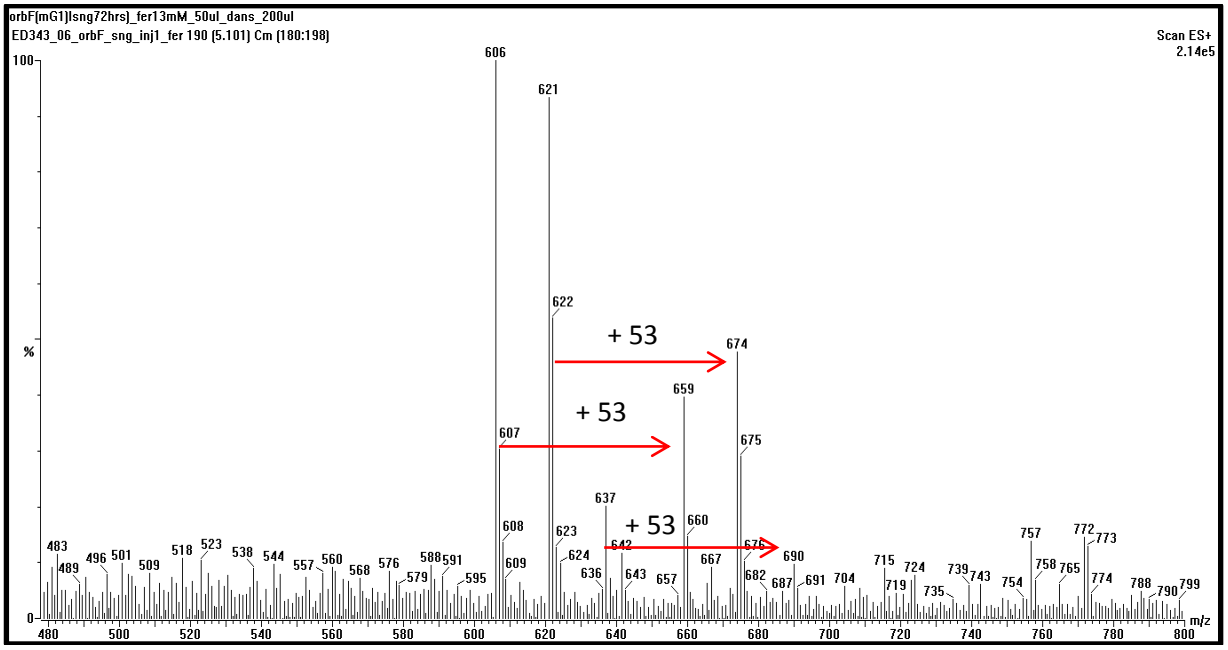


Figure 27. Chromatogramme d'un surnageant du mutant *AhlΔmbaF* avec l'ajout de fer [13 mM]

2.5.4.3. Similarité structurelle à l'ornibactine

Selon la littérature, la malléobactine serait très similaire structurellement à l'ornibactine. Cette hypothèse est appuyée par la très grande homologie entre les gènes de la biosynthèse et de la régulation de ces deux sidérophores (Figure 5). De plus, l'article d'Alice *et al.* 2006 stipule que la malléobactine peut alimenter un mutant de *B. cenocepacia* déficient en ornibactine. Nous avons voulu ici démontrer que nos molécules d'intérêts possèdent bel et bien une structure homologue à l'ornibactine en effectuant deux expériences différentes.

La première expérience consistait à enrichir notre milieu de culture qui est le MM9 avec de la L-sérine (10 mM) et de la L-ornithine (10 mM). Sachant que l'ornibactine est de base un sidérophore tétrapeptidique avec un regroupement L-ornithine–D-hydroxyaspartate–L-serine–L-ornithine (Figure 4), nous avons émis l'hypothèse qu'en rajoutant ces deux acides aminés, nous allions trouver une augmentation de la production de nos molécules d'intérêts. Cette hypothèse s'est effectivement confirmée. Il est possible d'observer une augmentation de la production de ces molécules lors de l'ajout des deux acides aminés comparée au milieu MM9C (Figure 28). Avec ces résultats, ce milieu enrichi sera dorénavant utilisé dans les expériences subséquentes afin de maximiser la production de nos molécules d'intérêts.

La Figure 28 présente des expériences fait en unicata. Des analyses subséquentes en comparant seulement le milieu MM9 avec le milieu modifié MM9+serine+ornithine (MM9M) confirme sans aucun doute l'augmentation de la production de sidérophores lors de l'ajout des deux acides aminés.

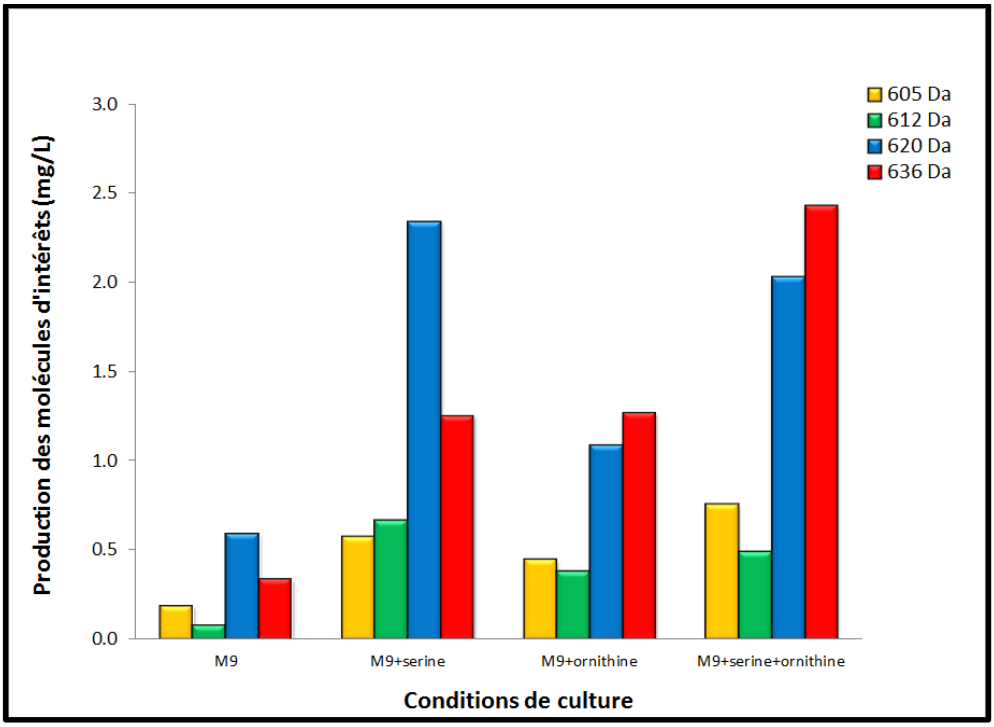


Figure 28. Effet de l'ajout de sérine et ornithine sur la production de la malléobactine chez le mutant *AhlΔmbaF*

La bactérie a été cultivée dans le milieu de culture MM9C avec l'ajout de L-sérine et/ou de L-ornithine à une concentration de 10 mM chacun. L'incubation a été faite à 37°C durant 72h.

La deuxième expérience consistait à une analyse par CLHP-SM. Tout d'abord, afin de vérifier ses caractéristiques structurelles et d'obtenir une source de comparaison, nous nous sommes procurés de l'ornibactine-C6 pure chez EMC microcollections GmbH (Allemagne). Il s'agit de la forme non complexée (forme apo) dont la masse moléculaire est de 708 Da. La molécule possède la formule chimique suivante $C_{28}H_{53}N_8O_{13}$. Avant d'effectuer l'analyse en CHLP-SM, nous avons préparé une solution d'ornibactine-C6 à une concentration de 500 mM. En effectuant un balayage en mode positif, il faut rajouter un proton de plus $[M + H]^+$ à la masse de l'ornibactine-C6 afin d'obtenir son ion pseudomoléculaire de *m/z* 709. La Figure 29 montre le chromatogramme obtenu par *total ion count* (TIC) de la solution pure ainsi que la correspondance en analysant la *m/z* 709 seulement.

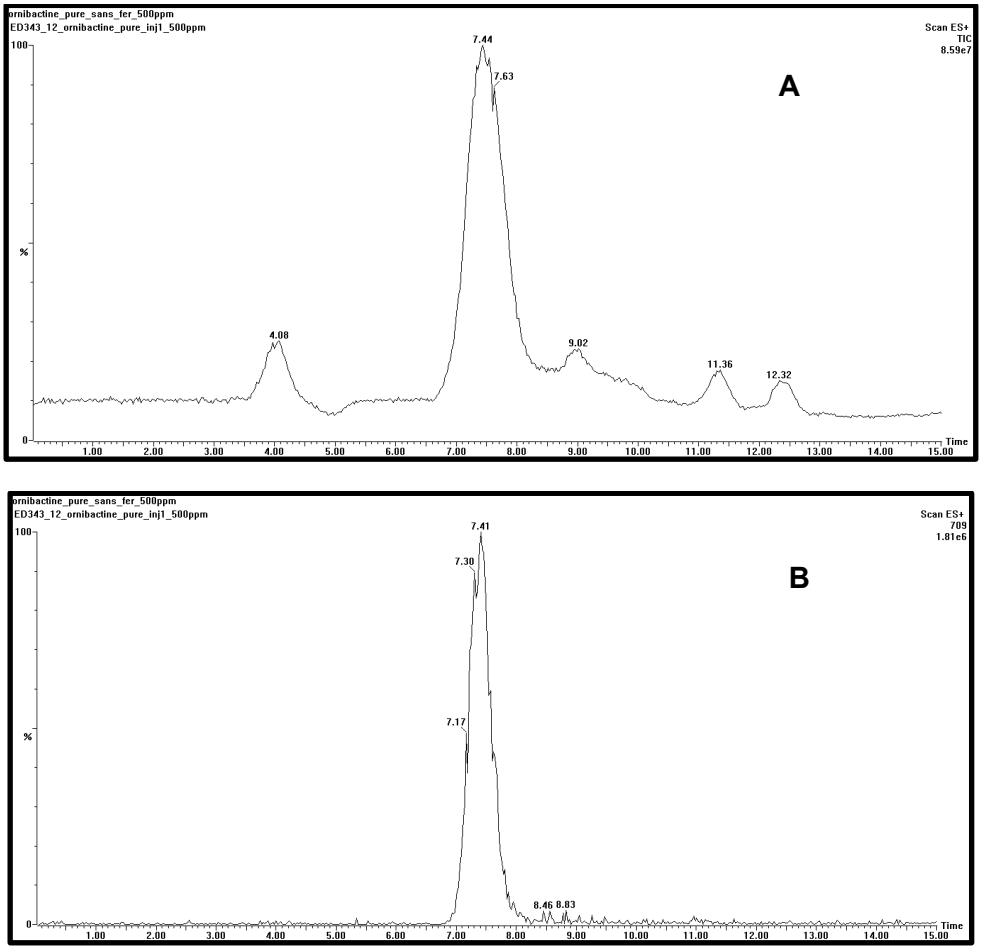


Figure 29. Analyse par CLHP-SM de l'ornibactine-C6 en mode positif.

A) Chromatographie (TIC) de la solution à 500 mM de l'ornibactine-C6 pure. B) Chromatographie de l'ion *m/z* 709. Le R_t de la molécule est de 7.50 minutes.

Suite à une fragmentation de l'ornibactine-C6, on peut remarquer un autre ion intéressant, soit l'ion *m/z* 762, qui représente l'ornibactine-C6 complexé à un ion de fer (Figure. 30). L'apparition de cette forme ferri-ornibactine-C6 n'est pas si surprenante puisque la solution-mère d'ornibactine-C6 pure n'a pas été déferrée et que des traces de fer ont bien pu légèrement contaminer la solution.

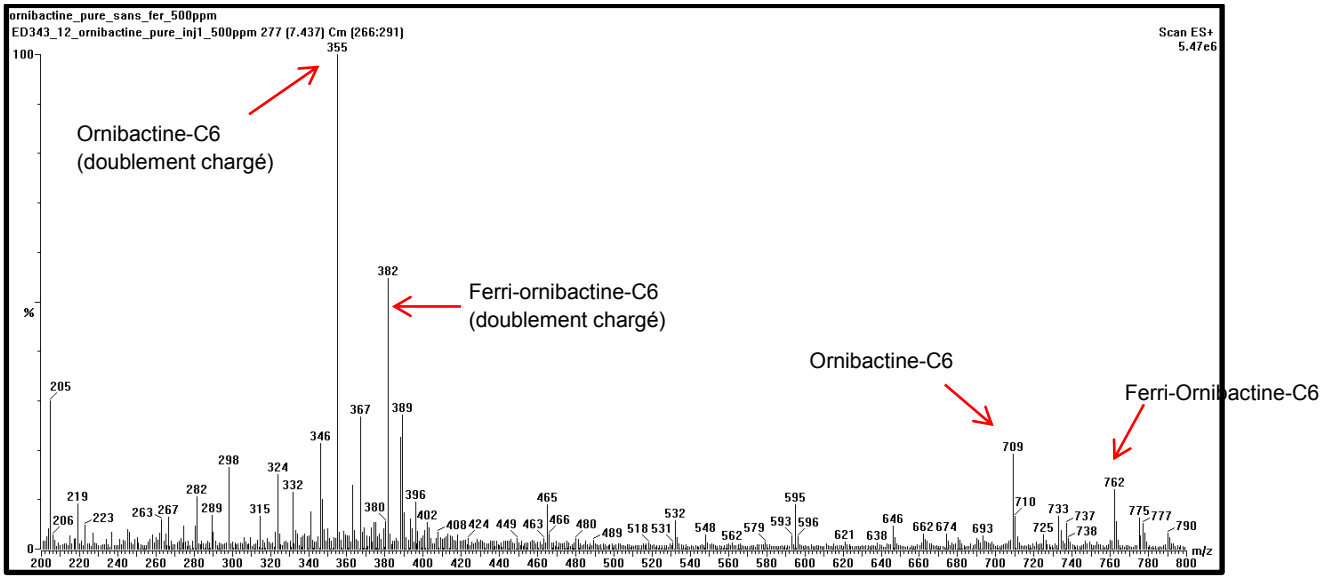


Figure 30. Spectre de masses au R_t de l'ornibactine-C6.

Une autre observation intéressante sur la Figure 30 est la présence des ions *m/z* 355 et *m/z* 382 que nous suspectons être les formes doublement chargé (Masse = 1/2 (M+2H)) de l'ornibactine-C6 et de la ferri-ornibactine-C6, respectivement. En effet, les molécules ionisées de hautes masses peuvent acquérir plus d'un état de charge, $[M + nH]^{n+}$. Une bonne façon d'identifier rapidement s'il est question d'ions doublement chargé, est d'observer la différence de masses (Δ) entre l'ion pseudomoléculaire et son ion isotopique (M+2). En temps normal, un ion pseudomoléculaire doublement chargé possèdera un ion isotopique à une distance de Δ = 0.5 Da comparativement à un ion simplement chargé où l'ion isotopique est à une distance de Δ = 1 Da (Figure 31 et 32).

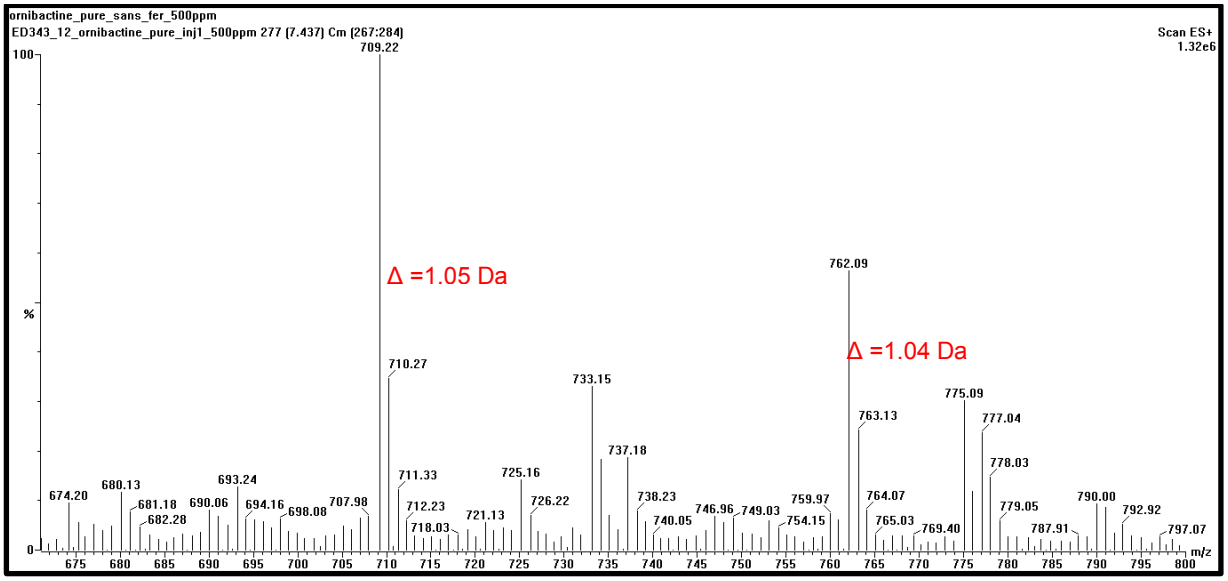


Figure 31. Spectre de masses des ions simplement chargés de l'ornibactine-C6.

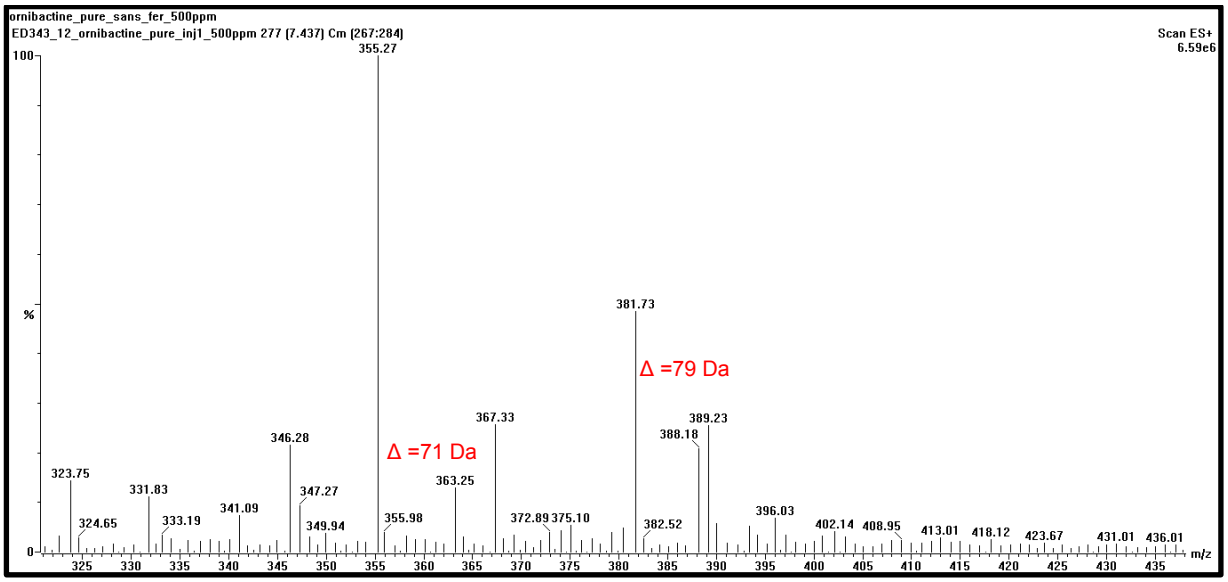


Figure 32. Spectre de masses des ions doublement chargés de l'ornibactine-C6.

Il peut s'avérer très utile de repérer les ions multiplement chargés d'une molécule d'intérêt. Ceci permet d'une part d'appuyer la présence de cette molécule, comme dans notre cas, et d'autre part de déterminer le poids moléculaire d'une molécule de façon très précise. Par exemple, dans le cas des protéines, grosses molécules qui peuvent générer des ions simplement chargés pouvant parfois excéder la valeur *m/z* couverte par l'éventail de balayage du CLHP-SM (rarement plus haut que 4000 *m/z*), ces dernières peuvent générer quelques ions correspondants à des états de charges

différents. De cette manière, il suffit de calculer la charge des différents ions et par la suite de calculer la masse de la molécule.

Un peu comme pour la pyochéline auparavant, nous avons fragmenté l'ion précurseur de l'ornibactine-C6 à la recherche d'ions filles. La fragmentation de l'ion *m/z* 709 nous montre un spectre de masses dont les ions les plus abondants sont *m/z* 247, *m/z* 334 et *m/z* 465 (Figure 33). En fragmentant l'ion *m/z* 355, nous retrouvons un spectre de masses très similaire au spectre de masses de la fragmentation de l'ion *m/z* 709 (Figure 34). On y retrouve également les ions observés plus tôt c'est-à-dire *m/z* 247, *m/z* 334 et *m/z* 465. Ceci vient appuyer le fait que l'ion *m/z* 355 est très probablement l'état doublement chargé de la molécule de l'ornibactine-C6.

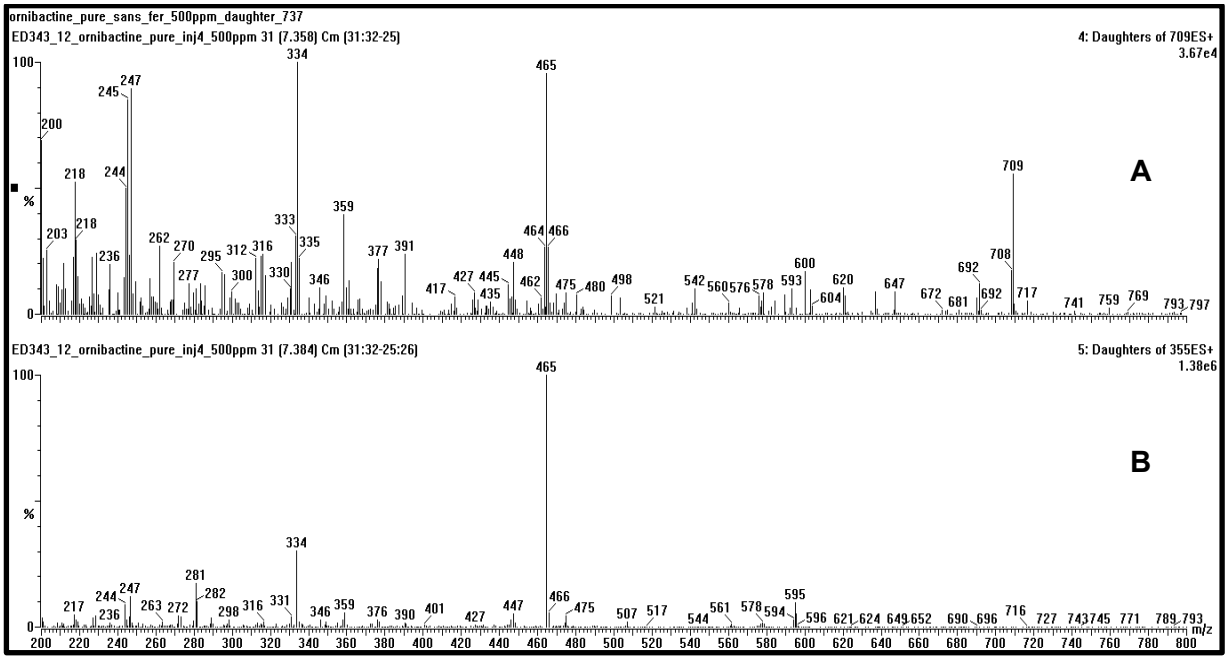


Figure 33. Fragmentation de l'ion précurseur de l'ornibactine-C6.

A) *m/z* 709 (ion pseudomoléculaire simplement chargé) et B) *m/z* 355 (ion pseudomoléculaire doublement chargé)

Nous avons ensuite analysé le surnageant de la bactérie *B. cepacia* ATCC 25146 qui est connue pour produire de l'ornibactine-C6 et de l'ornibactine-C8 (Meyer *et al.*, 1995). Avec les informations obtenues précédemment à savoir que l'ornibactine-C6 possède un R_t de 7,50 minutes environ dans nos conditions expérimentales, nous nous attendions donc à détecter l'ion pseudomoléculaire de l'ornibactine-C6 chez *B. cepacia* ATCC25146 au même R_t. Comme observé à la Figure 34, la

chromatographie de l'ion de l'ornibactine-C6 montre bien un R_t de 7,50 minutes. Nous avons également été en mesure d'observer l'ornibactine-C8 dont la masse moléculaire est de 736 Da. L'ion pseudomoléculaire de l'ornibactine-C8 possède un Rt de 8 minutes.

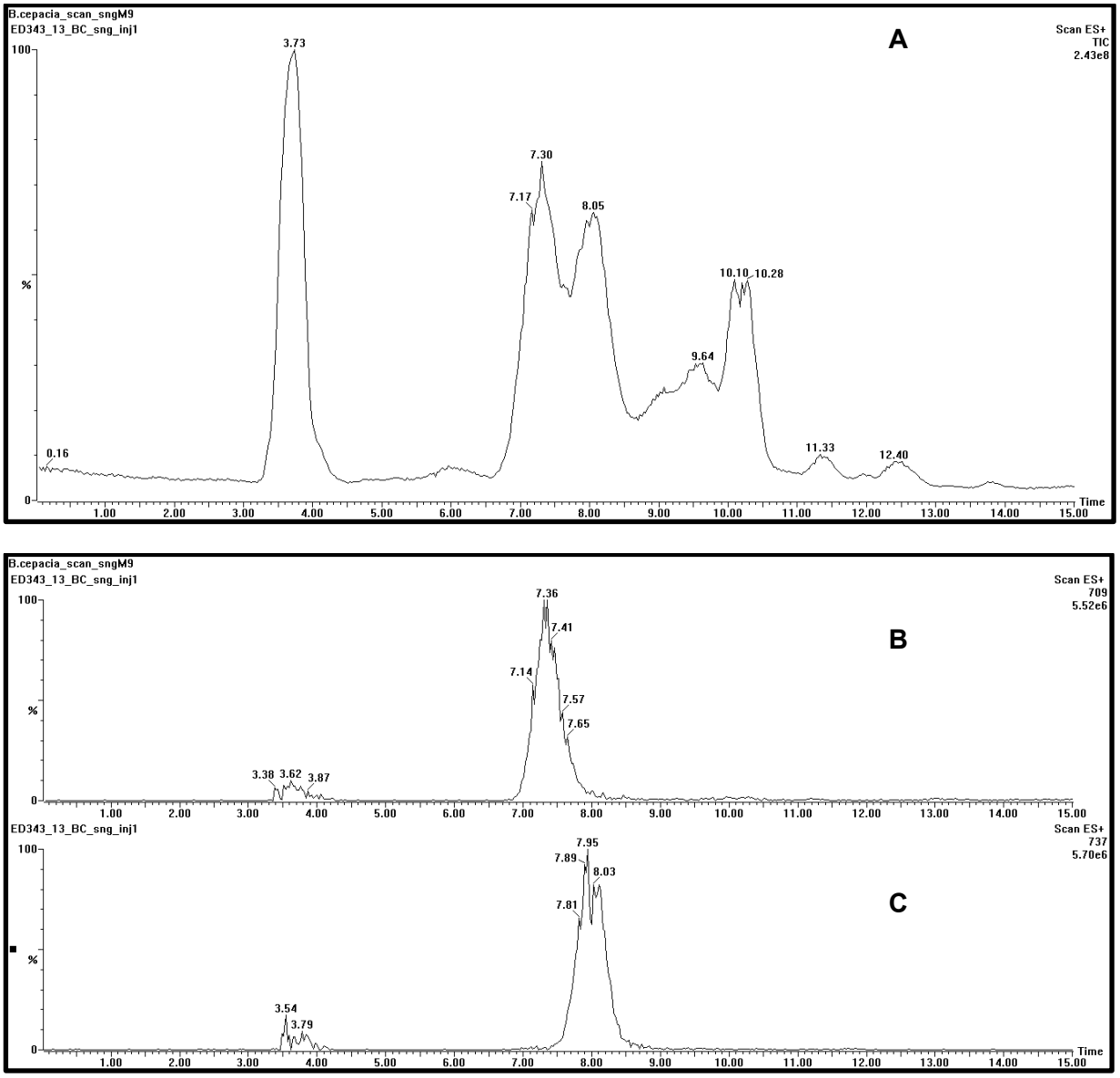


Figure 34. Chromatogrammes correspondant à l'ornibactine-C6 et l'ornibactine-C8.

A) Chromatographie (TIC) d'un surnageant de *B. cepacia* ATCC 25146. B) Chromatographie de l'ion pseudomoléculaire de l'ornibactine-C6. C) Chromatographie de l'ion pseudomoléculaire de l'ornibactine-C8. L'ionisation s'est fait en mode positif et l'analyse en mode balayage. Les bactéries ont été cultivées dans du MM9M durant 72h à 37°C.

Les spectres de masses des deux ions pseudomoléculaires de l'ornibactine-C6 et l'ornibactine-C8 chez *B. cepacia* ATCC 25146 montrent également des ions doublement chargés pour chaque molécule (Figure 35). La fragmentation de ces quatre molécules présente des spectres de masses très similaires à l'expérience de l'ornibactince-C6 pure. Nous détectons encore une fois les ions filles *m/z* 247, *m/z* 334 et 465 comme majoritairement abondant (Figures 36 et 37). Cet exercice nous a permis de confirmer en premier lieu que *B. cepacia* ATCC 25146 produisait bel et bien l'ornibactine-C6 et l'ornibactine-C8 et deuxièmement il nous a été possible d'évaluer le patron du spectre de masse de l'ornibactine et de déterminer les ions filles majoritairement produits suite à la fragmentation de l'ion précurseur en mode positif.

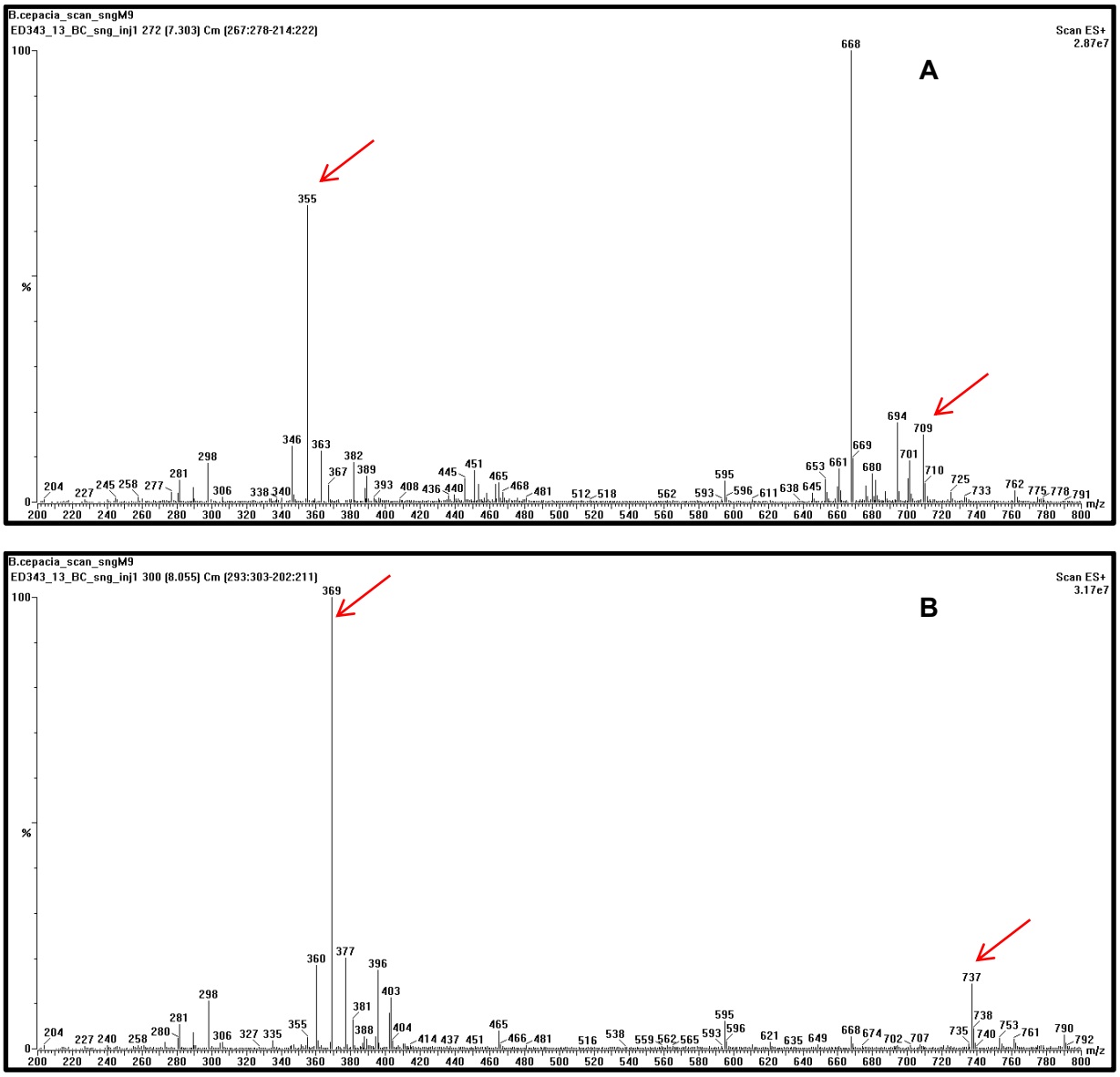


Figure 35. Spectre de masses au R_t de l'ornibactine-C6 et de l'ornibactine-C8 chez *B. cepacia* ATCC2 5146.

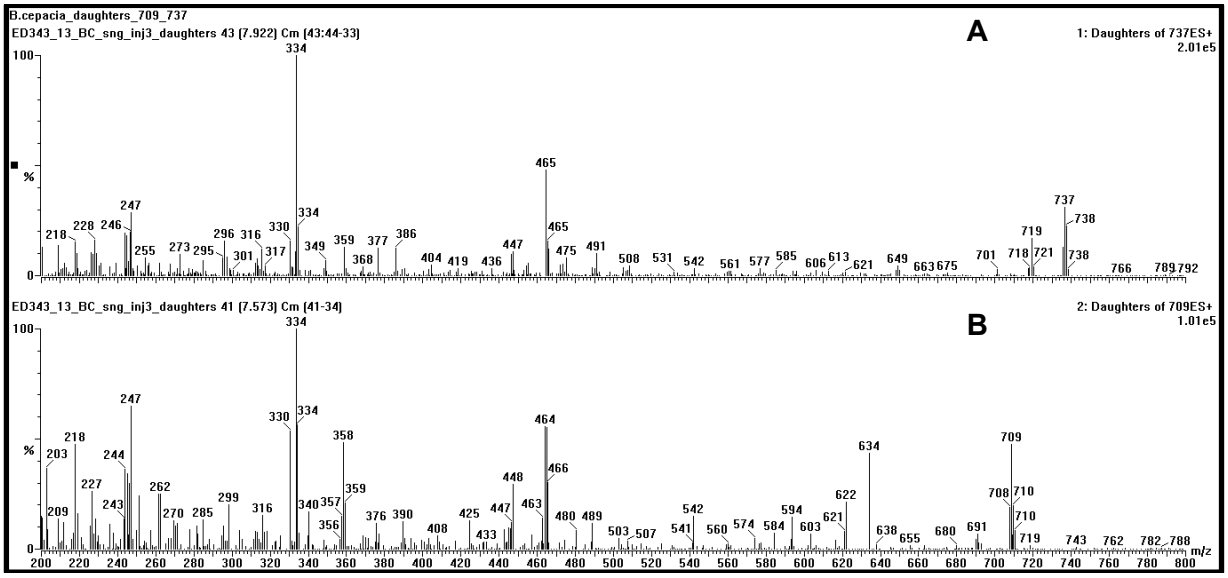


Figure 36. Fragmentogramme de l'ion précurseur de l'ornibactine-C8 (*m/z* 737) et de l'ornibactine-C6 (*m/z* 709) chez *B. cepacia* ATCC2 5146.

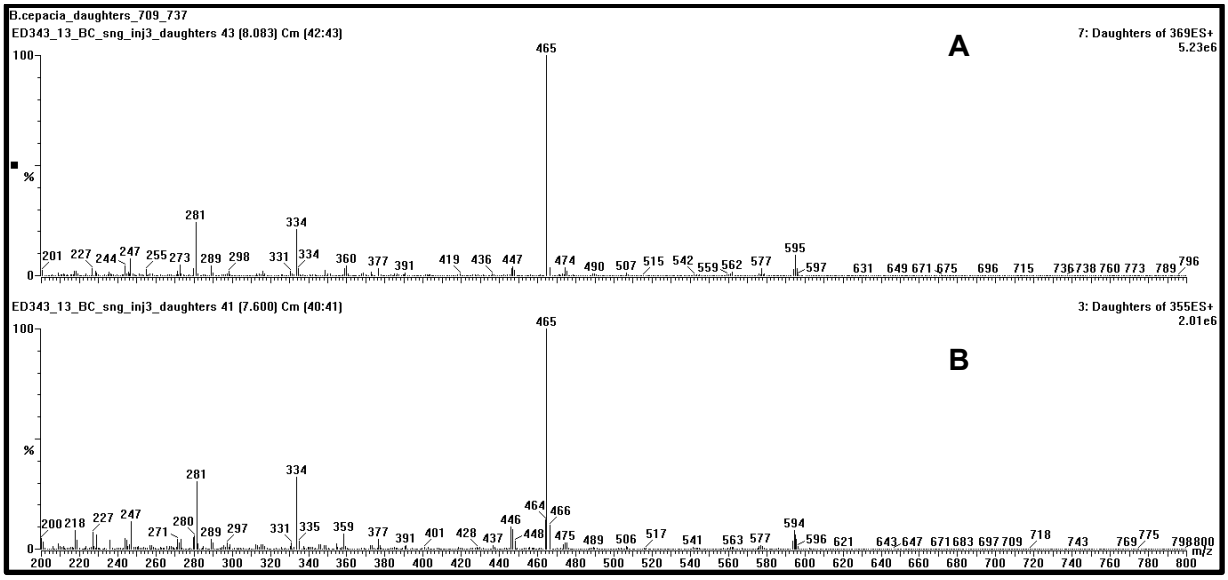


Figure 37. Fragmentation de l'ion précurseur doublement chargé de l'ornibactine-C8 (*m/z* 369) et de l'ion précurseur doublement chargé de l'ornibactine-C6 (*m/z* 355) chez *B. cepacia* ATCC2 5146.

En transposant cet exercice à nos molécules d'intérêts, il est possible premièrement d'observer que la fragmentation des ions *m/z* 606, *m/z* 613, *m/z* 621 et *m/z* 637 présente des patrons de spectres similaires entre eux (Figure 38). Ceci nous montre que ces molécules sont très probablement des congénères. Deuxièmement, nous remarquons que les ions majoritaires communs entre les quatre spectres sont *m/z* 247 et *m/z* 334. Il s'agit de deux ions filles également retrouvé chez le spectre de

fragmentation de l'ornibactine. Toute porte à croire ici, qu'en effet, nos molécules d'intérêts possèdent des similarités structurelles à l'ornibactine.

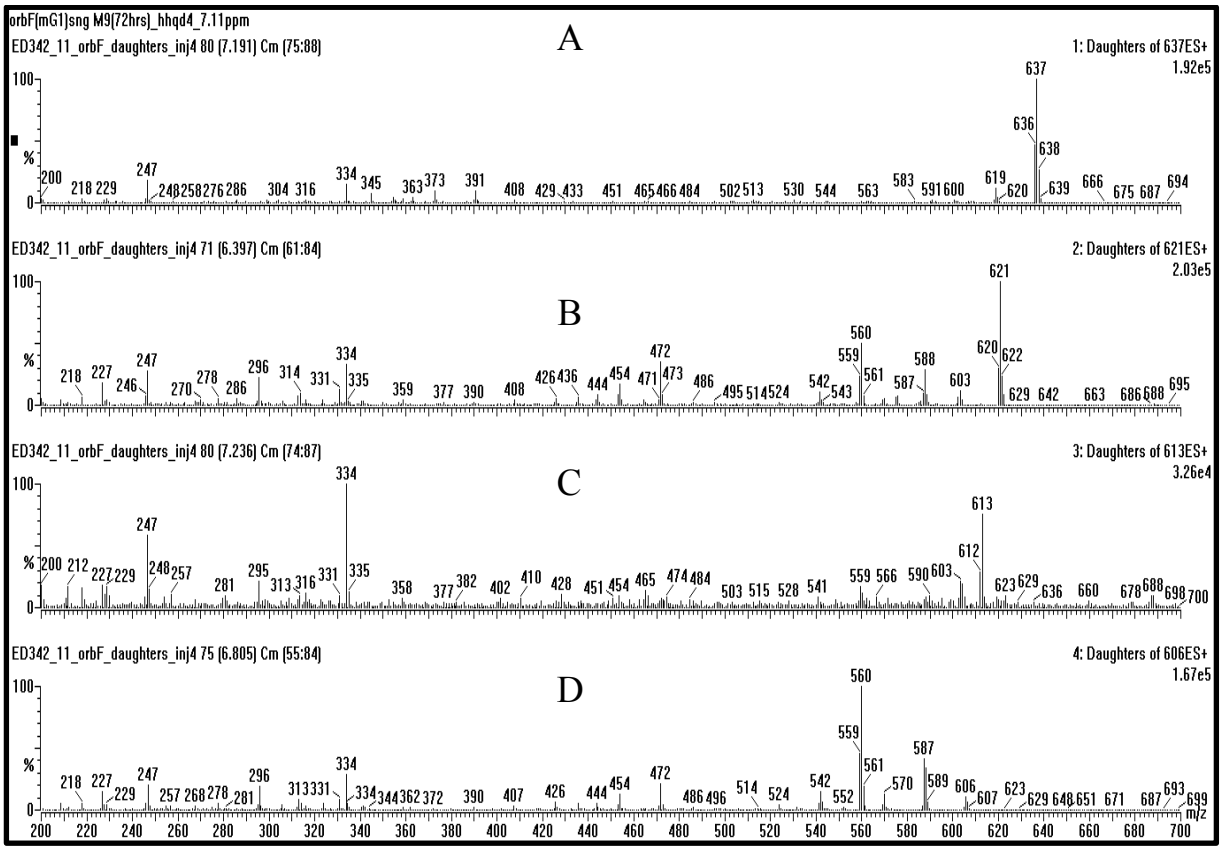


Figure 38. Fragmentogramme des ions précurseurs des molécules d'intérêts chez le mutant *AhlΔmbaF.*

A) *m/z* 637, B) *m/z* 621, C) *m/z* 613 et D) *m/z* 606. L'ionisation s'est fait en mode positif. La bactérie a été cultivée dans du MM9M durant 72h à 37°C.

Avec les informations cumulées jusqu'à maintenant sur nos molécules d'intérêts, il nous est possible de conclure que ces molécules sont bel et bien des sidérophores produits par l'activité des enzymes codés par les gènes *mba*, considérés responsable de la production de la malléobactine. De plus, puisque nous avons été en mesure de retrouver la fameuse molécule de 636 Da décrite chez Alice *et al.* 2006 et de confirmer que cette dernière possède des propriétés chélatrice de fer, nous pouvons considérer que ces molécules sont les réelles molécules de malléobactine, dont la structure reste inconnue, mais vraisemblablement similaire à l'ornibactine.

2.5.4.4. Purification de la malléobactine

Pour déterminer la nature de la malléobactine, il faut la purifier. Pour purifier les sidérophores il faut être en mesure de les extraire du milieu de culture. La plupart des méthodes d'extractions visent à isoler ces molécules d'intérêts en fonction de leur polarité. De manière générale, les sidérophores sont des molécules de polarité moyenne pouvant former un grand nombre de liaisons hydrogène. La technique favorisée dans notre étude est l'utilisation de résines adsorbantes de type Amberlite XAD-4 (Sigma). L'emploi de cette résine a été inspiré de *Persmark et al.* (Persmark *et al.*, 1989). Elle a déjà été utilisée par Sayyed *et al.* (Sayyed *et al.*, 2006) pour la purification de sidérophores chez la bactérie *Alcaligene*s *faecalis* ainsi que par *Weinsing et al.* (Wensing *et al.*, 2010) pour la purification de la pyoverdine et de l'achromobactine chez *Pseudomonas syringa.*

Avant de procéder à l'extraction de la malléobactine, nous avons voulu estimer les conditions pouvant permettre une production maximale du sidérophore. Il a déjà établi que le milieu MM9M était un milieu qui pouvait grandement favoriser la production de ces molécules. Toutes nos conditions expérimentales jusqu'à présent se sont effectuées dans le milieu MM9M à une incubation à 37°C durant 24 à 72 heures. Nous avons voulu évaluer si un temps plus long d'incubation pouvait nous permettre d'obtenir une plus grande production de ces molécules tout en ayant des cellules dans la phase stationnaire de leur croissance. Maintenant que nous connaissons les masses des congénères vraisemblablement reliés à la malléobactine, il devenait possible d'effectuer un suivi de la cinétique de production au cours du temps.

La Figure 39 nous montre qu'il est effectivement, possible de continuer l'incubation à un temps d'environs 100 heures avant de voir un déclin de la phase stationnaire des cellules bactériennes (Figure 40). Ceci nous montre également que la production de sidérophores est maximale après la fin de la phase logarithmique de croissance.

Notons ici qu'il arrive que *B. thailandensis* forme des agrégats cellulaires dans le milieu MM9M rendant ainsi l'évaluation de la croissance cellulaire impossible par mesure de DO_{600}. Lorsque cela survient, la croissance cellulaire est évaluée par dosage de protéines totales. Pour ce fait, la méthode de Bradford a été employée.

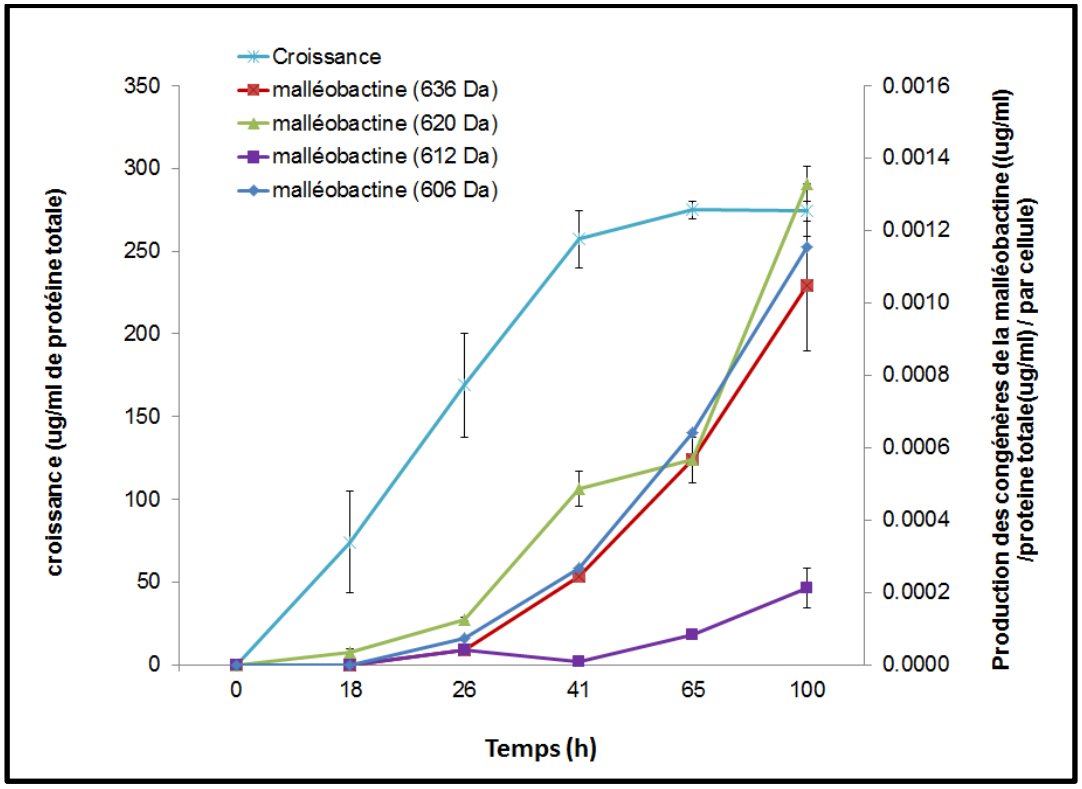


Figure 39. Production de la malléobactine en fonction de la croissance durant 100 heures chez *B. thailandensis*.

La bactérie a été cultivée dans du MM9M durant 100 hr à 37°C. La croissance cellulaire a été évaluée par dosage de protéines totales (méthode de Bradford). La production des congénères de la malléobactine a été évaluée par CLHP-SM en mode balayage positif. La quantification relativement a été calculée par rapport au standard interne HHQ-D4 dont la concentration ajouté était de 5 µg/ml. La production a ensuite été rapportée par quantité de protéine totale (µg/ml)/cellule. Les résultats représentent des données moyennes de réplica. Les barres d'erreur représentent des triplicatas techniques.

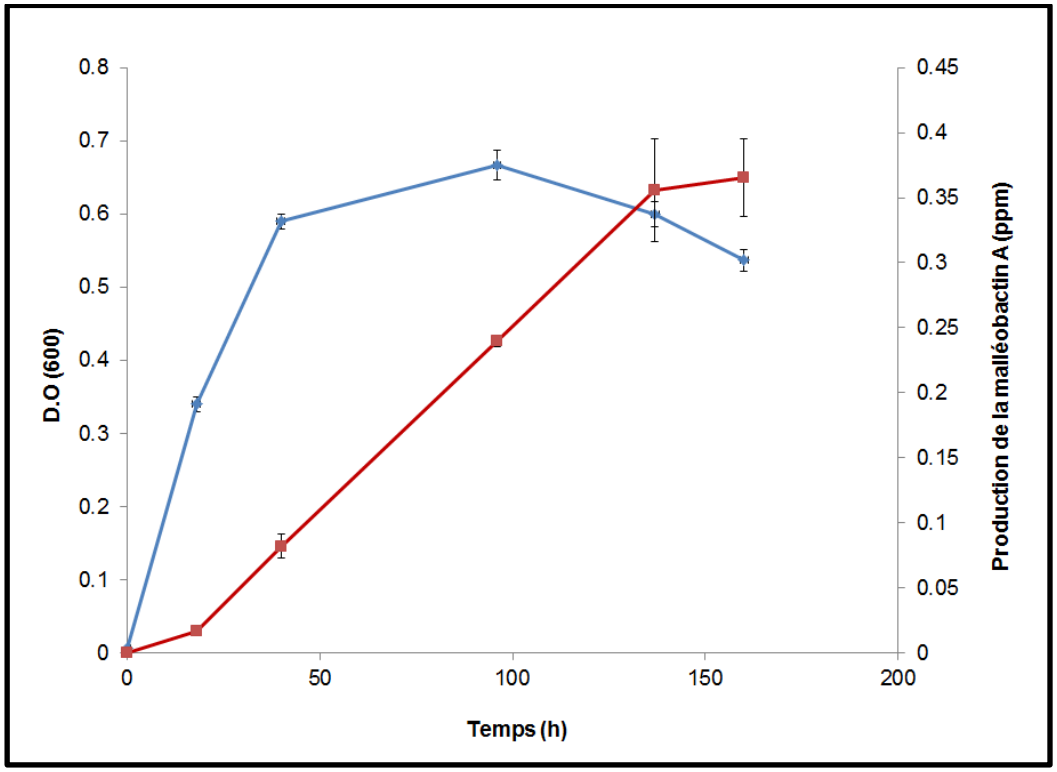


Figure 40. Production de la malléobactine 636 Da en fonction de la croissance durant 160 heures chez *B. thailandensis*.

La bactérie a été cultivée dans du MM9M durant 160 hr à 37°C. La croissance cellulaire a été évaluée par DO_{600}. La production de la malléobactine A (636 Da) a été évaluée par CLHP-SM en mode balayage positif. La quantification relativement a été calculée par rapport au standard interne HHQ-D4 dont la concentration ajouté était de 5 µg/ml. Les résultats représentent des données moyennes de réplica. Les barres d'erreur représentent des triplicatas techniques.

Lors de la première expérience d'extraction des sidérophores par la résine XAD-4, nous avons évalué la présence de la malléobactine par CLHP-SM à chaque étape du procédé. Pour alléger le document, seul le suivi sur la malléobactine de 636 Da sera présenté ici. Un volume de 2,8 L de surnageant a été utilisé pour l'exercice. Durant les premières étapes de l'extraction (Figure 41), nous remarquons qu''environ 13% de la malléobactine n'a pas été absorbée par la résine. Il y a eu un autre 11% de perte du sidérophore suite au lavage des résines par du H_2O. Finalement, environ 70% de la malléobactine détectée dans le surnageant au départ est bien récupéré lors de l'élution au méthanol (Figure 42).

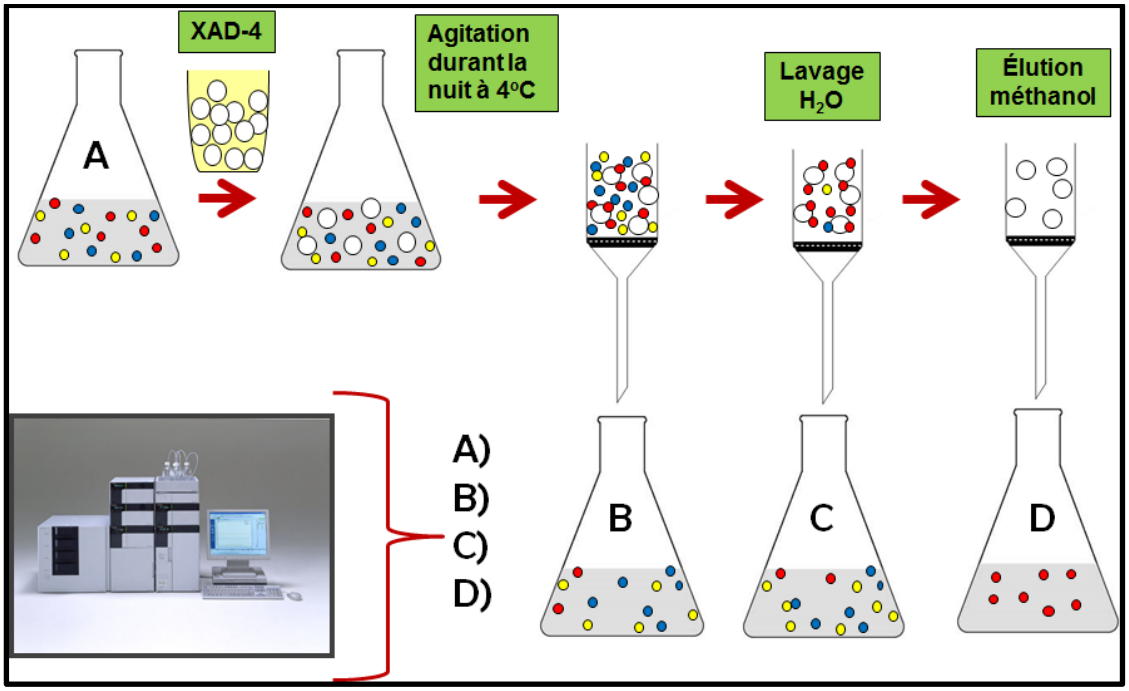


Figure 41. Représentation schématique de l'extraction de la malléobactine.

Le surnageant de 2,8 L de cultures de la souche *AhlΔmbaF* cultivée dans le milieu MM9M a été récupéré par centrifugation avec 100 hr d'incubation. La résine Amberlite XAD-4 (Sigma) a été ajoutée (ration de 10% p/v) pour adsorber les molécules de sidérophores. Les points rouges représentent la malléobactine, alors que les points bleus et jaunes représentent des molécules contaminantes co-extraites par la résine.

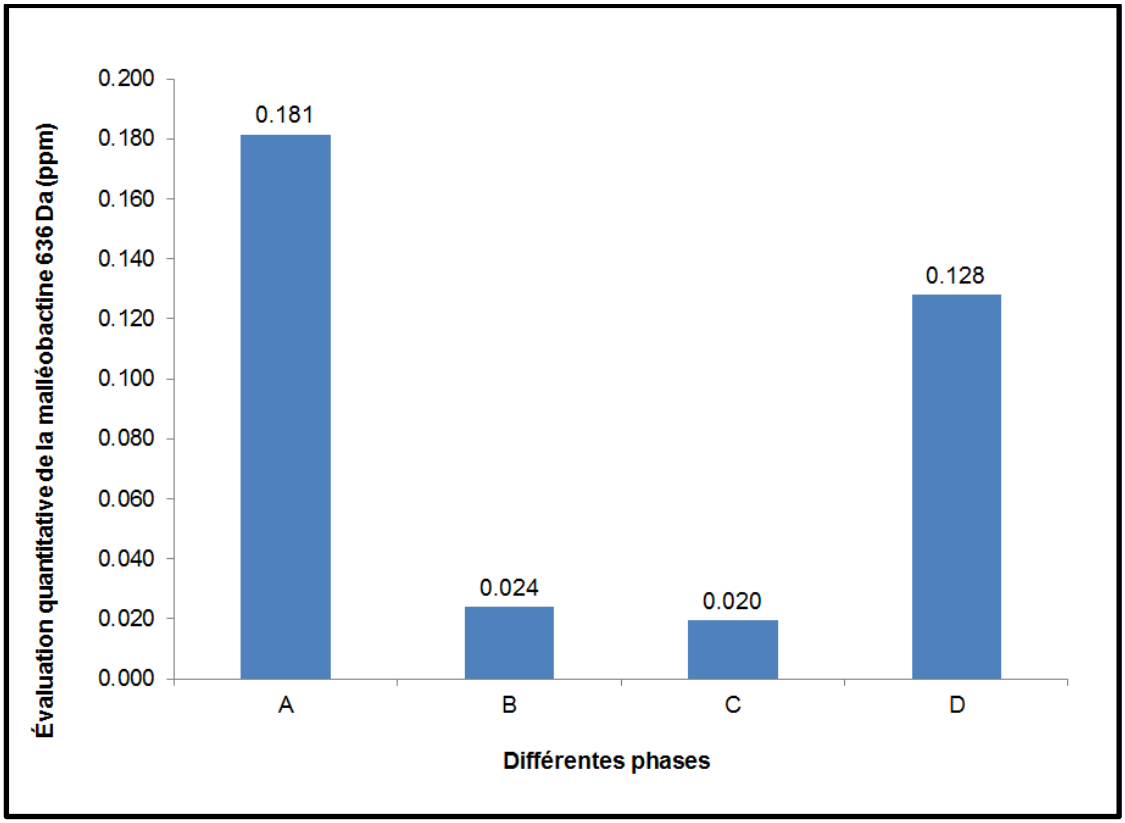


Figure 42. Évaluation quantitative de la malléobacine de 636 Da lors des étapes d'extraction avec la résine Amberlite XAD-4 (partie 1).

A) Surnageant avant l'ajoute des résines. B) Surnageant élué des résines. C) lavage des résines avec du H_2O. D) Élution des sidérophores avec du méthanol. La quantification a été calculée par rapport au standard interne HHQ-D4 ajouté à une concentration de 5 µg/ml.

Suite à l'évaporation à sec du méthanol au Rotovap, les sidérophores ont été resuspendus dans 10 ml d'H_2O. Malgré qu'il aurait été plus simple de garder les sidérophores dans du méthanol, la détection de la malléobactine n'est pas optimale dans cette phase. Les pics des ions pseudomoléculaires ne sont pas clairs et il n'est pas rare d'observer des longues « trainées » produites par les pics sur le chromatogramme. Ce problème n'est pas observé lorsque les sidérophore sont resuspendus dans du H_2O. La solution de 10 ml de sidérophores est par la suite filtrée sur membrane PTFE de 0,2 µm pour éliminer la matrice résiduelle. Afin de récupérer le plus de malléobactine possible, un 10 ml d'H_2O supplémentaire a été filtré pour laver la membrane PTFE de 0,2 µm (Figure 43). La solution finale de sidérophores était de couleur jaune.

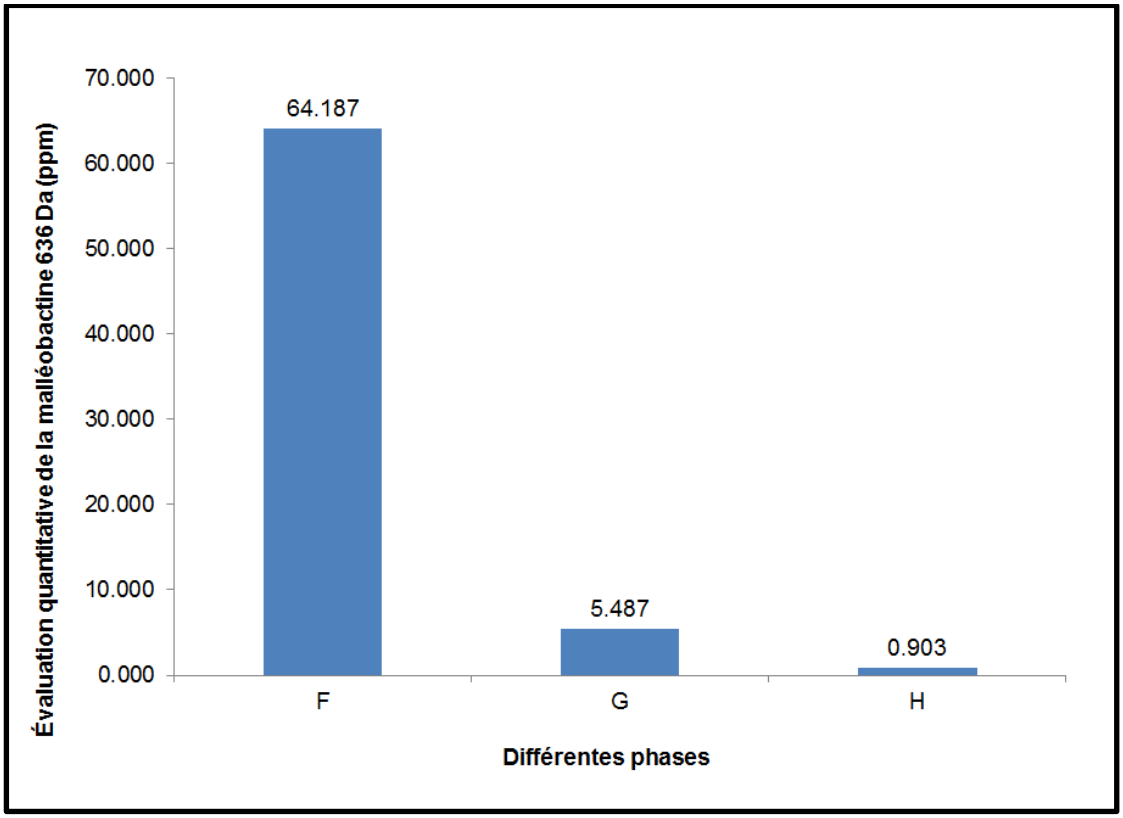


Figure 43. Évaluation quantitative de la malléobactine de 636 Da lors des étapes d'extraction avec la résine Amberlite XAD-4 (partie 2).

F) Resuspension des sidérophores dans 10 ml d'H_2O. G) 10 ml d'H_2O filtré dans la membrane de PTFE de 0.2 µm suite à la filtration de la solution de sidérophores. H) 10 ml de méthanol filtré dans la membrane de PTFE de 0.2 µm suite à la filtration du H_2O. La quantification a été calculée par rapport au standard interne HHQ-D4 ajouté à une concentration de 5 mg / L.

Durant L'extraction des sidérophores, nous avons été en mesure d'extraire un équivalent de 2 g d'une mixture contenant des sidérophores et provenant d'une quantité de 10 L de surnageant avec la méthode des résines Amberlite XAD-4. Suite à cette étape d'extraction, nous avons procédé à une purification de chaque congénère de la malléobactine par CLHP préparatif. Seul les molécules de 605 Da et 636 Da ont pu être isolées et purifiées. Lors de l'isolement de la molécule de 605 Da, on a remarqué la présence d'une molécule de 464 Da. La même observation est faite pour la molécule de 636 Da. En effet, nous remarquons que cette dernière est souvent accompagnée d'une molécule de 534 Da. On suspecte ces molécules d'être des précurseurs de la malléobactine. Il est également à noter que la molécule de 464 Da est également présente, à forte abondance, lors de la fragmentation de l'ornibactine-C6 et de l'ornibactine-C8. Il pourrait s'agir d'un précurseur commun aux deux sidérophores.

2.5.4.5. Détermination de la structure de la malléobactine

Seules les molécules de 636 Da et 605 Da ont été purifiées et analysées par résonance magnétique nucléaire (RMN) au Québec/*Eastern Canada High Field NMR Facility* (McGill University). Malheureusement, les spectres d'analyses RMN n'ont pas montrés des résultats très concluants concernant la structure de ces deux molécules. Cependant, à l'aide des techniques de spectrométrie de masses, des résultats obtenus par RMN ainsi que des données de la littérature, nous avons été en mesure d'émettre des prédictions de ce que pourraient ressembler les congénères de la malléobactine dont les masses moléculaires sont de 636 Da, 605 Da, 620 Da ainsi que leurs précurseurs dont les masses sont de 464 Da, 534 Da et 622 Da (Figure 44).

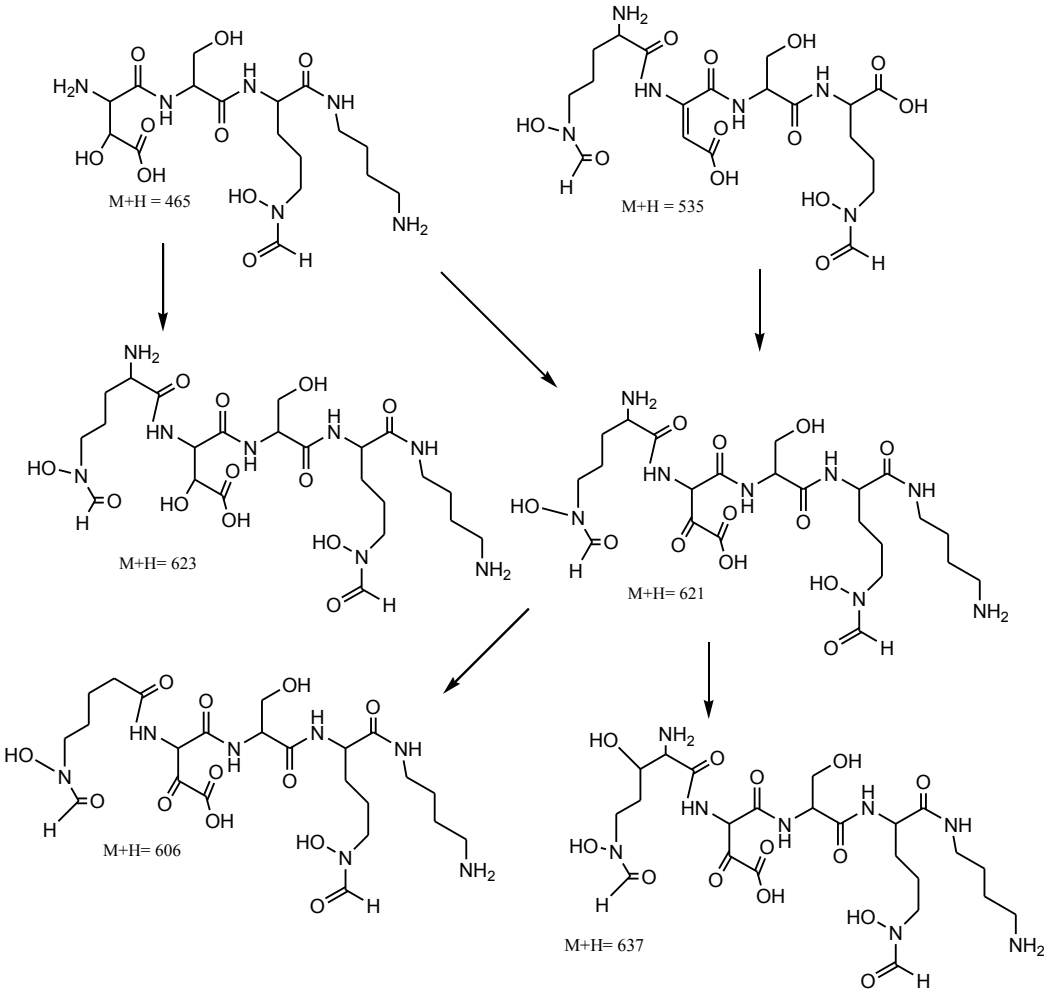


Figure 44. Évaluation structurelle des congénères de la malléobactine et de leur précurseurs.

Travaux effectués par le Pr. François Lépine.

2.6. Discussion

Afin de mieux comprendre la pathogénicité de *B. pseudomallei*, une étude de ses mécanismes d'acquisition du fer a été entreprise. Plus précisément, il a été question, dans ce document, d'étudier les sidérophores produits par cette bactérie en utilisant *B. thailandensis* comme modèle alternatif. Selon la littérature, il est déjà connu que *B. pseudomallei* produit de la pyochéline ainsi qu'un autre sidérophore nommé la malléobactine. Cependant, la composition chimique et la structure de cette dernière restaient inconnues.

Tout d'abord nous avons mis en évidence que la souche *B. thailandensis* E264 produit bel et bien des sidérophores en cultivant cette dernière ainsi que le mutant surproducteur dépourvu de AHLs, *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3*, sur un milieu gélosé CAS. Le milieu initialement bleu a viré à l'orange révélant la sécrétion de sidérophores diffusant autour des colonies. Le mutant du QS a démontré une formation d'un halo orangé beaucoup plus importante que la souche sauvage. Ceci indique déjà qu'il existe en effet une corrélation entre la production de sidérophores et le QS chez cette bactérie et que ce système semble réguler négativement leur production.

Avec cette certitude que *B. thailandensis* produit des sidérophores, nous avons tout d'abord voulu confirmer que la bactérie produisait de la pyochéline en effectuant des tests avec les bactéries *P. aeruginosa* PA14 et *B. cepacia* ATCC 25146 qui sont connues pour produire ce sidérophore. Grâce au CLHP-SM en tandem, la fragmentation de l'ion pseudomoléculaire précurseur de la pyochéline nous a permis d'établir un spectre de fragmentation de ce sidérophore. Les ions « filles » les plus importants résultants de cette fragmentation sont les ions : *m/z* 118, *m/z* 178, *m/z* 189, *m/z* 222 et *m/z* 245. L'ion *m/z* 222 étant le dominant, il a été utilisé pour faire la transition à partir de l'ion précurseur en mode MRM. Avec cette technique, nous avons été en mesure de confirmer la présence, et même de quantifier la pyochéline chez *B. thailandensis* ainsi que chez le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3.* La quantification a été calculée relativement par rapport à un standard interne, le HHQ-D4 qui a été ajouté à une concentration précise dans chaque échantillon à être analysé. Les résultats de cette expérience nous ont montré que *B. thailandensis* produit bel et bien de la pyochéline, mais que cette dernière n'est pas produite en grande quantité dans nos conditions expérimentales.

La mise en évidence de la production de la malléobactine chez *B. thailandensis* a été plus complexe. Dans l'article de Alice *et al.* 2006, on rapporte chez *B. pseudomallei*

des molécules ayant des masses de 790, 762 et 636 Da attribuées à la malléobactine. Tout d'abord, nous n'avons pas été en mesure d'observer la molécule de 636 Da dans les conditions expérimentales de l'article chez la bactérie *B. thailandensis*. Également, nos études nous montrent que les molécules de 762 et 790 Da sont en fait des molécules de rhamnolipides et plus précisément du Rha-Rha-C_{14}-C_{14} and Rha-Rha-C_{14}-C_{16} respectivement (Dubeau *et al.*, 2009). Sachant, que *B. thailandensis* possède les gènes homologues de la biosynthèse de la malléobactine identifiés chez *B. pseudomallei,* nous avons envisagé de faire un criblage sur la bactérie par mutagénèse aléatoire par insertion d'un transposon afin d'identifier des gènes impliqués, directement ou non, dans la production de la malléobactine. De plus, ce criblage allait permettre d'identifier des mutants potentiellement utiles pour les étapes subséquentes. Deux criblages ont été effectués, l'un sur la souche sauvage *B. thailandensis* E264 afin d'identifier des sur-producteurs de sidérophores et l'autre sur le mutant *E264Δbtal1Δbtal2Δbtal3* afin d'identifier des sous-producteurs de sidérophores. Le criblage nous a permis d'identifier des gènes bien intéressants tels les gènes BTH_I2417 (*mbaI*), BTH_I2418 (*mbaJ*) et BTH_I2427 (*mbaS)* qui sont vraisemblablement directement reliés à la synthèse de la malléobactine. Une mutation dans ces gènes a créé une réduction dans la production de sidérophores, tel que vu sur milieu CAS. En parallèle, nous avons également été en mesure d'identifier des gènes reliés à l'assimilation du sidérophore tels BTH_I2423 (*mbaD*), BTH_I2424 (*mbaC*) et BTH_I2427 (*mbaF*). Il s'agit de gènes qui ont un effet indirect sur l'activation de la production de la malléobactine. Une mutation dans ces gènes résulte donc en une surproduction du sidérophore. L'évaluation de la formation de halo sur géloses CAS des mutants comparativement à la souche sauvage *B. thailandensis* E264 montrent que la malléobactine est le principal sidérophore produits chez cette bactérie.

Avec la confirmation que la malléobactine est bien produite chez *B. thailandensis* et que ce dernier est le sidérophore principalement produit, nous avons procédé à l'identification de ce sidérophore. Une comparaison des surnageants du mutant sous-producteur, *AhlΔmbaS*, de la souche sauvage *B. thailandensis* E264 et du sur-producteur *AhlΔmbaF* au CLHP-SM a montré la présence de molécules intéressantes dont les masses moléculaires sont les suivantes 605 Da, 612 Da, 620 Da, ainsi que la molécule de 636 Da décrite dans l'article de Alice *et al.* 2006.

Ne sachant pas si ces molécules étaient reliées entre elles, nous avons effectué une fragmentation de chaque ion pseudomoléculaire de ces composés d'intérêts. Les

spectres de fragmentation présentent des ions « filles » communs entre les quatre molécules. Ceci montre que les molécules sont effectivement des congénères.

Pour la suite des choses, nous avons voulu démontrer que ces molécules possédaient effectivement un pouvoir de chélation. Nous avons préparé deux solutions indépendantes de fer (III) et de gallium (III) et nous les avons mélangés à des échantillons de surnageant du mutants *AhlΔmbaF.* Les résultats ont montré que les quatre molécules sont en mesure de chélater autant le fer que le gallium tout comme l'ornibactine, un sidérophore produit par les BCC (H. Stephan *et al.*, 1993a, Holger Stephan *et al.*, 1993b).

En parlant de ce dernier, il a été proposé que la malléobactine et l'ornibactine seraient similaires en raison de la grande similarité entre leurs gènes de biosynthèse. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des tests sur un des congénères de l'ornibactine, c'est-à-dire l'ornibactine-C6. Nous avons utilisé une solution d'ornibactine-C6 pure procurée de la compagnie « EMC microcollections GmbH » (Allemagne) ainsi qu'un surnageant de *B. cepacia* ATCC 25416 qui est connue pour produire ce sidérophore également. Encore une fois, en utilisant la CLHP-SM en tandem, nous avons effectué une fragmentation de l'ion pseudomoléculaire de l'ornibactine-C6 pour chaque échantillon. Les spectres de fragmentations montrent une particulière abondance des ions « filles » *m/z* 247, *m/z* 334 et *m/z* 465. En comparant ces spectres aux spectres de nos quatre molécules d'intérêts, nous remarquons qu'il y a deux de ces trois ions qui sont en communs. Avec le fait que nos quatre molécules d'intérêts ne possèdent pas du toutes les mêmes masses moléculaires que les congénères de l'ornibactine et que ces derniers ne montrent pas un patron de masses identiques au CLHP-SM, nous pouvons confirmer que *B. thailandensis* produit un sidérophore nommé la malléobactine et que ce dernier possède une structure similaire à l'ornibactine.

Avec la certitude que *B. thailandensis* produit bel et bien de la malléobactine, nous avons mis de l'avant des expériences d'isolement et de purification du sidérophore afin de le caractériser structurellement. Le mutant *AhlΔmbaF* a été utilisé pour faire les expériences puisqu'il s'agit d'un surproduction spécifique de la malléobactine. Le milieu pauvre en fer MM9 a été supplémenté avec de la L-ornithine et de la L-sérine pour augmenter la production du sidérophore en question. La technique d'isolement de la malléobactine a été d'utilisé la résine Amberlite XAD-4 (Sigma). À partir d'un volume de 10 L de surnageant, nous avons été en mesure de récupérer une mixture d'environ 2 g contenant des sidérophores. La purification de la malléobactine s'est effectuée par CLHP préparatif. Il a fallu effectuer de nombreux cycles d'injections afin

de parvenir à séparer les molécules ciblées. Cette méthode a comme conséquence une grande perte de matériels. Seules les molécules de 605 Da et de 636 Da ont pu être purifiées suffisamment. Les analyses RMN et CLHP-SM à haute performance nous on permit d'élaborer des croquis des molécules de la malléobactine ainsi que de quelques précurseurs du sidérophore en question.

2.7. Conclusion

Malheureusement, tout récemment, la structure de la malléobactine a été élucidée par le groupe de Christian Hertweck (Franke *et al.*, 2013). Les chercheurs confirment que la malléobactine est constituée d'un groupe de molécules, tout comme l'ornibactine. Ceux-ci affirment que la molécule principale est la malléobactine A qui est en fait la molécule de 636 Da étudiée dans ce mémoire. La malléobactine A est constituée de l'association d'une putrescine, d'un *N*-hydroxy-*N*-formylornithine, d'une L-serine, d'un acide *D-threo*-β-hydroxyaspartique et d'un acide α-formylé L-ANPA (acide 2-amino-5-nitropentanoique). Ce dernier est retrouvé en N-terminal au lieu d'un résidu *N*-hydroxy-*N*-acylornithine comme observé chez l'ornibactine (voir Figure 45). L'acide α-formylé L-ANPA a seulement été connu jusqu'à ce jour comme étant un composé synthétique. C'est la première fois qu'on rapporte un tel composé comme produit naturel. La structure des congénères de la malléobactine A, dont font partie nos molécules de 620 Da et 612 Da, a également été élucidée durant ces travaux. De plus, ces chercheurs ont identifié et renommé tous les gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la malléobactine (Figure 46). Notre quête pour l'élucidation structurelle de la malléobactine a donc pris fin avec les résultats très concluants de Franke *et al* (2013). Nous pouvons cependant confirmer que nous étions très près du but puisque nous avons été en mesure d'identifier les molécules de la malléobactine que rapporte le groupe de Christian Hertweck dans leur article. Néanmoins, malgré les évidences que *B. thailandensis* et *B. pseudomallei* produisent les mêmes sidérophores, il reste à prouver officiellement ce fait en élucidant par exemple la structure des sidérophores produits chez *B. pseudomallei* et les comparer à ceux décrits chez *B. thailandensis*.

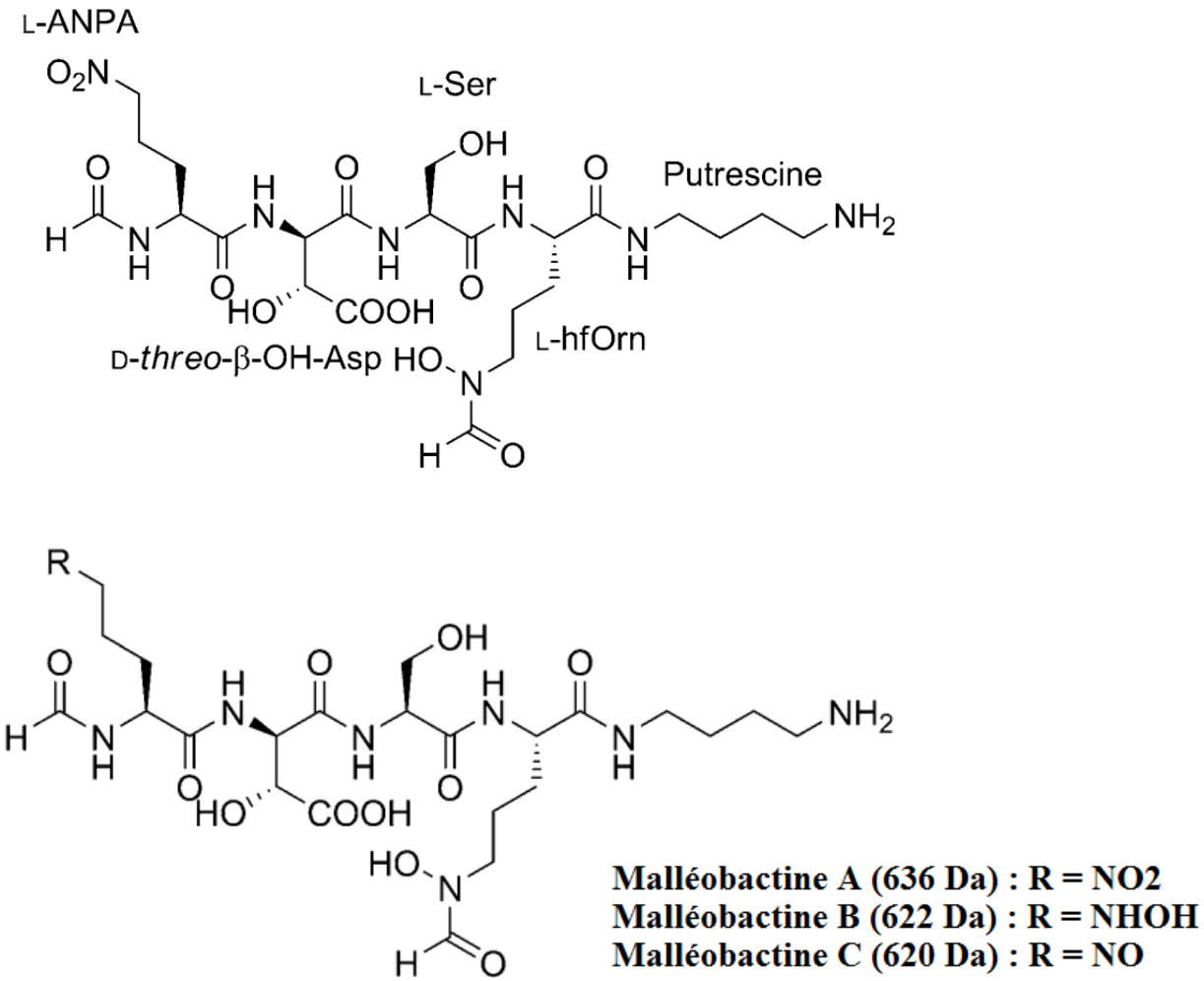
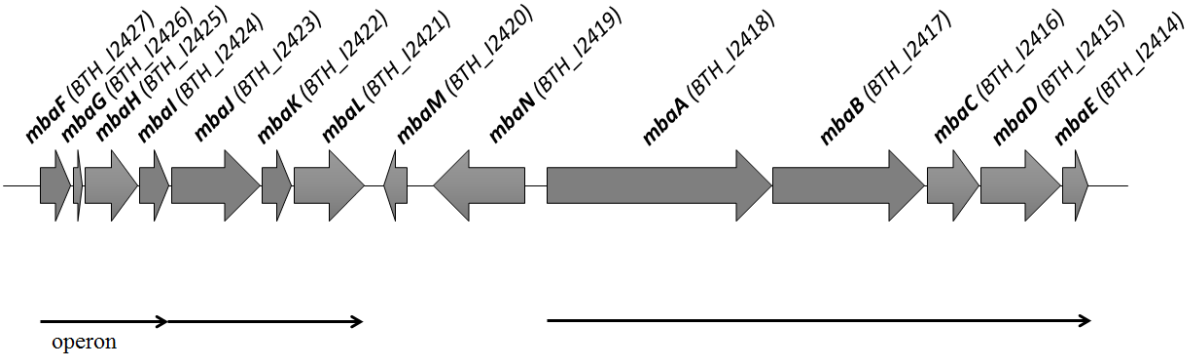


Figure 45. Représentation structurelle de la malléobactine et ses dérivés. Image adapté de Franke *et al.* (Franke *et al.*, 2013)

Organisation structurale des gènes *mba* de *Burkholderia thailandensis* E264.



Gène	nom	Chromosome	Intervalle	Brin	fonctions
BTH_I2427	*mbaF*	I	2777917 - 2778630	brin négatif	« extracytoplasmic-function sigma-70 factor »
BTH_I2426	*mbaG*	I	2777613 - 2777861	brin négatif	« mbtH-like protein »
BTH_I2425	*mbaH*	I	2776541 - 2777632	brin négatif	« syringomycin biosynthesis enzyme »
BTH_I2424	*mbaI*	I	2775609 - 2776517	brin négatif	« iron compound ABC transporter ATP-binding protein »
BTH_I2423	*mbaJ*	I	2773492 - 2775471	brin négatif	« iron-hydroxamate transporter permease subunit »
BTH_I2422	*mbaK*	I	2772701 - 2773495	brin négatif	« ferric iron reductase protein FhuF »
BTH_I2421	*mbaL*	I	2771511 - 2772770	brin négatif	« iron compound ABC transporter periplasmic iron-compound-binding protein »
BTH_I2420	*mbaM*	I	2770766 - 2771341	brin positif	« hypothetical protein »
BTH_I2419	*mbaN*	I	2768600 - 2770288	brin positif	« cyclic peptide ABC transporter ATP-binding protein »
BTH_I2418	*mbaA*	I	2758217 - 2768107	brin négatif	« peptide synthetase-like protein »
BTH_I2417	*mbaB*	I	2752877 - 2758195	brin négatif	« non-ribosomal peptide synthetase »
BTH_I2416	*mbaC*	I	2751297 - 2752811	brin négatif	« l-ornithine 5-monooxygenase »
BTH_I2415	*mbaD*	I	2749034 - 2751250	brin négatif	« TonB-dependent siderophore receptor »
BTH_I2414	*mbaE*	I	2748130 - 2748873	brin négatif	« hypothetical protein »

Figure 46. Gènes de la biosynthèse de la mallébactine selon (Franke *et al.*, 2013)

Ceci dit, puisque la structure de la malléobactine a été élucidée, il serait intéressant de diriger l'intérêt vers le lien existant entre le QS et la production de ce sidérophore. Sachant qu'en général le QS de *B. thailandensis* régule négativement la production de sidérophores, il serait intéressant de déterminer lequel ou lesquels des trois systèmes (LuxIR-1, LuxIR-2 et LuxIR-3) régule(ent) véritablement ou du moins possède le plus fort impact sur la production des sidérophores.

De plus, lors du criblage, les gènes *hmqC* et *hmqG*, impliqués dans le système des HMAQs, ont été identifiés. Des études sur l'opéron HMAQ chez *B. ambifaria* AMMD ont montrées qu'une mutation polaire sur le gène *hmqA* et sur le gène *hmqG* de l'opéron *hmqABCDEFG* augmente la production de sidérophores (Vial *et al.*, 2008). Cette information concorde avec les résultats du criblage effectué durant cette étude. En effet, une surproduction est observée chez un mutant possédant une mutation sur le gène *BTH_II1929* (*hmqG*) lorsque comparé à *B. thailandensis* E264. Puisque plusieurs gènes du système des HMAQs ont été identifiés lors du criblage, avec un

intérêt particulier sur le gène *BTH_I1403*, il serait également intéressant d'étudier la corrélation entre ce système et la production de sidérophores.

Références

Agnoli K, Lowe CA, Farmer KL, Husnain SI & Thomas MS (2006) The ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function sigma factor which is a part of the Fur regulon. *Journal of bacteriology* 188(10):3631-3644.

Alice AF, Lopez CS, Lowe CA, Ledesma MA & Crosa JH (2006) Genetic and transcriptional analysis of the siderophore malleobactin biosynthesis and transport genes in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* K96243. in *Journal of bacteriology*), p 1551-1566.

Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews* 27(2-3):215-237.

Ankenbauer RG, Toyokuni T, Staley A, Rinehart KL, Jr. & Cox CD (1988) Synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 170(11):5344-5351.

Bassler BL (2004) Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse. *Harvey lectures* 100:123-142.

Boukhalfa H & Crumbliss AL (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 15(4):325-339.

Brandel J, Humbert N, Elhabiri M, Schalk IJ, Mislin GL & Albrecht-Gary AM (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton transactions* 41(9):2820-2834.

Braun V (1997) Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biological chemistry* 378(8):779-786.

Braun V & Killmann H (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in biochemical sciences* 24(3):104-109.

Brett PJ, Deshazer D & Woods DE (1997) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains. *Epidemiol Infect* 118(2):137-148.

Brett PJ, DeShazer D & Woods DE (1998) *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 1:317-320.

Brook MD, Currie B & Desmarchelier PM (1997) Isolation and identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil using selective culture techniques and the polymerase chain reaction. *Journal of applied microbiology* 82(5):589-596.

Burkholder WH (1950) *Sour Skin, a Bacterial Rot of Onion Bulbs.* http://books.google.ca/books?id=Pwy3mgEACAAJ

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL & Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation research* 424(1-2):9-21.

Carniel E (1999) The *Yersinia* high-pathogenicity island. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2(3):161-167.

Caza M & Kronstad JW (2013) Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3:80.

Chan YY & Chua KL (2005) The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. in *Journal of bacteriology*), p 4707-4719.

Chandler JR, Duerkop BA, Hinz A, West TE, Herman JP, Churchill ME, Skerrett SJ & Greenberg EP (2009) Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *Journal of bacteriology* 191(19):5901-5909.

Chen SX & Schopfer P (1999) Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European journal of biochemistry / FEBS* 260(3):726-735.

Cheng AC & Currie BJ (2005) Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical microbiology reviews* 18(2):383-416.

Coenye T & Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental microbiology* 5(9):719-729.

Coenye T, Vandamme P, Govan JRW & Lipuma JJ (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia complex*. *J Clin Microbiol* 39(10):3427-3436.

Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology* 86(6):1637-1645.

Crosa JH & Walsh CT (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(2):223-249.

Crowley DE, Reid CP & Szaniszlo PJ (1988) Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant physiology* 87(3):680-685.

Dance DA (1991) Melioidosis: the tip of the iceberg? *Clinical microbiology reviews* 4(1):52-60.

De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y & Barry CE, 3rd (2000) The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3):1252-1257.

Duan YP, Sun X, Zhou LJ, Gabriel DW, Benyon LS & Gottwald T (2009) Bacterial Brown Leaf Spot of Citrus, a New Disease Caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant Dis* 93(6):607-614.

Dubeau D, Deziel E, Woods DE & Lepine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC microbiology* 9:263.

Duerkop BA, Ulrich RL & Greenberg EP (2007) Octanoyl-homoserine lactone is the cognate signal for *Burkholderia mallei* BmaR1-BmaI1 quorum sensing. *Journal of bacteriology* 189(14):5034-5040.

Duerkop BA, Varga J, Chandler JR, Peterson SB, Herman JP, Churchill ME, Parsek MR, Nierman WC & Greenberg EP (2009) Quorum-sensing control of antibiotic synthesis in *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology* 191(12):3909-3918.

Faraldo-Gomez JD & Sansom MS (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(2):105-116.

Franke J, Ishida K, Ishida-Ito M & Hertweck C (2013) Nitro versus Hydroxamate in Siderophores of Pathogenic Bacteria: Effect of Missing Hydroxylamine Protection in Malleobactin Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 10.1002/anie.201303196:n/a-n/a.

Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269-275.

Gamage AM, Shui G, Wenk MR & Chua KL (2011) N-Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI-BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* 157(Pt 4):1176-1186.

Gotschlich A, Huber B, Geisenberger O, Tögl A, Steidle A, Riedel K, Hill P, Tümmler B, Vandamme P & Middleton B (2001) Synthesis of Multiple N-Acylhomoserine Lactones is Wide-spread Among the Members of the *Burkholderia cepacia Complex*. *Systematic and applied microbiology* 24(1):1-14.

Halliwell B & Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 219(1):1-14.

Haraga A, West TE, Brittnacher MJ, Skerrett SJ & Miller SI (2008) *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 76(11):5402-5411.

Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenthner D, Bovee D, Olson MV & Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24):14339-14344.

Kang HY, Dozois CM, Tinge SA, Lee TH & Curtiss III R (2002) Transduction-mediated transfer of unmarked deletion and point mutations through use of counterselectable suicide vectors. *Journal of bacteriology* 184(1):307-312.

Kawanishi T, Uematsu S, Nishimura K, Otani T, Tanaka-Miwa C, Hamamoto H & Namba S (2009) A new selective medium for *Burkholderia caryophylli,* the causal agent of carnation bacterial wilt. *Plant Pathol* 58(2):237-242.

Konetschny-Rapp S, Jung G, Meiwes J & Zahner H (1990) Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from *Staphylococci*. *European journal of biochemistry / FEBS* 191(1):65-74.

Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI & Vasil ML (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonasaeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10):7072-7077.

Leelarasamee A & Bovornkitti S (1989) Melioidosis - Review and Update. *Reviews of infectious diseases* 11(3):413-425.

Lepine F, Deziel E, Milot S & Rahme LG (2003) A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochim Biophys Acta* 1622(1):36-41.

Lewenza S, Conway B, Greenberg EP & Sokol PA (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *Journal of bacteriology* 181(3):748-756.

Lutter E, Lewenza S, Dennis J, Visser M & Sokol P (2001) Distribution of quorum-sensing genes in the *Burkholderia cepacia complex*. *Infection and immunity* 69(7):4661-4666.

Majerczyk C, Brittnacher M, Jacobs M, Armour CD, Radey M, Schneider E, Phattarasokul S, Bunt R & Greenberg EP (2014) Global Analysis of the *Burkholderia thailandensis* Quorum Sensing-Controlled Regulon. *Journal of bacteriology* 196(7):1412-1424.

McKenney D, Brown KE & Allison DG (1995) Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia*: evidence of interspecies communication. *Journal of bacteriology* 177(23):6989-6992.

Meyer JM, Van VT, Stintzi A, Berge O & Winkelmann G (1995) Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 8(4):309-317.

Michel L, Bachelard A & Reimmann C (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153(5):1508-1518.

Miethke M & Marahiel MA (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 71(3):413-451.

Miller MB & Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* 55:165-199.

Moore RA, Reckseidler-Zenteno S, Kim H, Nierman W, Yu Y, Tuanyok A, Warawa J, DeShazer D & Woods DE (2004) Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Infection and immunity* 72(7):4172-4187.

Moulin L, Munive A, Dreyfus B & Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411(6840):948-950.

Munzinger M, Budzikiewicz H, Expert D, Enard C & Meyer JM (2000) Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 55(5-6):328-332.

Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of biological chemistry* 270(45):26723-26726.

Ong C, Ooi CH, Wang D, Chong H, Ng KC, Rodrigues F, Lee MA & Tan P (2004) Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species. *Genome research* 14(11):2295-2307.

Palleroni NJ & Holmes B (1981) *Pseudomonas Cepacia* Sp-Nov, Nom-Rev. *International journal of systematic bacteriology* 31(4):479-481.

Payne SM & Finkelstein RA (1978) The critical role of iron in host-bacterial interactions. *The Journal of clinical investigation* 61(6):1428-1440.

Persmark M, Expert D & Neilands J (1989) Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry* 264(6):3187-3193.

Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.

Ratledge C & Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* 54:881-941.

Raymond KN, Dertz EA & Kim SS (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):3584-3588.

Raymond KN, Müller G & Matzanke BF (1984) Complexation of iron by siderophores - A review of their solution and structural chemistry and biological function. *Topics in Current Chemistry* 123: 49-102.

Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM & Hughes JM (2002) Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 8(2):225-230.

Ruby EG & McFall-Ngai MJ (1999) Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol* 7(10):414-420.

Sayyed RZ & Chincholkar SB (2006) Purification of siderophores of *Alcaligenes faecalis* on Amberlite XAD. *Bioresource technology* 97(8):1026-1029.

Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160(1):47-56. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2952030

Smith MD, Angus BJ, Wuthiekanun V & White NJ (1997) Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 65(10):4319-4321.

Song Y, Xie C, Ong YM, Gan YH & Chua KL (2005) The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia pseudomallei*. in *Journal of bacteriology*), p 785-790.

Sousa SA, Ramos CG & Leitao JH (2011) *Burkholderia cepacia Complex*: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. *International journal of microbiology* 2011.

Stephan H, Freund S, Beck W, Jung G, Meyer JM & Winkelmann G (1993a) Ornibactins--a new family of siderophores from *Pseudomonas*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 6(2):93-100.

Stephan H, Freund S, Meyer JM, Winkelmann G & Jung G (1993b) Structure Elucidation of the Gallium–Ornibactin Complex by 2D-NMR Spectroscopy. *Liebigs Annalen der Chemie* 1993(1):43-48.

Stoyanova M, Pavlina I, Moncheva P & Bogatzevska N (2007) Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. *Biotechnol Biotec Eq* 21(3):306-310.

Thomas MS (2007) Iron acquisition mechanisms of the *Burkholderia cepacia complex*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 20(3-4):431-452.

Ulrich RL, Deshazer D, Brueggemann EE, Hines HB, Oyston PC & Jeddeloh JA (2004) Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of medical microbiology* 53(Pt 11):1053-1064.

Vandamme P, Goris J, Chen W-M, de Vos P & Willems A (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Systematic and applied microbiology* 25(4):507-512.

Vial L, Chapalain A, Groleau MC & Deziel E (2011) The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia complex* species: a tribute to adaptation. *Environmental microbiology* 13(1):1-12.

Vial L, Lepine F, Milot S, Groleau MC, Dekimpe V, Woods DE & Deziel E (2008) *Burkholderia pseudomallei, B. thailandensis,* and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of bacteriology* 190(15):5339-5352.

Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP & Pesci EC (2005) Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 187(13):4372-4380.

Wandersman C & Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology* 58:611-647.

Ward PP, Uribe-Luna S & Conneely OM (2002) Lactoferrin and host defense. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 80(1):95-102.

Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-346.

Wensing A, Braun SD, Büttner P, Expert D, Völksch B, Ullrich MS & Weingart H (2010) Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae pv. syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae pv. glycinea* 1a/96. *Appl Environ Microb* 76(9):2704-2711.

Whitehead NA, Byers JT, Commander P, Corbett MJ, Coulthurst SJ, Everson L, Harris AK, Pemberton CL, Simpson NJ, Slater H, Smith DS, Welch M, Williamson N & Salmond GP (2002) The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4):223-231.

Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153(12):3923-3938.

Winkelmann G (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions* 30(4):691-696.

Woods DE & Sokol PA (2006) The genus *Burkholderia*. *The Prokaryotes*:848-860.

Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DA, Walsh AL, Pitt TL & White NJ (1996) Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of medical microbiology* 45(6):408-412.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T & Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology* 36(12):1251-1275.

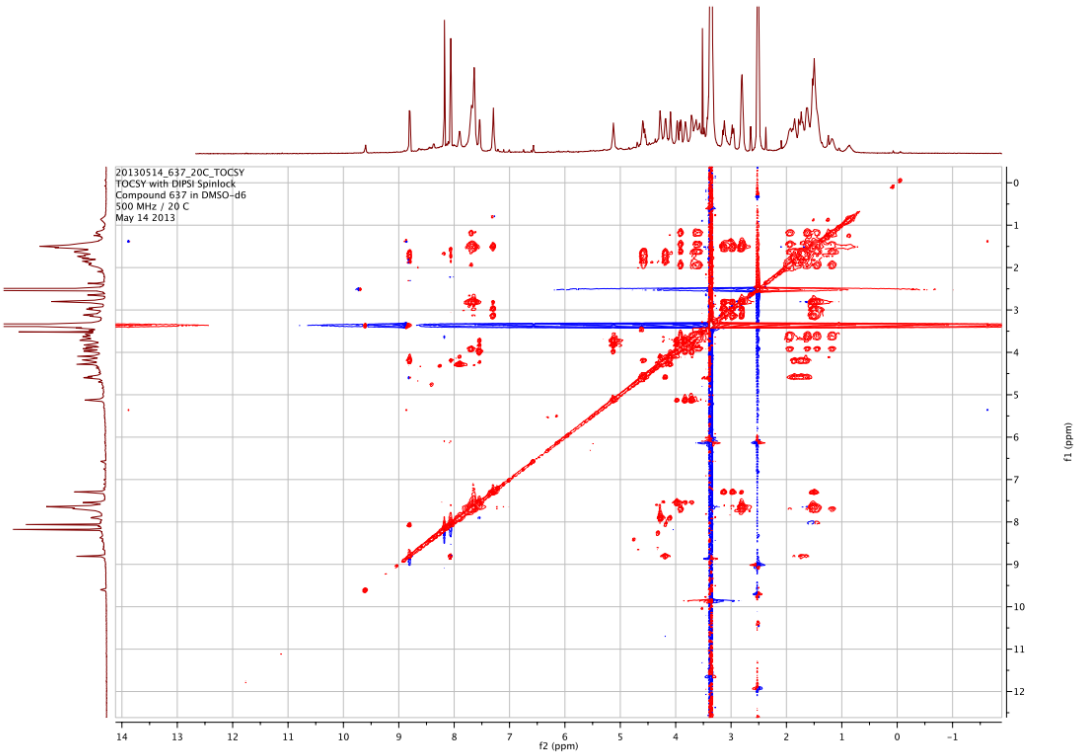
Yang H, Kooi CD & Sokol PA (1993) Ability of *Pseudomonas pseudomallei* malleobactin to acquire transferrin-bound, lactoferrin-bound, and cell-derived iron. *Infection and immunity* 61(2):656-662.

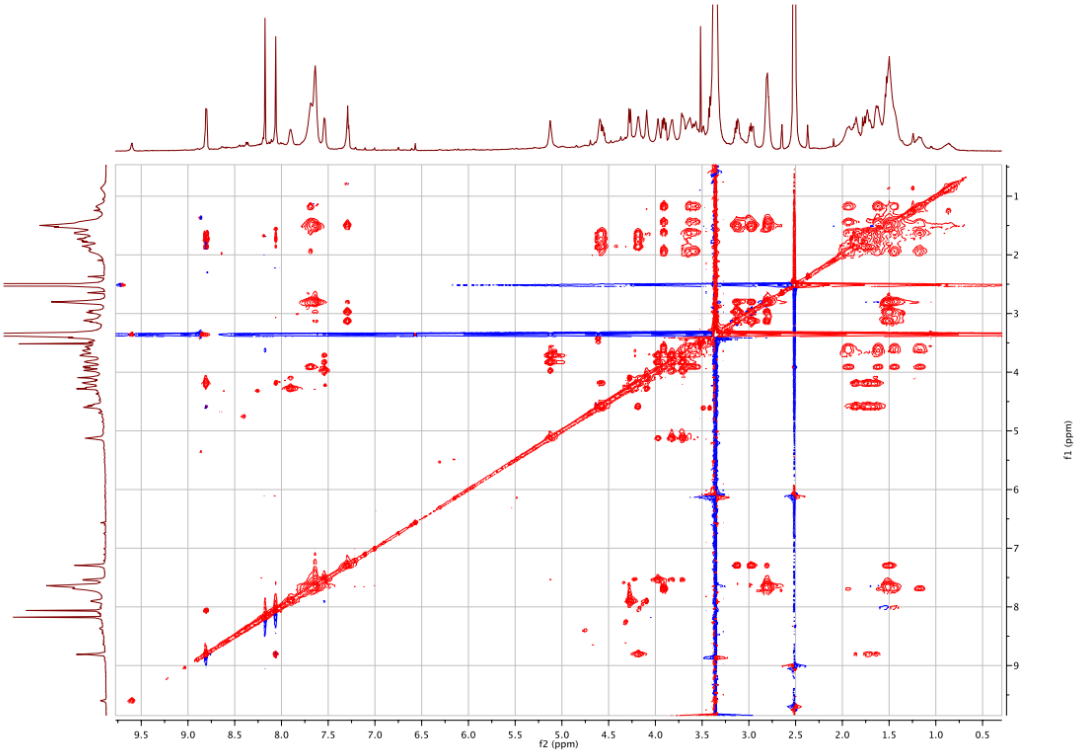
Yang HM, Chaowagul W & Sokol PA (1991) Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. *Infection and immunity* 59(3):776-780.

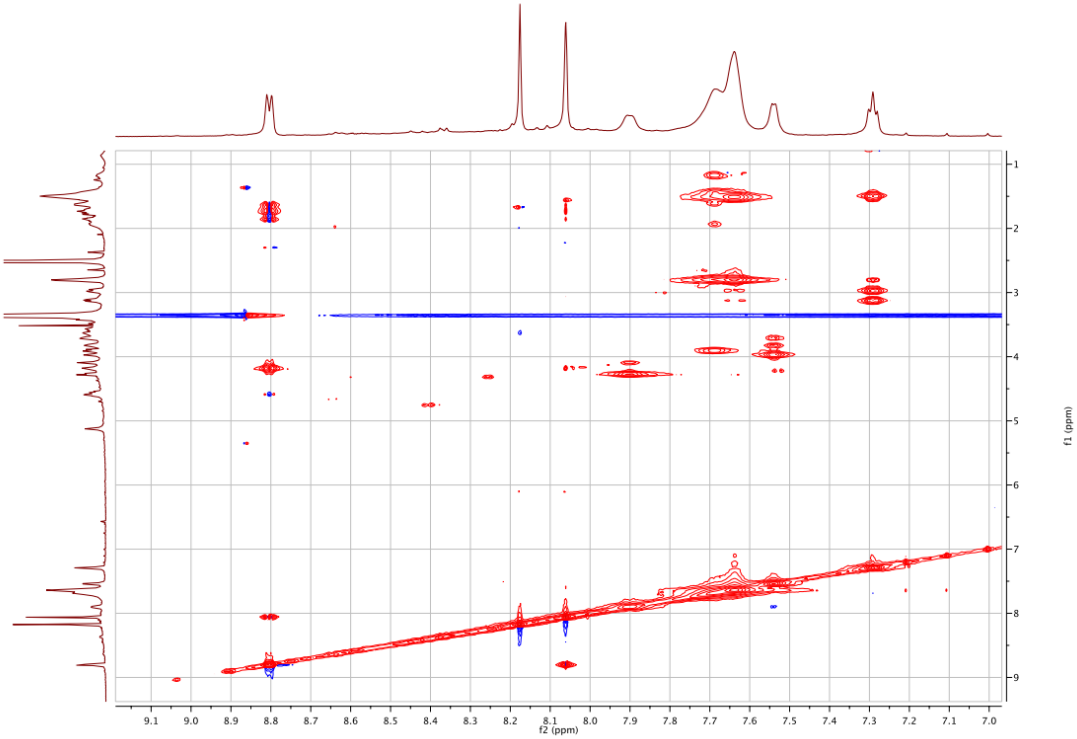
Zajdowicz S, Haller JC, Krafft AE, Hunsucker SW, Mant CT, Duncan MW, Hodges RS, Jones DN & Holmes RK (2012) Purification and structural characterization of siderophore (corynebactin) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Plos One* 7(4):e34591.

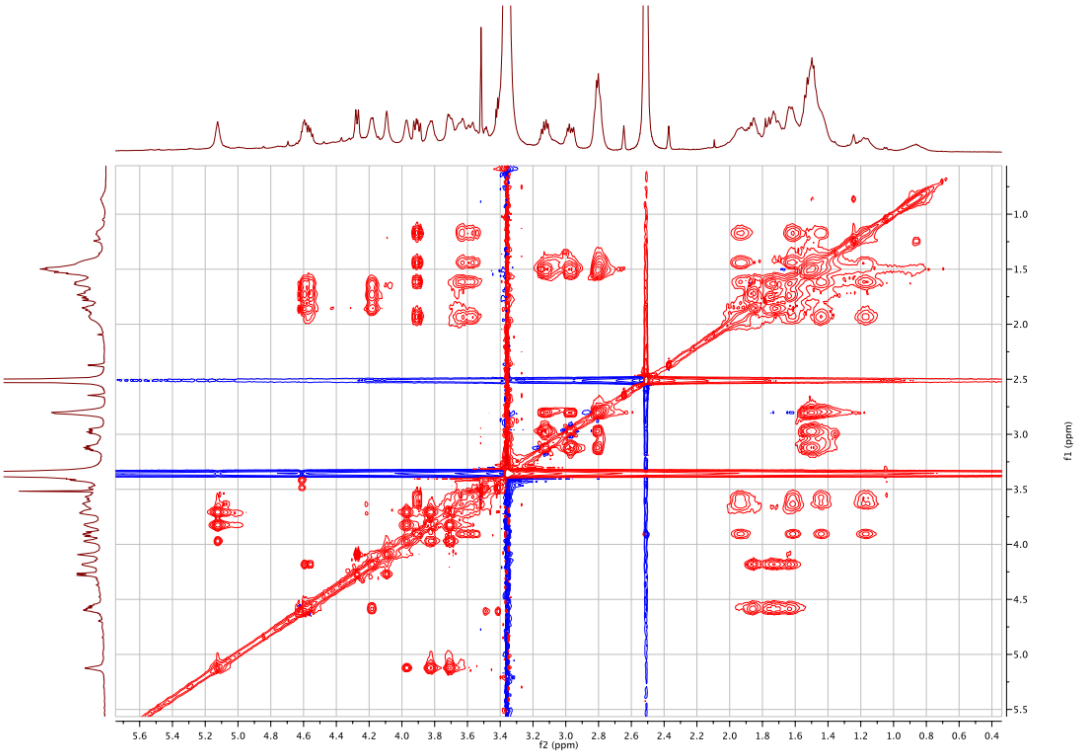
Appendice

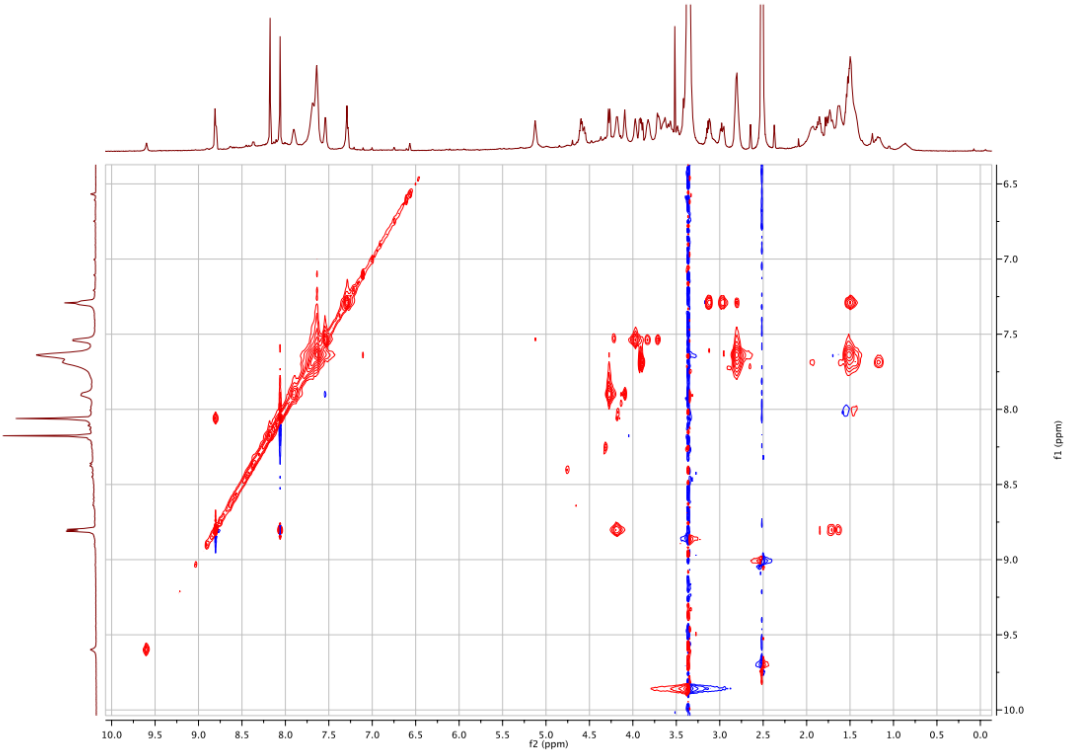
TOCSY de la molécule de 636 Da



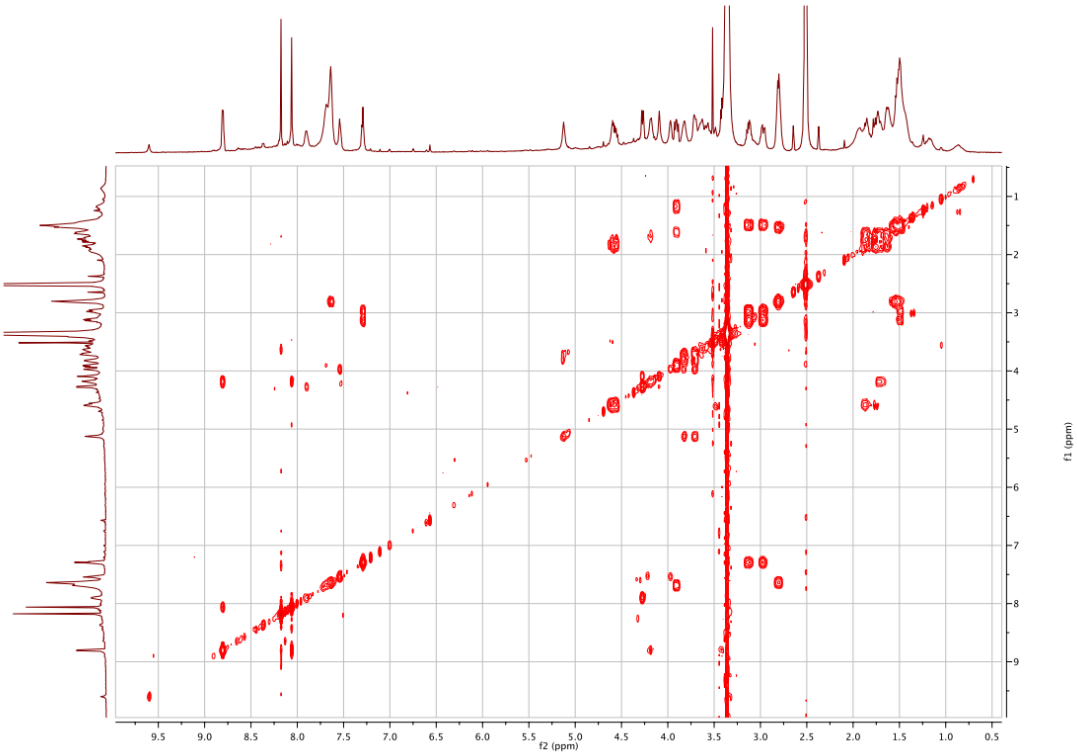


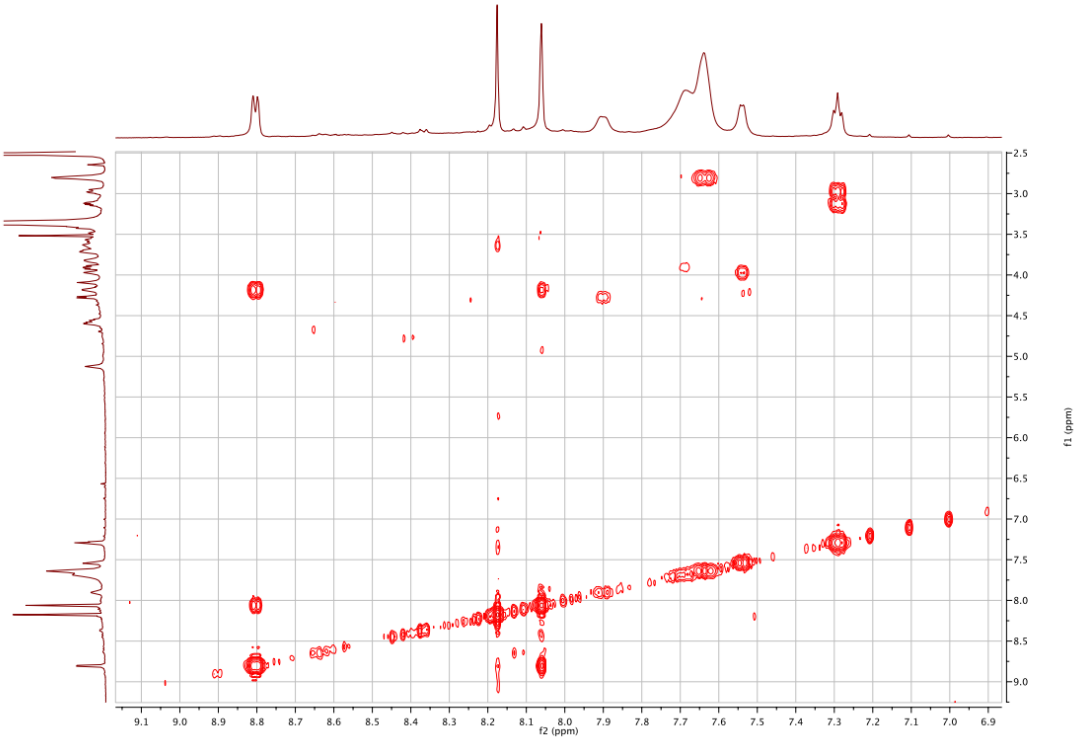

f2 (ppm)
f1 (ppm)

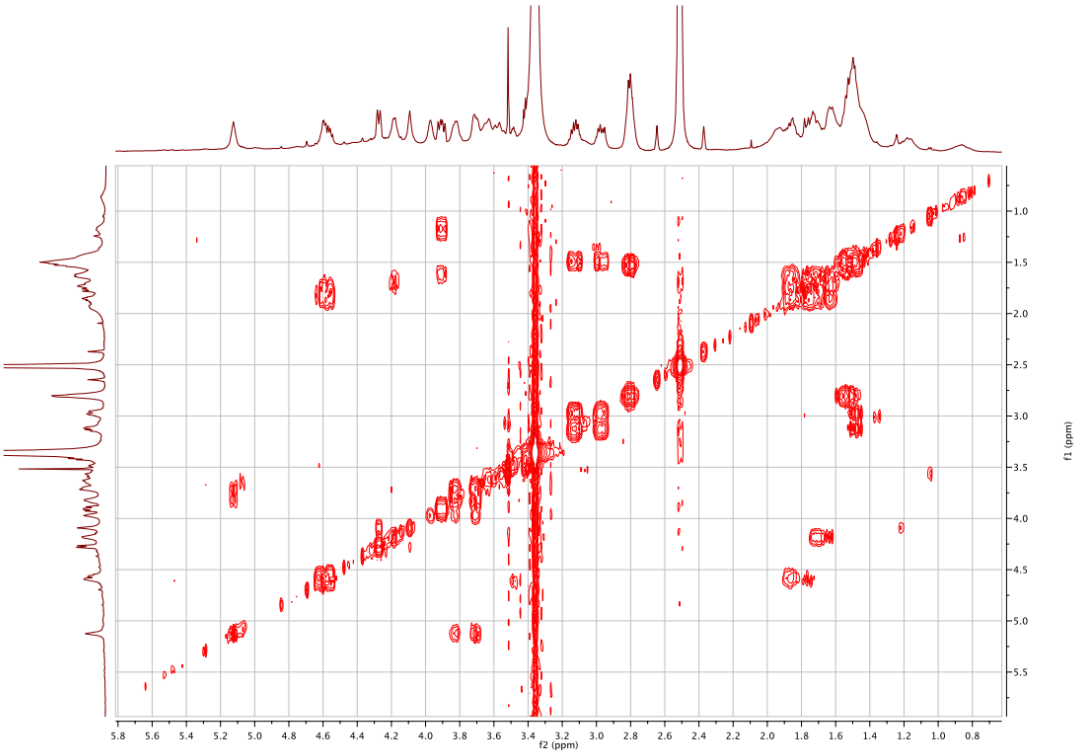

f2 (ppm)
f1 (ppm)



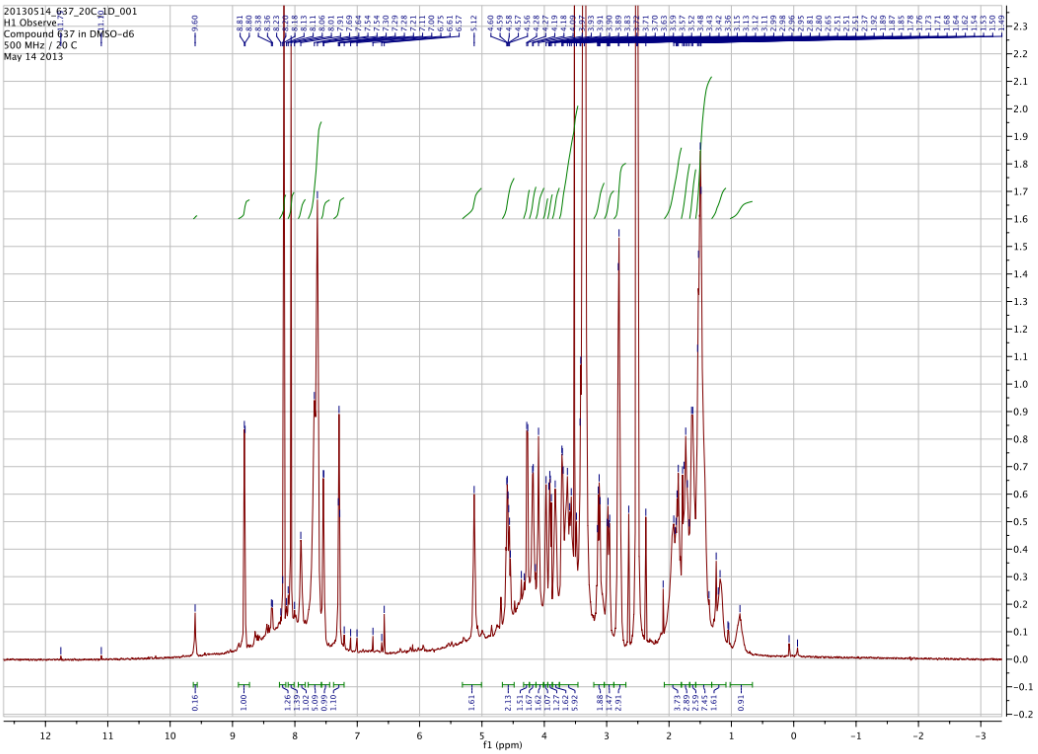
COSY de la molécule de 636 Da



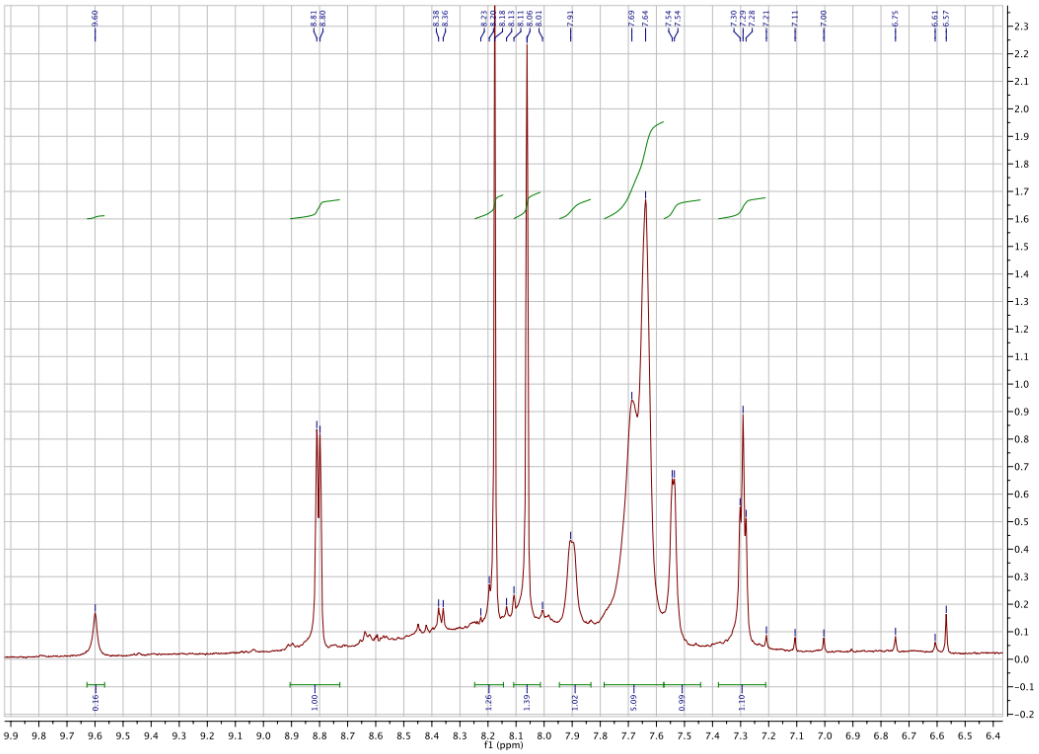

f2 (ppm)
f1 (ppm)

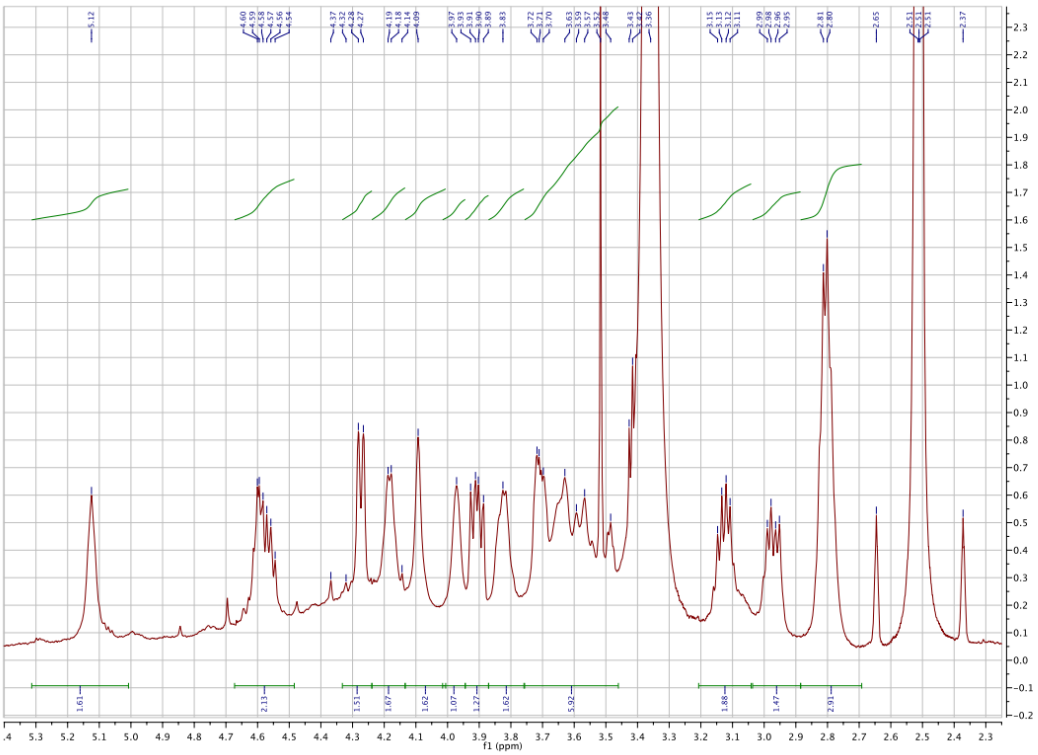

f2 (ppm)
f1 (ppm)

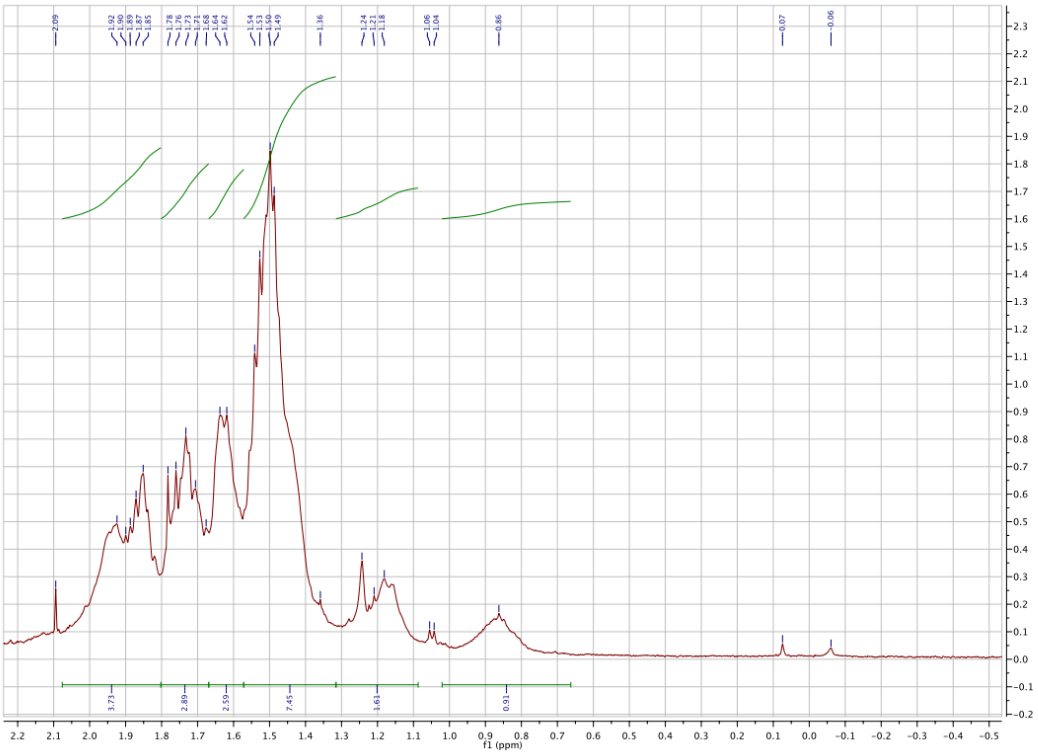
Spectre 1D de la molécule de 636 Da



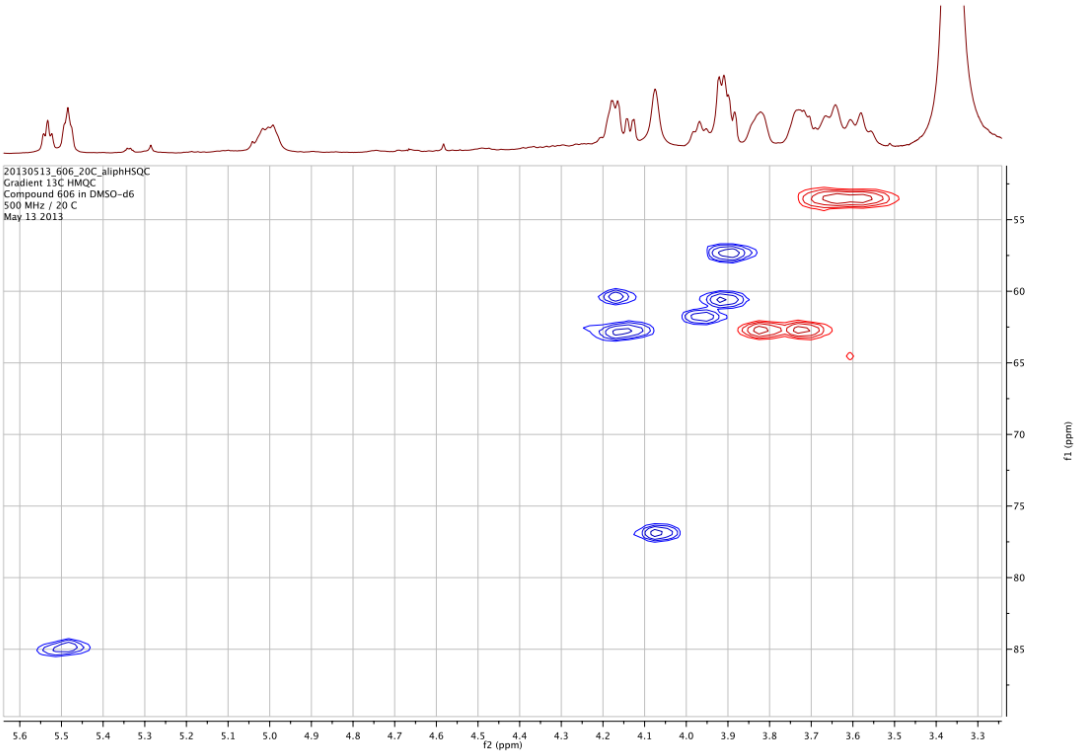
11.75
11.10
f1 (ppm)

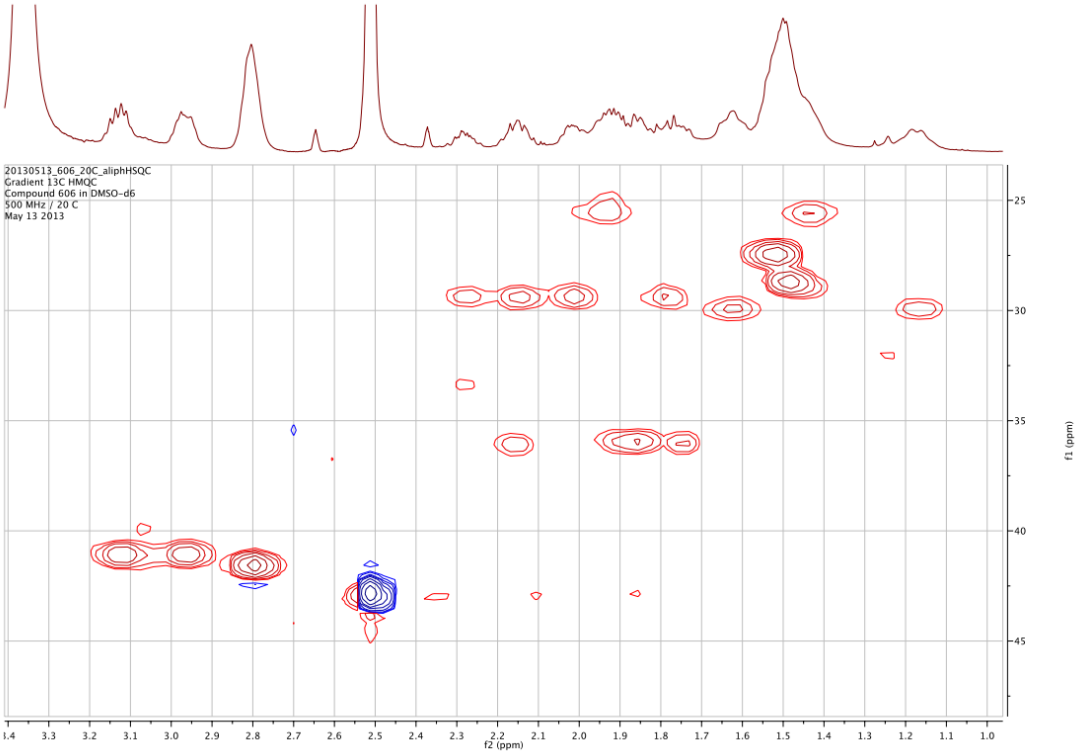

9.60
8.81
8.80
8.38
8.36
8.23
8.20
8.18
8.13
8.11
8.06
8.01
7.91
7.69
7.64
7.54
7.54
7.30
7.29
7.28
7.21
7.11
7.00
6.75
6.61
6.57
0.16
1.00
1.26
1.39
1.02
5.09
0.99
1.10
f1 (ppm)


f1 (ppm)

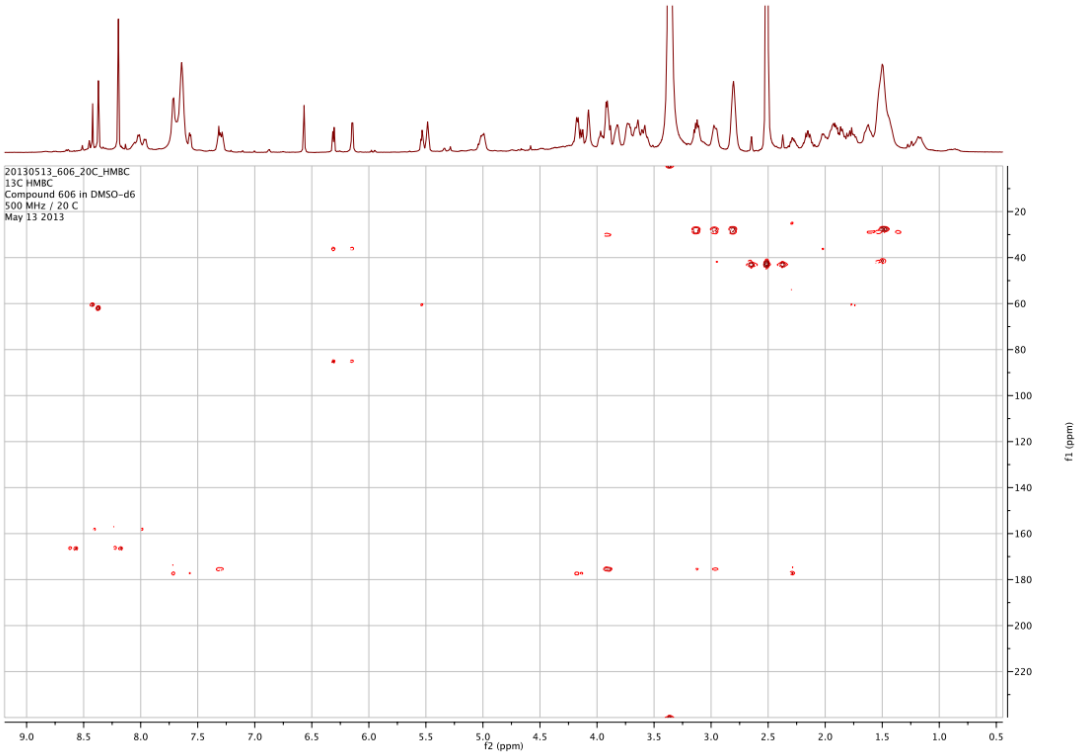

f1 (ppm)

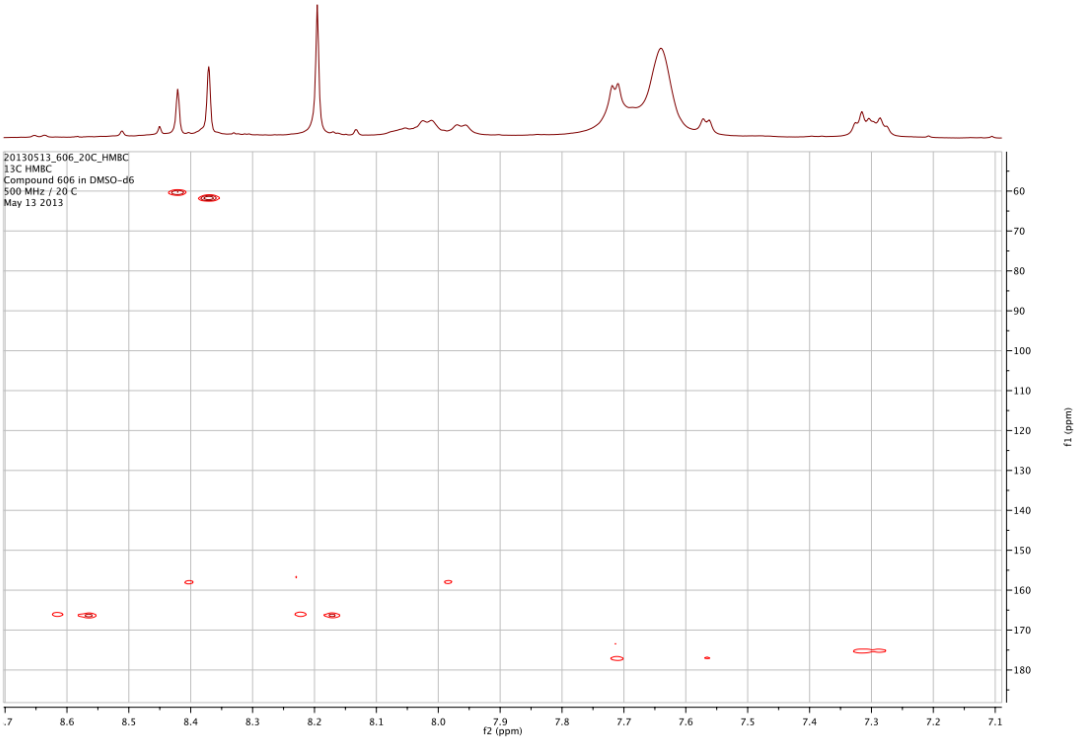
Spectre HSQSC de la molécule de 606 Da

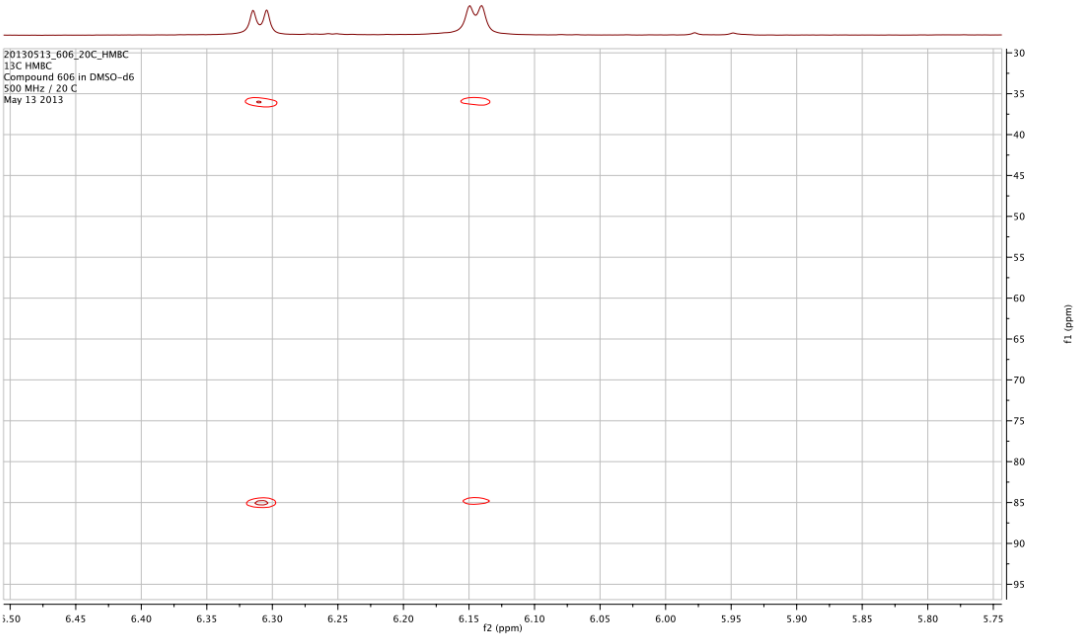


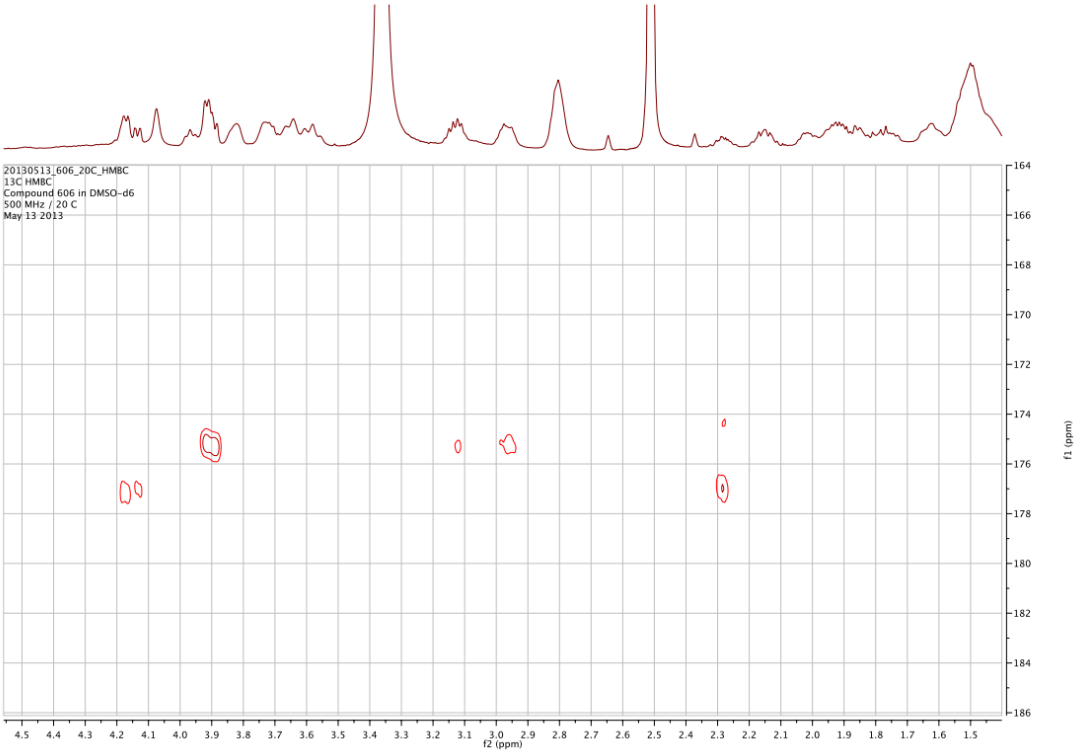


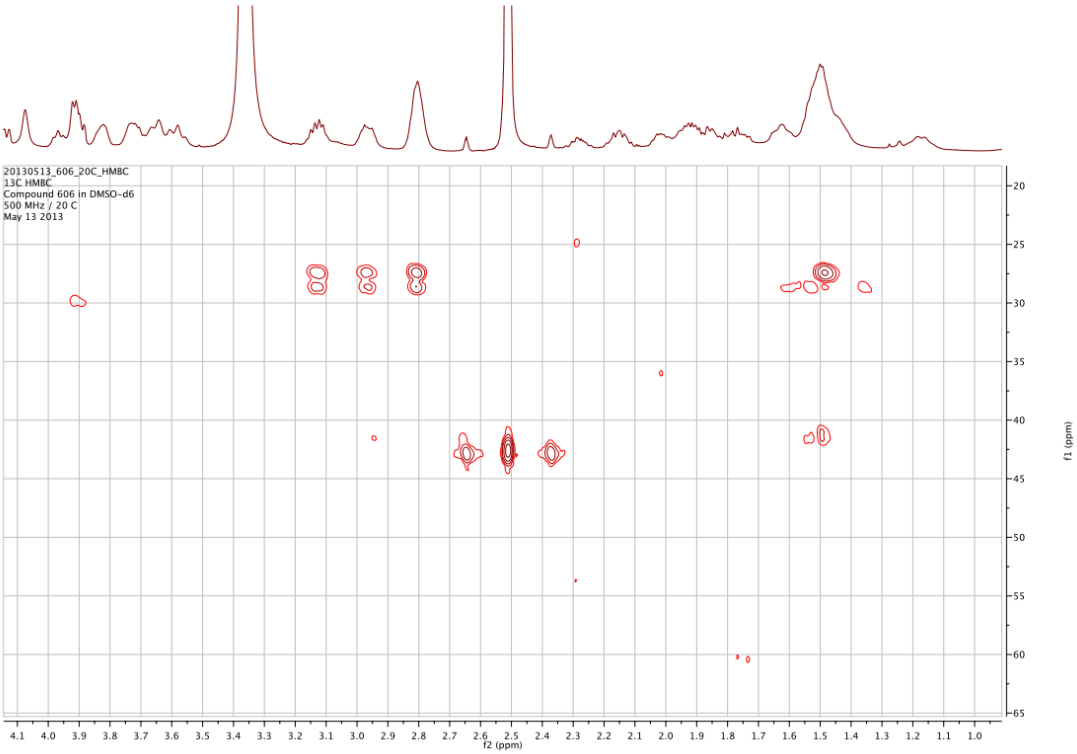
Spectre HMBC de la molécule de 606 Da



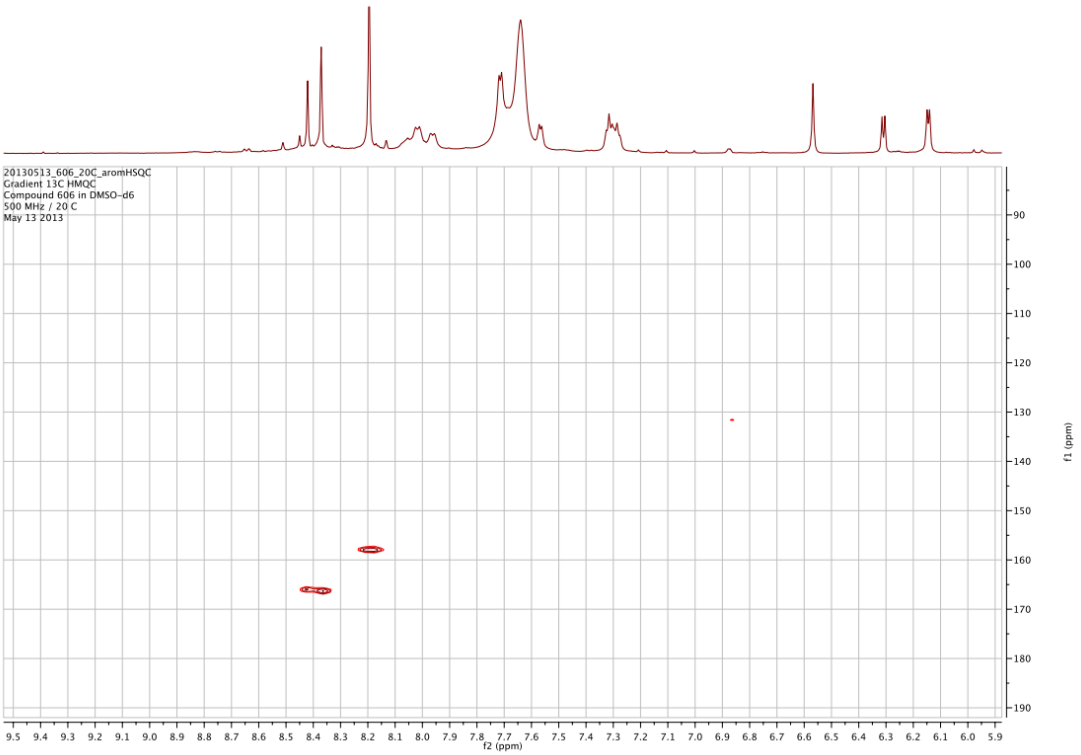

20130513_606_20C_HMBC
13C HMBC
Compound 606 in DMSO-d6
500 MHz / 20 C
May 13 2013
f2 (ppm)
f1 (ppm)

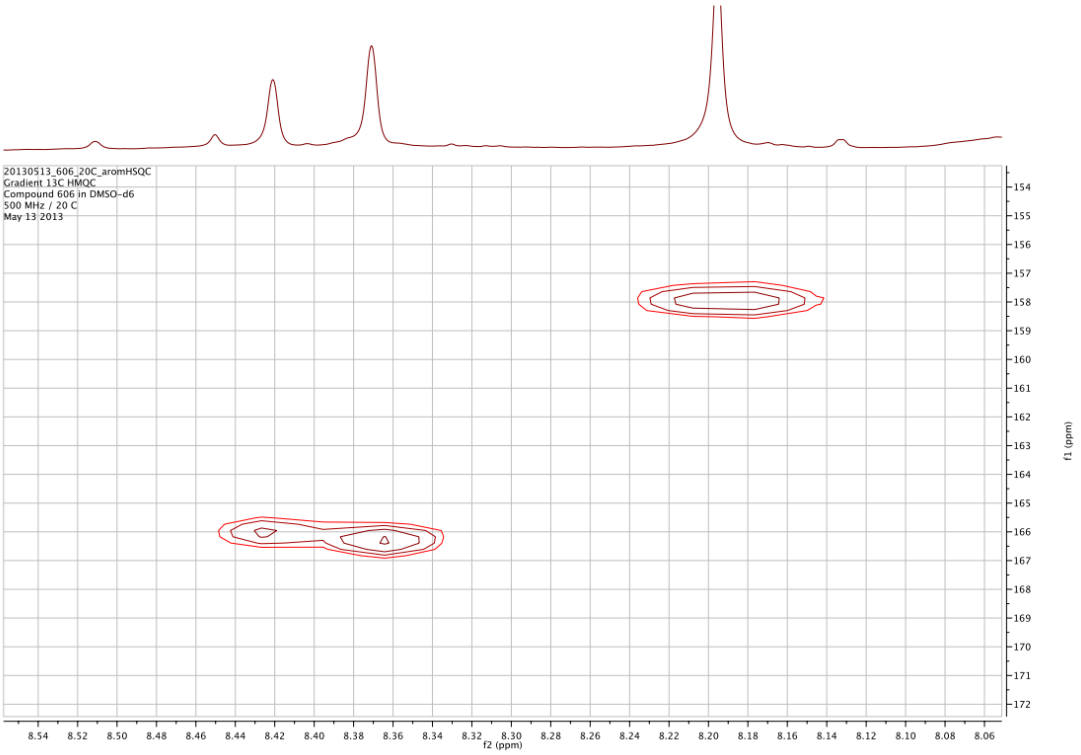

20130513_606_20C_HMBC
13C HMBC
Compound 606 in DMSO-d6
500 MHz / 20 C
May 13 2013
f2 (ppm)
f1 (ppm)


20130513_606_20C_HMBC
13C HMBC
Compound 606 in DMSO-d6
500 MHz / 20 C
May 13 2013
f2 (ppm)
f1 (ppm)

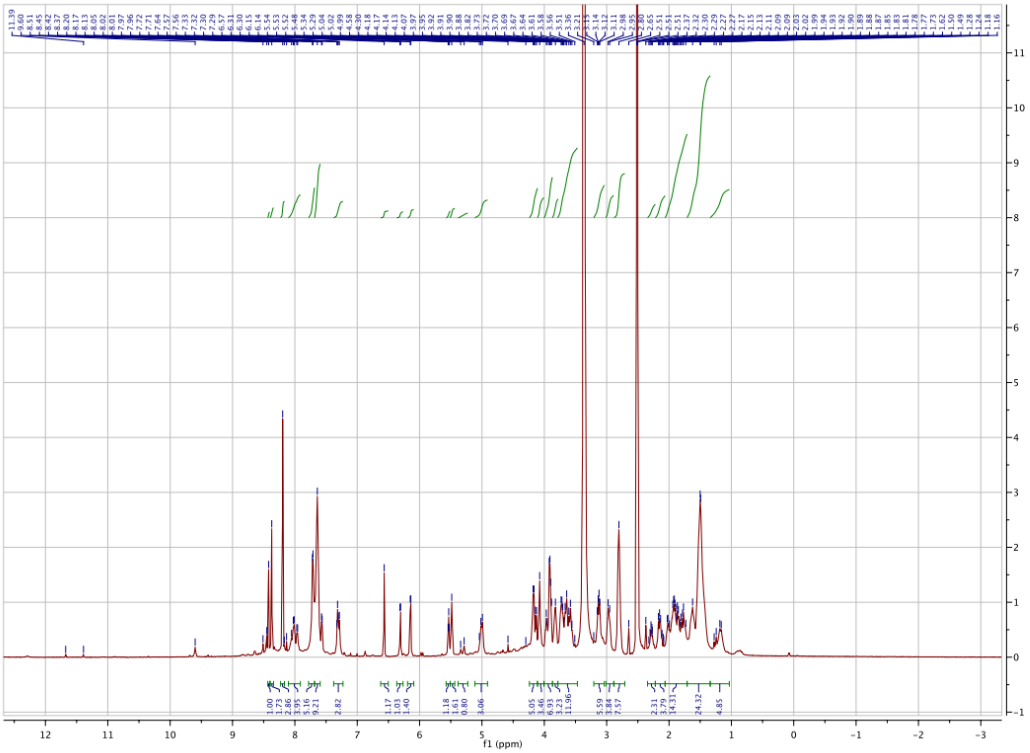

20130513_606_20C_HMBC
13C HMBC
Compound 606 in DMSO-d6
500 MHz / 20 C
May 13 2013
f2 (ppm)
f1 (ppm)

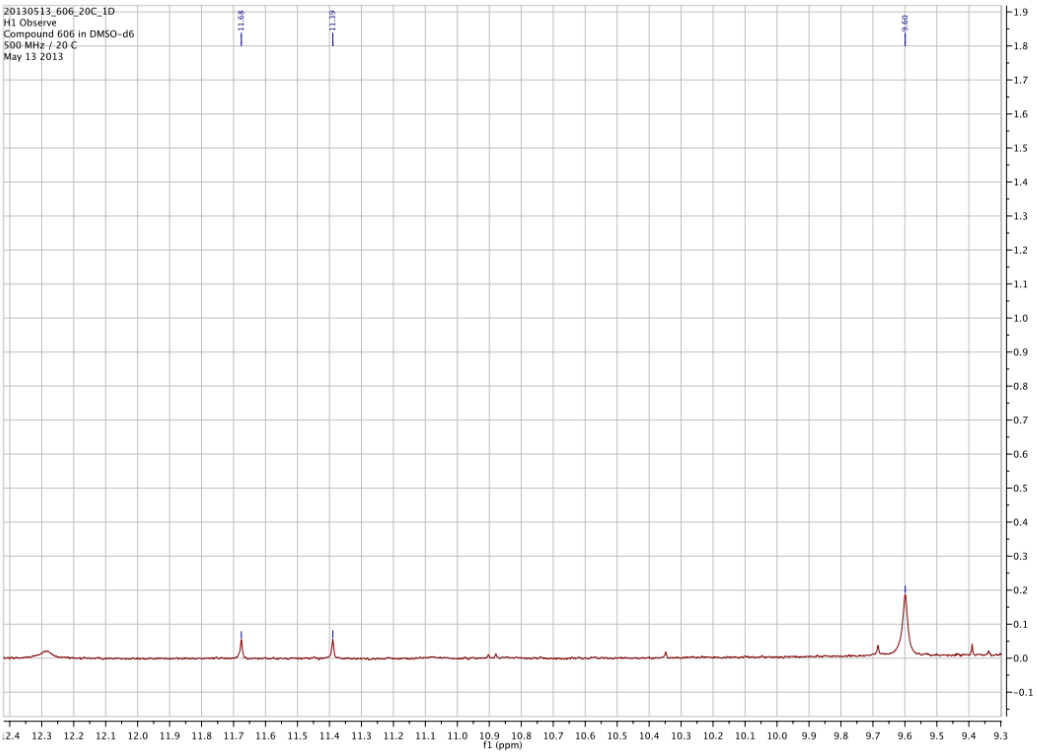
Spectre HSQC aromatique de la moécule de 606 Da

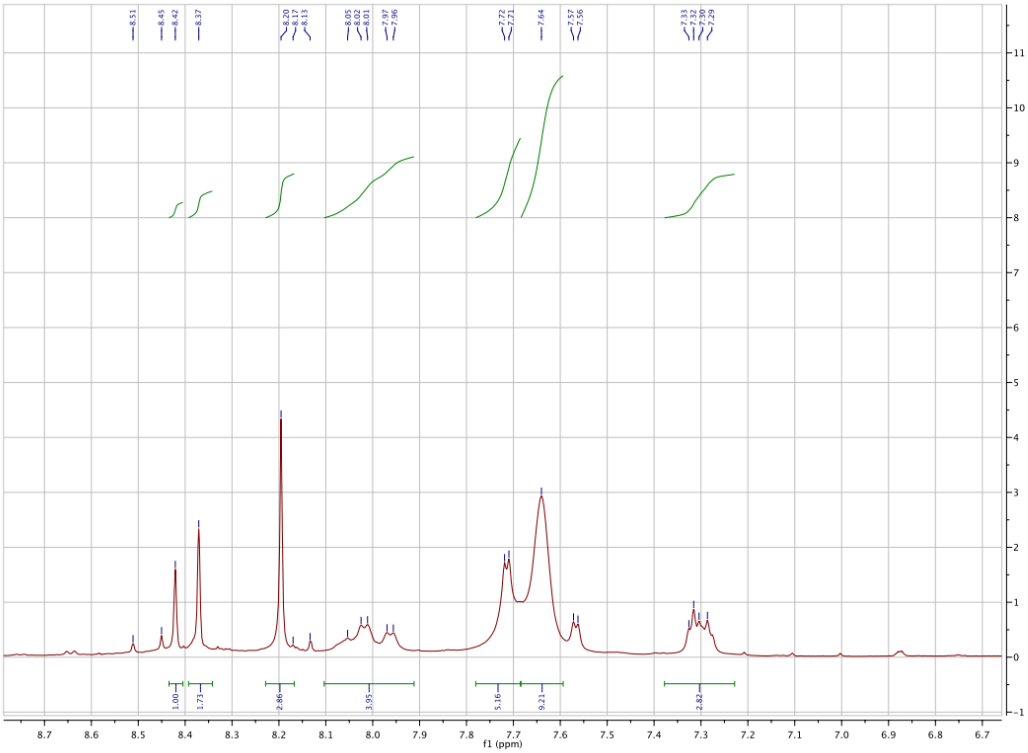




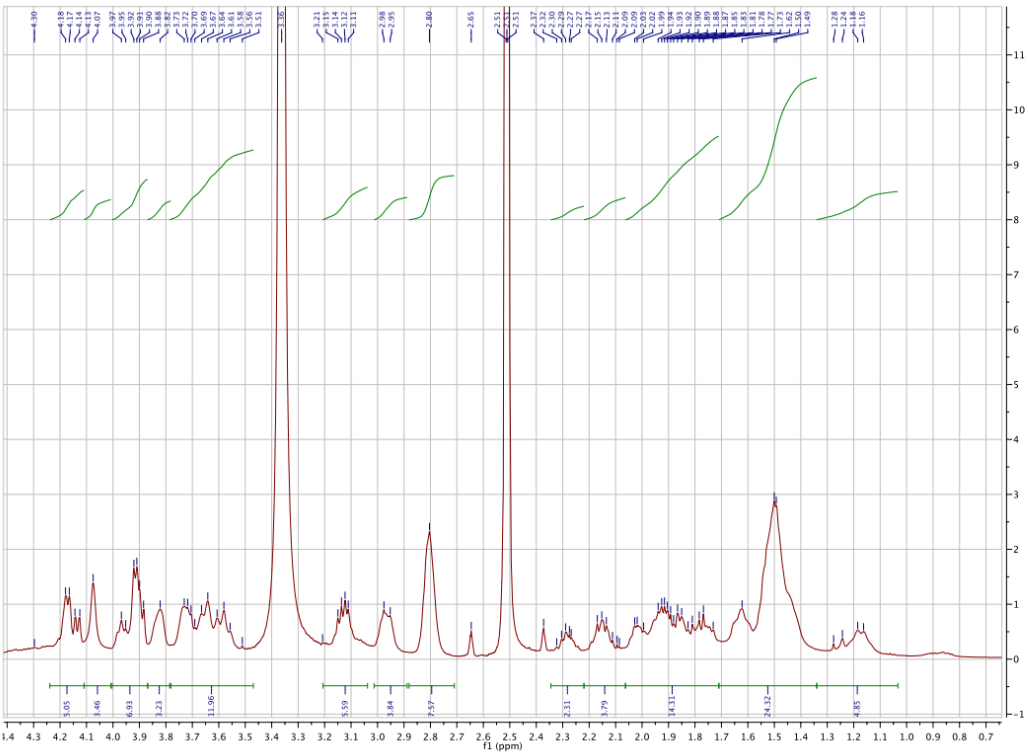
Spectre 1D de la moécule de 606 Da

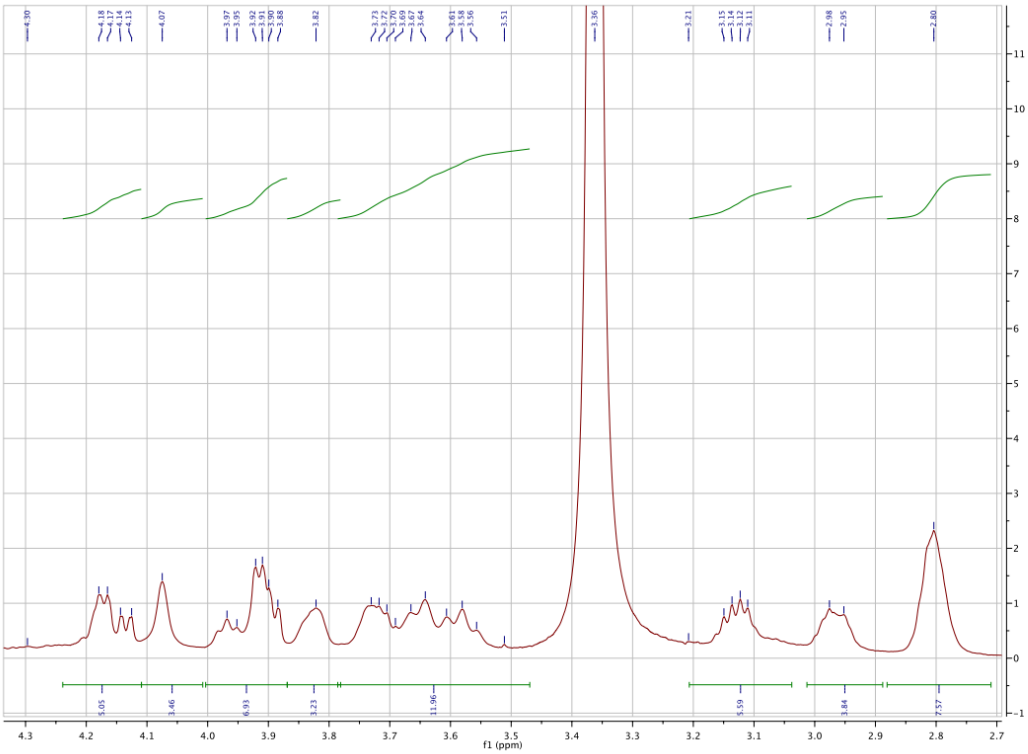


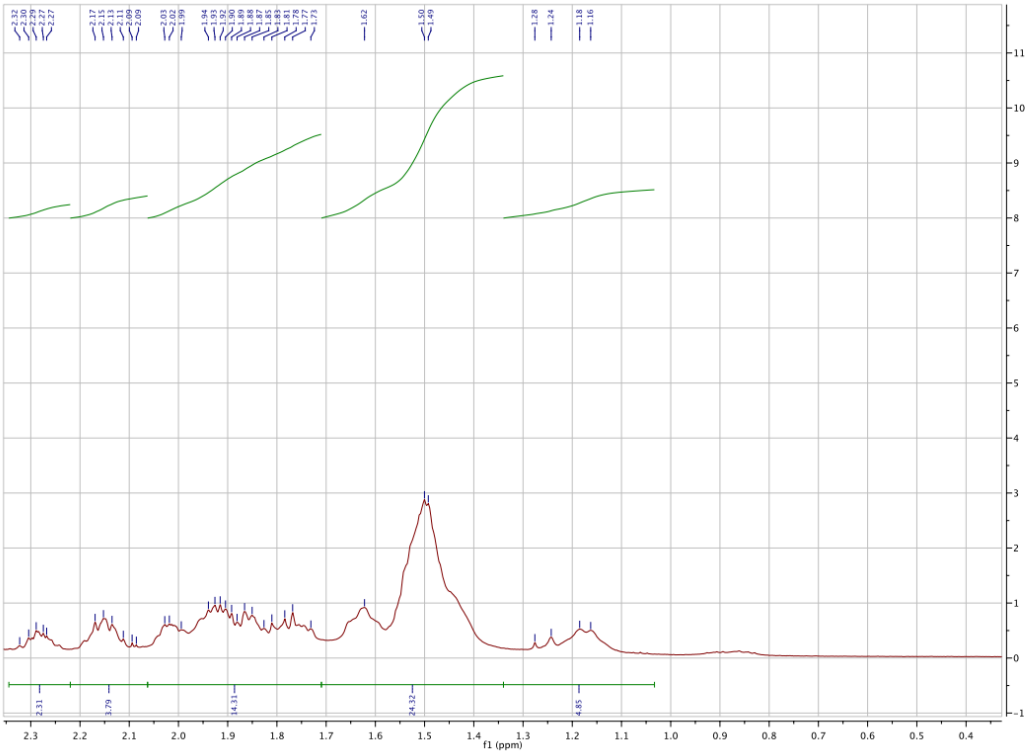



8.51
8.45
8.42
8.37
8.20
8.17
8.13
8.05
8.02
8.01
7.97
7.96
7.72
7.71
7.64
7.57
7.56
7.33
7.32
7.30
7.29
1.00
1.73
2.86
3.95
5.16
9.21
2.82
f1 (ppm)

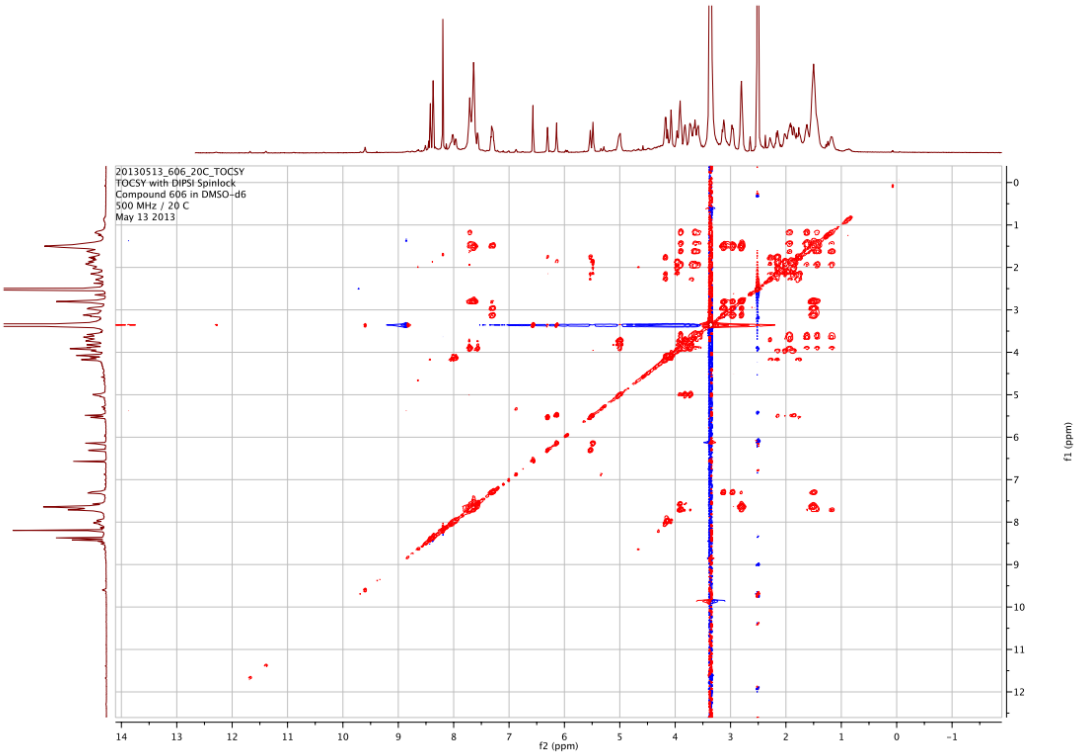
6.57
6.31
6.30
6.15
6.14
5.54
5.53
5.52
5.48
5.34
5.29
5.04
5.02
4.99
1.17
1.03
1.40
1.18
1.61
0.80
3.06
f1 (ppm)

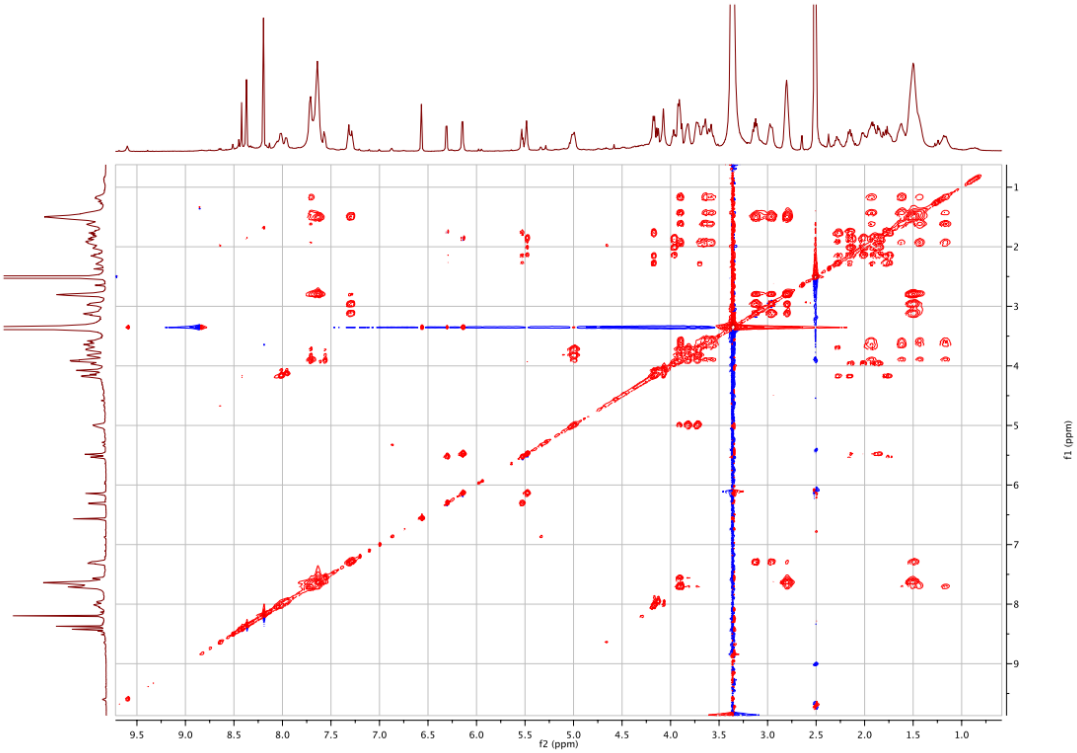

f1 (ppm)

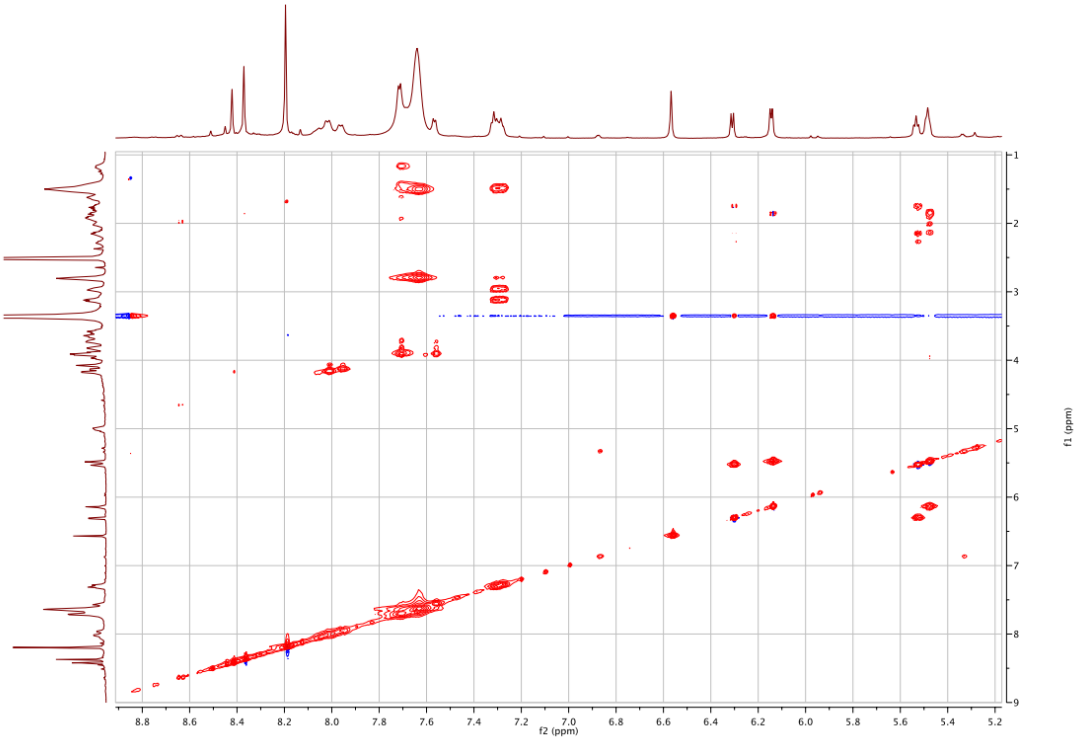

f1 (ppm)

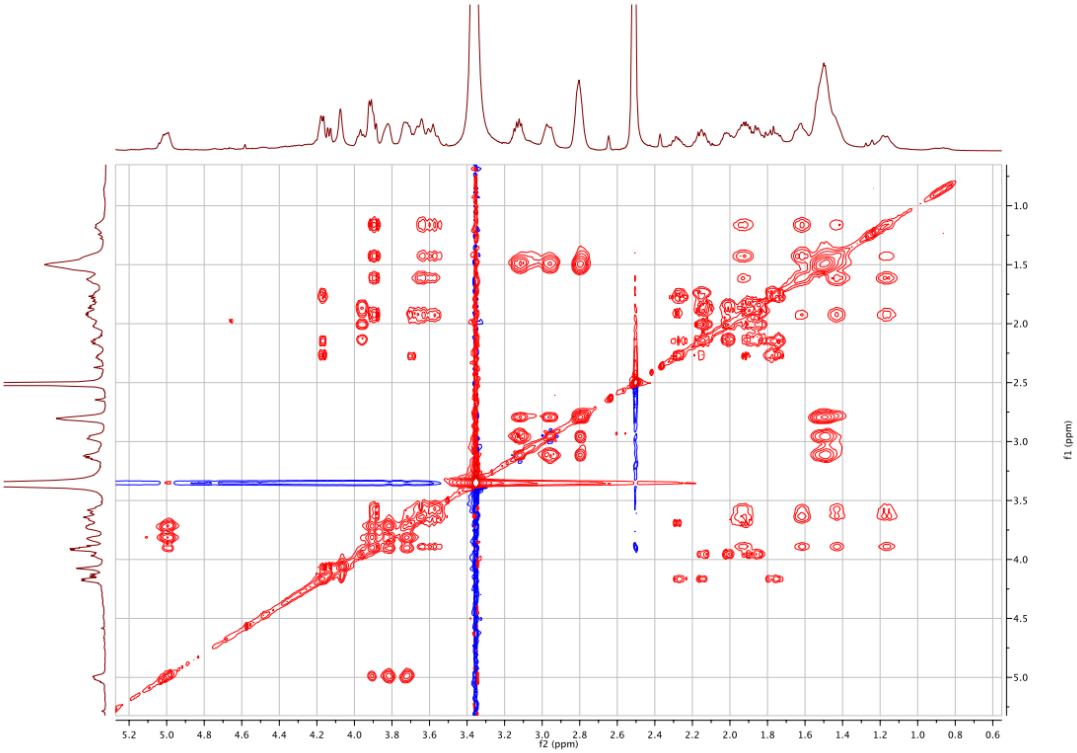


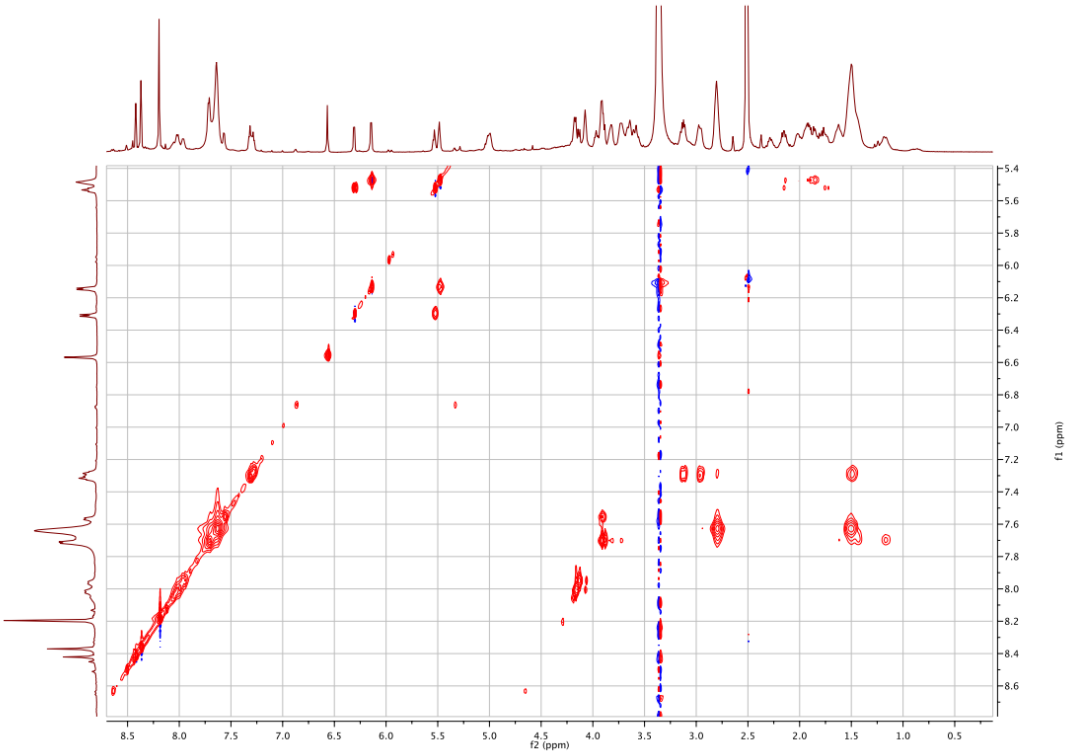
TOCSY de la molécule de 606 Da



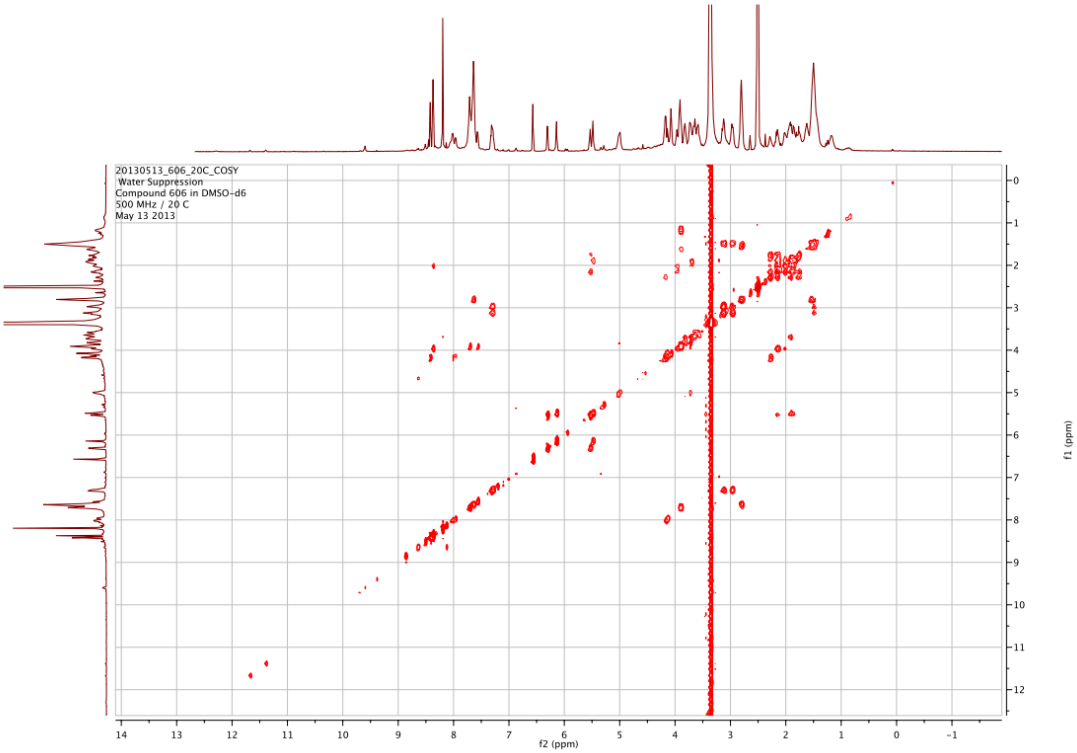

f2 (ppm)
f1 (ppm)

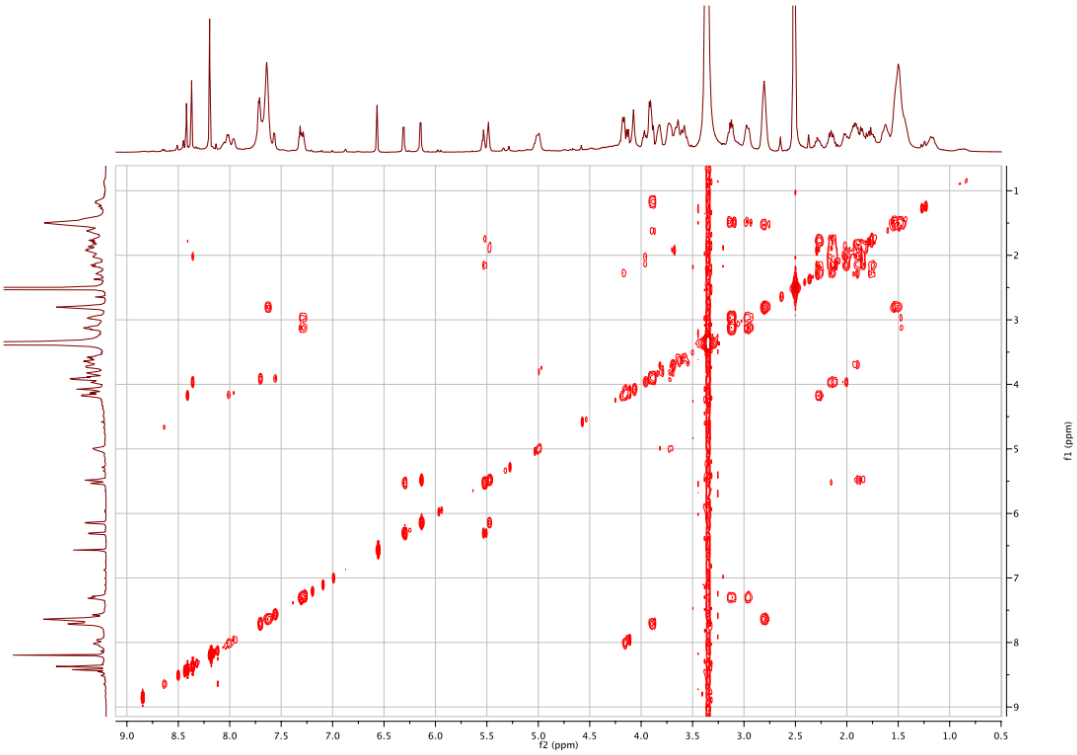

f2 (ppm)
f1 (ppm)


f2 (ppm)
f1 (ppm)

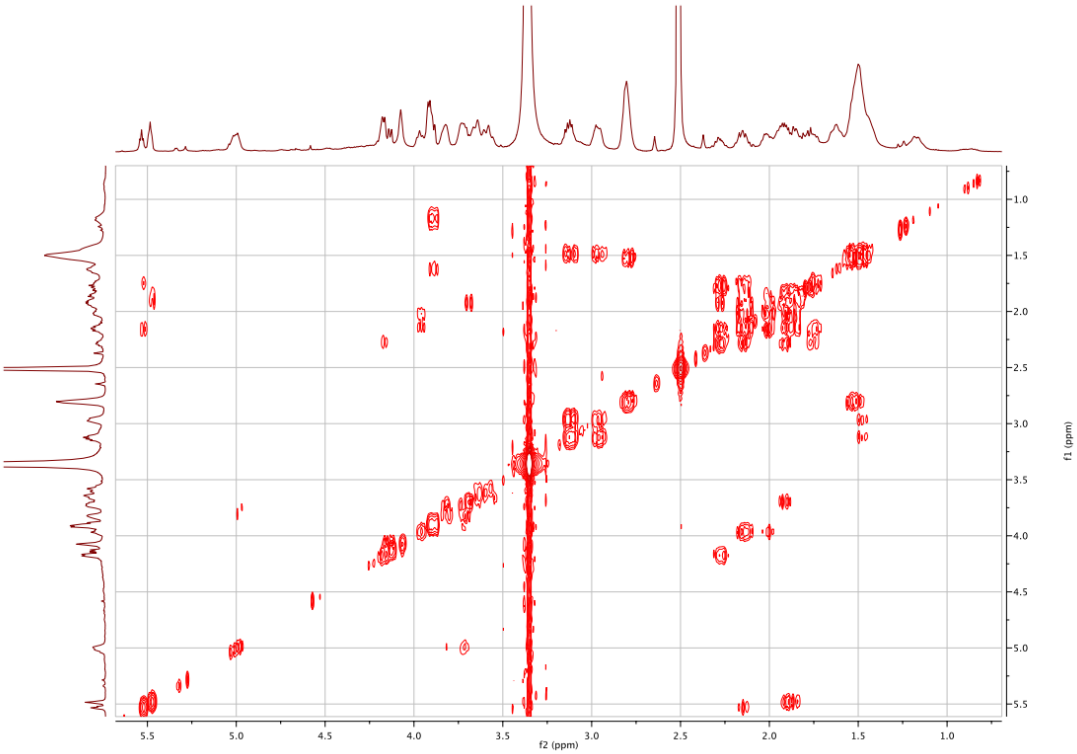

f2 (ppm)
f1 (ppm)

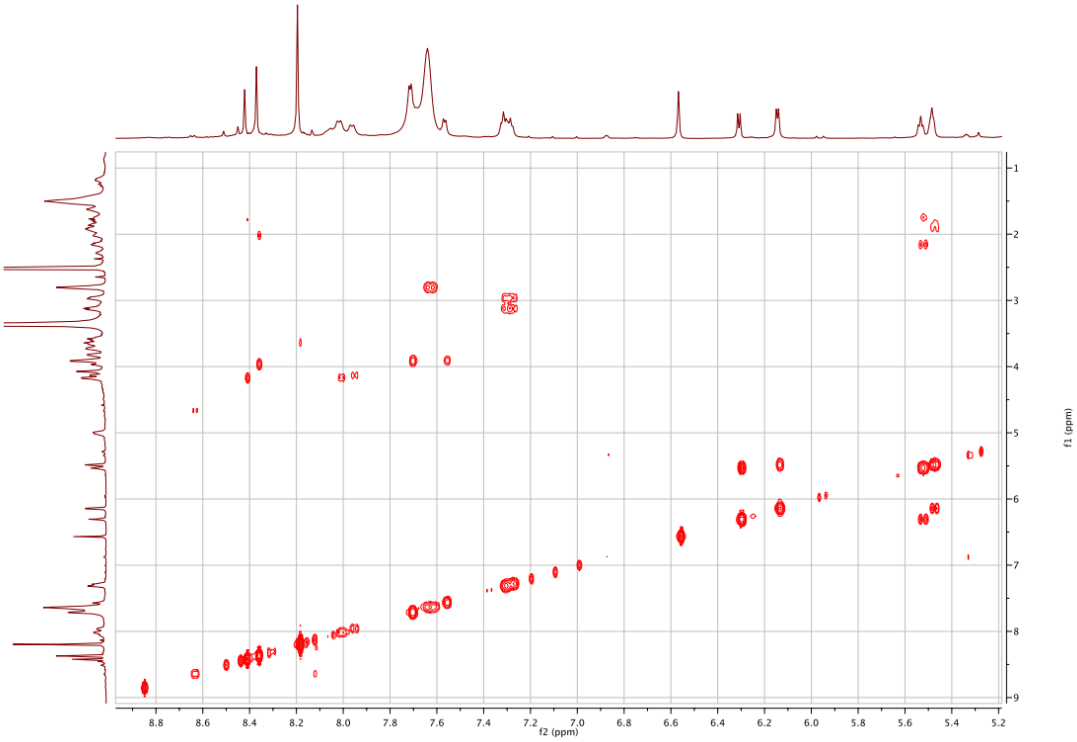
COSY de la molécule de 606 Da

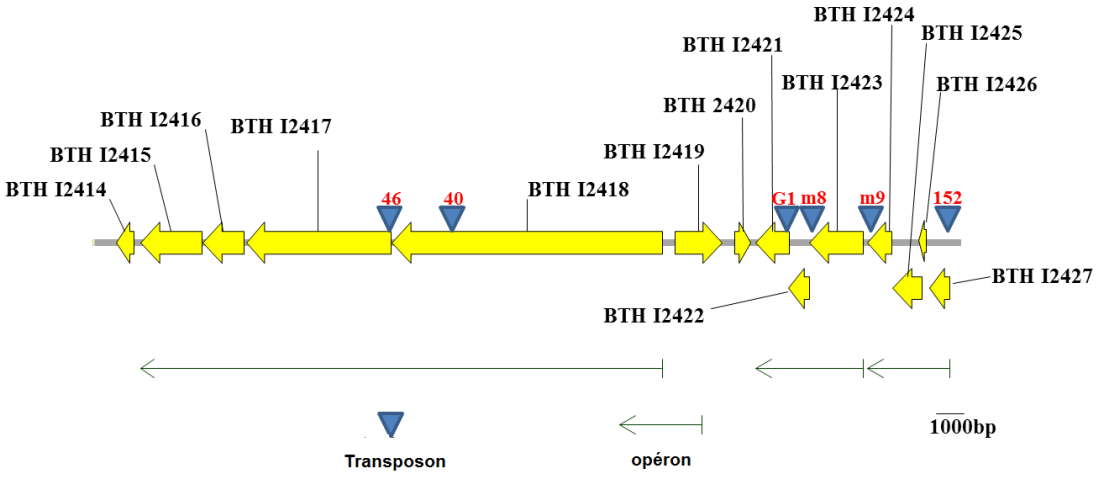




f2 (ppm)
f1 (ppm)


f2 (ppm)
f1 (ppm)



Insertion des transposons sur les gènes de biosynthèse de la malléobactine

Burkholderia thailandensis E624