NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 11 décembre 2024 par

Manon DASSA-VALZER

Décrypter les mécanismes du transport longue distance des métaux chez les bactéries

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Microbiologie

École doctorale
ED62 – Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Biosciences et biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM) – Equipe Microbiologie Environnementale et Moléculaire (MEM)

Composition du jury

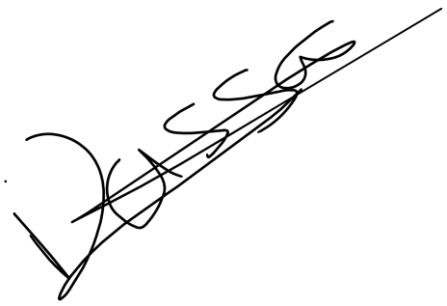
Sylvie LAUTRU Chargée de recherche – I2BC	Rapporteuse
Olivier NEYROLLES Directeur de recherche – IPBS	Rapporteur
Agnès RODRIGUE Maitre de conférences – MAP	Examinatrice
Patrick BILLARD Maitre de conférences – LIEC	Examinateur
Romé VOULHOUX Directeur de recherche – IMM	Président du jury
Pascal ARNOUX Directeur de recherche – BIAM	Directeur de thèse

Affidavit

Je soussignée, Manon DASSA-VALZER, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Pascal ARNOUX, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Manosque, le 11 septembre 2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

Liste des publications réalisées au cours de la période de thèse :

1. Manon Dassa-Valzer, Daniel Chevrier, Marie-Pierre Isaure, Catherine Brutesco, Pascal Arnoux. Evidence of long-distance metal transport in multicellular bacterial synnemata. En cours de soumission.

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. 18ème congrès nationale de la Société Française de Microbiologie, 4 au 6 octobre 2023, Rennes : « Sharing metals in multicellular Actinobacteria » - Poster

2. 6ème congrès de la Junior Scientists Microbiology Meeting of Marseille (JSM3), 4 au 6 mai 2022, Marseille : « Metal transport in multicellular bacterium » - Présentation orale

Résumé

Dans un mode de vie multicellulaire, les bactéries peuvent éventuellement mettre en place des mécanismes de transports et d'échange de nutriments au sein de la communauté. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à la répartition des métaux chez deux bactéries du sol, *Actinosynemma mirum* et *A. pretiosum*. En effet, ces bactéries sont capables de former des structures multicellulaires aériennes en forme d'arbre, appelées synnemata, qui sont composées de trois parties : un mycélium végétatif (racines), un hyphe érigé (tronc) et un mycélium aérien (branches). Nous nous sommes intéressés aux mécanismes de transport des métaux essentiels au sein de ces structures, afin d'essayer de comprendre comment les bactéries localisées aux extrémités du mycélium aérien pouvaient obtenir ces micronutriments dont la source se trouve dans le substrat de croissance et donc parfois éloignée de plusieurs dizaines de micromètres.

Pour tenter de répondre à cette problématique, nous avons utilisé des approches complémentaires de microbiologie avec différentes techniques d'imageries telles que la microscopie électronique à transmission et à balayage et l'imagerie de fluorescence aux rayons X (nanoXRF). Cela nous a permis de dévoiler une répartition originale des métaux dans les synnemata avec fréquemment une colocalisation de certains éléments comme le phosphate, le calcium, le fer et le zinc. En parallèle nous avons également utilisé des approches de protéomiques, de transcriptomique et de génétique qui ont toutes révélé une faible production de différents transporteurs de métaux. Ensemble, nos résultats suggèrent que des mécanismes originaux de transport des micronutriments sur de longues distances sont à l'œuvre au sein de ces structures bactériennes complexes.

Mots clés : Transport, métaux, bactéries, protéines, multicellularité

Abstract

In a multicellular lifestyle, bacteria can eventually set up mechanisms for transporting and exchanging nutrients within the community. It was in this context that we looked at the distribution of metals in two soil bacteria, Actinosynemma mirum and A. pretiosum. These bacteria can form tree-shaped aerial multicellular structures called synnemata, which are made up of three parts: a vegetative mycelium (roots), an erect hypha (trunk) and an aerial mycelium (branches). We were interested in the mechanisms for transporting essential metals within these structures, to understand how bacteria located at the ends of the aerial mycelium could obtain these micronutrients whose source is in the growth substrate and therefore sometimes several micrometers away.

To this aim, we used complementary microbiological approaches with different imaging techniques such as transmission and scanning electron microscopy and X-ray fluorescence imaging (nanoXRF). This has enabled us to reveal an original distribution of metals in synnemata, with frequent colocalization of certain elements such as phosphate, calcium, iron and zinc. In parallel, we also used proteomic, transcriptomic and genetic approaches, all of which revealed low production of different metal transporters. Taken together, our results suggest that novel long-distance micronutrient transport mechanisms are at work within these complex bacterial structures.

Key words: Transport, metals, bacteria, proteins, multicellularity

Remerciements

« On peut trouver le bonheur même dans les moments les plus sombres… Il suffit de se souvenir d'allumer la lumière. » - Albus Perceval Wulfric Brian Dumbledore.

Pour commencer, je tiens à exprimer chaleureusement ma reconnaissance envers l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de porter leur regard d'expert sur mes travaux. Je remercie **Dr. Sylvie Lautru** et **Dr. Olivier Neyrolles**, pour l'évaluation de ce manuscrit et leur implication dans le jury de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également les autres membres du jury, **Dr. Agnès Rodrigue** et **Dr. Patrick Billard**, d'avoir accepté de participer au jury de thèse en tant qu'examinateurs. Je remercie également **Dr. Romé Voulhoux** d'avoir accepté d'être président du jury de cette thèse.

Un grand merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse : **Pr. Amel Latifi**, **Dr. Agnès Rodrigue** et **Dr. Clémentine Laffont**. Vous avez été un atout dans l'évolution de cette thèse grâce à vos remarques et conseils avisés, et je vous en suis reconnaissante. Clémentine nos échanges m'ont été d'une grande aide et tu es partie en me laissant une pression immense !

Maintenant accrochez-vous bien parce qu'il y en a des personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse et qu'il faut remercier !

Dans un premier temps je tiens à remercier **David Pignol**, directeur de l'institut de Biosciences et biotechnologie d'Aix-Marseille université (BIAM) pour m'avoir accueillie au sein de son institut mais également d'avoir apporté son aide et son soutien dans des moments importants. Je remercie également **Damien Faivre** (chef de l'équipe au début de ma thèse) de m'avoir ouvert les portes du MEM pour cette grande aventure ainsi que tous les membres de cette super équipe, **Laurence Blanchard**, **Arjan De Groot**, **Sandrine Grosse**, **Océane**, **Alicia**, **Shristy**. Mes remerciements vont également à **François Alberge** pour son implication dans la correction de ce manuscrit et bonne continuation pour la suite !

Mes remerciements s'adressent ensuite à **Pascal Arnoux**, directeur de cette thèse, pour m'avoir choisie pour porter ce projet novateur et de m'avoir fait confiance. Malgré les difficultés qu'on a rencontrées au cours de cette aventure, j'en ressors grandie et plus forte. Cette thèse a été source d'enseignements que ce soit au niveau organisation, communication, autonomie. Notre séjour à l'ESRF de Grenoble a été une expérience très enrichissante et je te remercie de m'avoir permis de la vivre. Grâce à toi, j'ai pu découvrir de nouvelles techniques et approches scientifiques et participer à la découverte de choses fascinantes. Pour finir, travailler avec toi a été pour moi une expérience très formatrice et je t'en remercie. On n'a pas toujours été en phase, je pense que dans une certaine mesure on s'est loupés et c'est un regret, je pense qu'on aurait pu faire quelque chose d'encore plus grand… Dans une autre vie, dans quelques années ? Dans tous les cas, je te remercie sincèrement pour l'aventure.

Mes remerciements vont aussi à **Daniel Chevrier**. En plus d'avoir été d'une aide précieuse sur bien des domaines mais particulièrement sur les expériences XRF que ce soit sur place avec tes connaissances, dans le traitement des données et dans l'analyses de résultats. En plus, tu as retrouvé ma bague, qui était tombée dans l'herbe et tu es devenu mon sauveur de bague ! Je ne saurais dire pour quelles raisons en particulier je te suis reconnaissante mais je le suis énormément. En plus d'être un chercheur passionné et investi, tu es une personne formidable, souriante et travailler à tes cotés fut un réel plaisir (surtout avec ton accent).

Je remercie également toutes les personnes avec qui nous avons collaboré. **Artémis Kosta** et **Hugo LeGuenno** (IMM) pour les superbes images de microscopies électroniques dont une a permis à Hugo d'être le grand gagnant du concours photo du RIME - CNRS - Centre national de la recherche scientifique. Un grand merci à **Yann Denis** (IMM) pour sa patience, son expérience et son aide pour la mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN fonctionnel sur mes cultures bactériennes. Je te remercie également de m'avoir formée sur les expériences de RT-qPCR et d'avoir su répondre présent à chacune de mes sollicitations ! Un grand merci à **Jean Armengaud** pour la protéomique. Sans oublier **Christian Godon**, responsable de la plateforme de microscopie du BIAM, qui m'a formée et accompagnée dans plusieurs réflexions scientifiques.

Merci à **Marie-Pierre Isaure**, présente avec nous à l'ESRF de Grenoble. Travailler avec toi fut un réel plaisir. Ainsi **qu'Hélène Javot** et **Virginie Chapon** pour leurs conseils et de nous avoir aidé et guidé à plusieurs reprises. Merci aussi à **Marina Siponen** pour ta bonne humeur, tes gourmandises canadiennes et ton aide précieuse face aux différentes difficultés que j'ai pu rencontrer en biochimie. Beaucoup d'expériences ont abouti grâce à **Nicolas Bremond** et **Sylvain Fochesato**. Vous avez toujours été là pour apporter votre aide et résoudre mes problèmes de biologie moléculaire et biochimie. De plus, c'est un vrai plaisir de converser avec vous, alors merci beaucoup ! Merci aussi à **Philippe Ortet**, qui a su rendre les données de protéomiques plus simples et qui a été d'une aide précieuse dans les analyses.

Je remercie tous les membres des **Padawans** pour nos sorties et partages scientifiques. Ainsi que **Juliette Breillat** pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Un grand merci à **Nicolas Jans** (Patient zéro), pour les bons moments passés à échanger sur nos sujets et nos manips, mais aussi sur des sujets plus personnels et profonds. Pour nos discussions de rageux et de gossip girls, on a quand même bien rigolé et t'as été la pour moi quand j'en avais besoin. Si j'ai vu le bout de ce manuscrit, tu le verras aussi ! Merci aussi à l'Opel Meriva de m'avoir trimballée à de nombreuses reprises, tu m'as été d'une aide précieuse.

Mes remerciements vont également à **Romain Bolzoni**, une des personnes les plus humaines et attachantes que j'ai pu rencontrer. Te côtoyer et passer tous ces moments avec toi, ont été un plaisir et quand tu veux je t'accueille chez moi pour préparer les prochaines buches de Noël. Plaisir d'offrir, joie de recevoir.

Merci à mes fidèles copines, les « vieilles », les petites dames, **Sandra Preveral** (Sandra ni couette), **Géraldine Brandelet** (Gégé B ou Grognon), **Nathalie Garcia**, **Géraldine Adryanczyk** (Gégé A), écrire ton nom a toujours été une angoisse pour moi,

Séverine Boiry, **Laurie Piette**, **Laurine Descamps**. Il est impossible de compter le nombre de bons moments que j'ai passé avec vous, que ce soit dans les labos, entre midi et deux ou à une de nos sorties. Vous avez apporté beaucoup de gaité tout au long de cette aventure et vous avez toujours su trouver les mots pour me requinquer ! Sandra et Gégé B, vous avez toujours été disponibles et prête à m'aider scientifiquement parlant (parce qu'on était là pour ça à la base…) et je vous en remercie. Je vous adore !

Que seraient ces remerciements si je ne mentionnais pas **Catherine Brutesco**, ma petite Cathoche, la Rolls-Royce de la biologie, celle qui en a sous la pédale et j'en passe… Tu as été là, le tout premier jour, ce 9 novembre 2020 et tu n'as cessé d'être là pour moi durant tout ce temps. Tu m'as accompagnée dans les moments les plus difficiles mais aussi les plus joyeux. A chaque fois que je faisais face à un obstacle dans mes manipulations, je ne me faisais pas de soucis parce que je savais que tu serais là pour trouver une solution. Tu m'as tenue compagnie pendant de longues heures de microscopie confocale. J'ai vraiment eu l'impression qu'on était un binôme du tonnerre. On a beaucoup rigolé, mais aussi beaucoup réfléchit et beaucoup galéré à certains moments mais c'était toujours dans la bonne humeur ! Je n'oublierai cependant jamais ton refus catégorique de gouter mon gâteau au citron… Tu m'as tellement appris aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Tout le monde rêverait d'avoir sa Cathoche à soi et je pèse mes mots en disant que si tu n'avais pas fait partie de l'aventure je ne serais jamais arrivée jusque-là. Je pourrais en dire encore beaucoup mais il en faut un peu pour les autres aussi… Alors, je te suis infiniment reconnaissante pour ton aide, ta gentillesse, ta générosité, ta joie de vivre et ton soutien inestimable. Ça a énormément compté pour moi.

J'adresse mes remerciements à **Clara Autuoro**, Mani mon frère, pour son aide dans les manips, sa bonne humeur et les fous rires qu'on a pu avoir ! C'était si bien quand on partageait nos paillasses et qu'on râlait sur nos manips. On était un peu les Tic et Tac du MEM.

Merci à mes comparses du bureau, **Malo Marmol**, **Emilie Gachon** ou Fachon-Gachon et **Lucia Gandaria**. Vous étiez les meilleures collègues de bureau. Bureau isolé où personne ne voulait aller, on a su en faire un endroit de quiétude, de bonne humeur et de friandises. A cause de vous, je n'ai jamais pu tenir un régime mais ça en valait la peine car les moments passés avec vous étaient souvent synonyme de rigolade et de décompression. Vous êtes des personnes admirables. Emilie, on se voit à Paris à l'arrivée du marathon ?

Sandy Payan (bouboule, mon acolyte, ma voisine de bureau), c'était un plaisir de partager tout ça avec toi. Tu es arrivée au début de mon contrat et on ne s'est plus lâchées. Tu m'as guidée, motivée, aidée, écoutée, nourrie, soutenue, conduite, ramenée, faite rire, mis des musiques nulles en tête, émue et j'en passe. Ta confiance en moi et ton optimisme m'ont portée jusque-là et je t'en suis reconnaissante. Merci pour les moments de folie au bureau et au labo. Merci coupine, j'espère que tu vas stand by me et surtout n'oublie pas de creuser un tunnel !

Un merci très court mais sincère à **Lucie Barroux** ainsi qu'au **Dr Fournel** pour votre patience, ce que vous avez mis en place pour m'accompagner et votre écoute.

Je tiens à remercier **Morgane Belange**, celle sans qui je n'aurais pas rédigé ce manuscrit avec autant de classe. En plus d'être excellente dans ton travail, tu es une personne rayonnante et attachante, je me languissais toujours (et je me languis encore) nos rdv et nous sommes devenues de vraies copines dans la vie.

Je remercie **Morgane Garcia**, dans un premier temps pour son travail exceptionnel et les bons moments passés ensemble. Merci pour tes recommandations livresques, tu m'as fait aimer la lecture. Mais je te remercie particulièrement pour m'avoir entrainée et motivée à reprendre l'équitation. Je suis contente de partager cette passion avec toi !

Un immense merci à **Pascale de Philip**, notre histoire a commencé en 2017 quand tu étais mon enseignante en L3. Puis en 2020, j'ai intégré la charmante équipe de recherche d'Henry-Pierre Fierobe, où j'ai pris part à ton projet de recherche sur les transporteurs ABC de saccharides. Malgré l'intervention improvisée d'un petit virus, raccourcissant drastiquement mon stage, j'ai énormément appris et j'ai adoré travailler et apprendre à tes côtés. Je me suis régalée durant ces quelques mois et tu m'as même donnée l'envie de continuer avec toi pour une thèse ! Malheureusement le destin en avait décidé autrement et nous a séparé et m'a confié à un autre Pascal. J'ai apprécié ta pédagogie, ta passion, ta patience pour me réexpliquer plusieurs fois. C'était un plaisir de te voir car tu es tout le temps souriante et de bonne humeur. Même après cette séparation déchirante, tu as continué à prendre régulièrement des nouvelles de moi et nos échanges m'ont toujours fait énormément de bien ainsi que nos quelques repas entre deux manips à l'IMM. Je te remercie également pour ton investissement dans ce manuscrit et notamment pour ta grammaire et ton orthographe bien meilleures que les miennes ! Ton enthousiasme, ton optimisme et ton soutien ont été et sont pour moi très chers à mon cœur et j'espère que nos routes continueront de se croiser !

J'adresse mes remerciements au **Dr. Fanny Nazaret** (ma BBFFE, Broken Best Friend Forever de Ever). Rencontrée aussi à l'internat du BTS, tu es entrée dans ma vie comme ça, mine de rien. Et puis petit à petit quelque chose de fort et indestructible s'est construit et nous a mené à cette amitié sincère et solide. On peut dire qu'on s'est vues grandir et on a toujours veillé l'une sur l'autre. Tu es l'une des personnes qui me comprends le mieux et je te remercie pour tout ce que tu as pu faire pour moi. J'ai pu voir combien tu étais entourée et aimée lors de ta magnifique soutenance et je ne suis pas étonnée car tu es la femme la plus sensible, la plus empathique, la plus dévouée et attachante que je connaisse. J'admire ton intelligence, ta force, ta créativité, ta gentillesse, ton humour, ta rigueur et tant d'autres choses. Je suis finalement admirative de la personne que tu es devenue au travers des différentes épreuves que tu as traversé et je suis heureuse de faire partie de ta vie. Merci d'avoir cru en moi durant tout ce temps, d'avoir pris de mes nouvelles et de t'être occupée de moi d'une certaine façon. Quand je vois à quel point tu aimes la science, je me languis que tu aies ton équipe et je serais ravie de travailler avec toi ! Je t'aime BBFFE.

Je voudrais remercier **Ambre Moreau** (Ignacio Alonzo Julio Frederico de Titoooo), mon binôme de licence et de master. Bah je t'aime, j'aime ce que je suis quand je suis avec toi, j'aime qu'on partage le même amour des films cucul la praline, j'aime qu'on aime autant la nourriture, j'aime qu'on ait les mêmes passions finalement ! Mais j'aime surtout

ta gentillesse, ton optimisme, ta joie de vivre et le soutien que tu m'apportes dans tous les moments importants. Xoxo

Je remercie mes plus vieilles copines, Justine Boitel (Roustine, Ju) et Cassandra Rochette (la blonde). Je n'ose pas écrire depuis combien d'années on se connait parce que cela ferait trop mal, mais on en a une idée… Cette amitié a commencé en BTS Biotechnologie et plus précisément à l'internat. On était mieux la qu'en prison. J'avais imaginé ça comme quelque chose d'horrible mais vous avez rendu ça merveilleux. **Ju,** que dire ? tu as été mon inspiration et ma force durant ce BTS et c'est grâce à toi que je suis arrivée aussi loin et je pense que c'est toi qui aurais dû prendre cette voie. Je te remercie pour les soirées de rédaction de TP dans la joie et la bonne humeur, nos soirées illégales de films pendant les heures d'études ou les séances manucures. Merci aussi de continuer d'être là et d'être la copine d'amour que tu es. **La blonde**, je remercie Justine d'avoir été mon excellent binôme pendant ces deux ans mais je te présente mes excuses pour ne jamais avoir pris le risque de me mettre en binôme avec toi… Malgré tout, tu ne nous as jamais boudées et tu nous as fait rire tous les jours. Et tu continues de me faire rire et de me soutenir, on partage souvent nos galères et nos problèmes mais ça nous soulage de savoir qu'on a aussi peu de chance l'une que l'autre. Le malheur des uns fait le bonheur des autres comme on dit. On ne peut pas s'ennuyer avec toi et j'ai eu l'occasion de m'en rendre compte durant mes séjours avec toi. On ne se voit pas souvent et on ne se parle pas tous les jours mais je sais que je peux compter sur vous et que vous serez toujours présentes comme je le serais toujours pour vous. Je vous aime les filles !

Je tiens à remercier le **Dr Mohand Hachemane** (Momo, le S), rencontré en Master, on s'est suivis au BIAM pour faire nos thèses. On s'est épaulés et soutenus, on a failli craquer à de nombreuses reprises mais on a su se remotiver. Après tout, on est des Lederberg. Ta malveillance max et ton humour ont été un plus dans ce périple. On a réussi à aller jusqu'au bout tous les deux et je suis fière de nous ! On se sait, je ne vais pas m'étendre… Finir en plus ?

Merci à **Ryan Monti** (Montipython, Gryan), détenteur d'un BTS transpalette, pour avoir été un ami super, toujours là pour faire redescendre la pression avec des petites blagues, pour ta bonne humeur et ton humour souvent indépendant de ta volonté. Tu es devenu une sorte de Larousse pour nous et beaucoup de notre vocabulaire est inventé par toi. A la ré, je remercie l'univers de t'avoir mis sur mon chemin. La bouteille on la prend et on l'après.

J'adresse mes remerciements aux Miammioums (**Anaïs Blache** (Ananight, Cousteron), **Chloé Carassus** (Mimouche) et **Aurore Bellement-Olympio** (Auroreeeuunh, la Aurore machine), le quatuor infernal… Que dire ? Bah merci, et n'oubliez pas que c'est Dieu qui donne mon bebew. Excellent. Vous avez été mon pilier, ma canne, mon déambulateur, mon charriot. Je vous remercie pour ses soirées endiablées et les fous rires incessants. Vous êtes mes rayons de soleil et je sais que lorsque je suis avec vous, il ne fait jamais sombre. Je l'ai déjà dit 200 fois mais vous m'avez tellement soutenue et accompagnée, vous répondiez toujours présentes et vous avez pu apporter votre aide aussi bien sur des problèmes scientifiques et personnelles et je vous en suis reconnaissante. Vous êtes vraiment un plus pour le monde scientifique, vous le savez. ATR. Vous êtes mes gars sûrs, celles sur qui je peux compter et qui me donnent toujours

le sourire. Je vous love mes Queens. Merci aussi à Mathieu, le mari d'Aurore, ce faux belge que j'adore et qui me fait tellement rire. Vous êtes des personnes à la fois sensibles et complètement dérangées mais je vous admire pour ce que vous êtes et ce que vous avez fait de moi. L'aventure de la thèse prend bientôt fin mais j'espère que la nôtre ne fait que commencer.

Merci, merci, MERCI à **Romane** (ocry) et **Léo** (le veau), vous rencontrer a été l'une des plus belles choses de cette aventure. J'ai trouvé en vous des amis remarquables, complètement glingués et amdourables. Il me vient tellement de souvenirs quand je pense à vous que je ne saurais par où commencer mais je chéris chacun de ces souvenirs et j'espère qu'il nous en reste des millions à partager. Cœur sur vous les minous.

Il est évident que sans les membres de ma famille, je ne serais pas là non plus. **Marraine** et **Alain** vous avez toujours suivi de loin mon parcours et vous avez toujours été fiers de moi et je vous en remercie !
Je remercie aussi ceux qui ne sont plus là mais qui ont toujours cru en moi et qui continuent de veiller sur moi depuis là où ils sont, **Papilou** et **Mamé**…
Merci à **Laura le Rat** d'être Laura le Rat, dans le fond c'est quand même sympa de t'avoir comme soeur.

Manie chérie, d'aussi loin que je puisse me souvenir, tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours remontée le moral dans les moments moins sympas. Tu m'as ouvert les portes de ta petite maison à chaque fois que j'en avais besoin et tu as toujours été aux petits soins avec moi. J'aime cette complicité qui nous lie, discuter avec toi de tout et de rien, rire de nos péripéties constantes et de nos malheurs. Merci pour tout Brigitte, depuis toujours, tu es la meilleure et je t'aime.

Je remercie du fond du cœur le Nisme, **Papounisme** pour les moments de décompression et nos moments de folie déraisonnée. Mais aussi pour ton encouragement quotidien et de m'avoir toujours soutenue, même quand je doutais de moi. Finalement d'avoir cru en moi que ce soit dans les études ou dans les boulots d'été. Avec ces expériences et avec toi, j'ai appris à m'organisation, à m'exprimer face à des inconnus, à rester attentive et à travailler dans l'urgence et la pression. Mais ça reste pour moi des souvenirs impérissables car ils étaient accompagnés de moments à tous les deux. Je t'aime Papa. Et merci aussi à Chatran pour l'amour qu'il m'apporte.

Des remerciements ne sont pas suffisants pour te démontrer toute ma gratitude et il n'y a pas assez de mots dans ce monde pour te dire combien je te suis reconnaissante **Valzou**. Reconnaissante pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi. Tu as fait de moi celle que je suis aujourd'hui et je le dois à ton amour et à tes sacrifices. Depuis le tout premier jour, tu as été mon pilier, ma source de force et de tendresse. Tu m'as toujours soutenue dans mes décisions même les plus farfelues (la thèse) et jamais tu ne m'as laissée. Au contraire, tu as su être présente à chaque fois et peu importe les circonstances. Tu as été et tu es mon moteur pour avancer et ne jamais abandonner. Tu m'as donnée la force et la motivation d'arriver au bout de cette aventure. En étant présente tous les jours, si ce n'est toutes les heures… Je sais que je ne te le dis pas tous les jours, mais je veux que tu saches à quel point j'ai conscience de la chance que j'ai de t'avoir comme maman. Je ne vais pas m'étendre car tu sais déjà tout. Je t'aime infiniment Maman

des belettes. Et je remercie aussi **Bikou** d'avoir supporté les milliers d'heures qu'on a passé au téléphone Valzou et moi mais aussi pour la rendre heureuse et prendre soin d'elle quand je ne peux pas être là… Merci aussi à **Mada**, **Maé** et **Nenette** !

Dr. Thomas Payet, Thomo, Bae, mon Golden Ratrailleveur, je remercie infiniment toutes les personnes citées jusque-là et elles ont toutes joué un rôle important dans l'accomplissement de cette thèse mais il est évident que sans toi, il n'en serait rien. Tu m'as déjà accompagnée dans bien des épreuves et jamais tu ne m'as laissée tomber. Cela fait bientôt 6 ans et demi que tu subis mes rédactions de rapport, mes répétitions d'oraux, mais là, ça a été tout autre chose et je t'en suis éternellement reconnaissante. Je sais que sans ton soutien, ton aide et ta foi en moi, le chemin aurait été encore plus escarpé mais tu as su me donner le souffle nécessaire pour gravir cette montagne, quitte à me porter sur les rochers les plus raides. Merci d'avoir supporté mon caractère et mes sauts d'humeur et de ne jamais m'avoir lâché la main. Prêt pour la prochaine aventure copilote ? Je t'aime plus que trois fois mille.

Et pour finir, je tiens à remercier chaleureusement les trois amours de ma vie, mon **Loulou** (JabberMooguy, Louthrandir, une minute), **Pim's** (Boubimbou, Pimipum, Pimousse) et **Mitou** (Zarguen Zourguen, la mère supérieur, une bulle…). Ils ont été sources de réconfort et de distraction. Vous m'avez apportée tant d'amour et de ronrons durant toutes ces années. On ne s'est pas tous rencontrés en même temps et nos histoires n'ont pas été évidentes dès le début mais vous avez su me donner votre confiance. Il n'empêche que des fois vous oubliez d'où vous venez (la route et la spa…) alors je vous demanderai un peu plus de reconnaissance envers votre pauvre mère qui fait tout pour vous… Néanmoins, ma vie serait terriblement triste sans vous et je vous aime d'un amour inconditionnel mes bébés chats.

Beaucoup de personnes m'ont portée et accompagnée jusqu'au bout de cette aventure et comme vous l'aurez compris, j'aime toutes ces personnes et beaucoup sont indispensables à mon bonheur. Alors, je termine en remerciant notre plus chère amie à tous, **la Vie**, d'avoir mis sur mon chemin toutes ses personnes exceptionnelles. Mais également de m'avoir donné cette capacité, inutile, de trouver un nombre infini de surnoms.

Et je remercie ceux qui auront tenu jusqu'à la fin de ces remerciements interminables.

Table des matières

Listes des figures **1**

Listes des tableaux **6**

Listes des abréviations **7**

Avant-propos **10**

Introduction **13**

1. Les métaux chez les bactéries 14
1.1. Rôles essentiels des métaux 14
1.2. Le fer 16
1.2.1. Généralités 16
1.2.2. Homéostasie du fer chez les bactéries à Gram positif 17
1.2.2.1. Mécanismes d'acquisition du fer libre 18
1.2.2.2. Mécanismes d'acquisition du fer complexé 21
1.2.2.3. Export 25
1.2.2.4. Régulation 26
1.3. Le zinc 28
1.3.1. Généralités 28
1.3.2. Homéostasie du zinc chez les bactéries à Gram positif 29
1.3.2.1. Mécanismes d'acquisition du zinc libre 29
1.3.2.2. Mécanisme d'acquisition du zinc complexé 31
1.3.2.3. Export 33
1.3.2.4. Régulation 34
1.4. Répartition des métaux chez les bactéries 35
1.4.1. Les mécanismes de stockage du fer et du zinc 35
1.4.1.1. Le fer 35
1.4.1.2. Le zinc 36
1.5. Homéostasie des autres métaux 37
1.6. Etude de la répartition des métaux chez des bactéries isolées 38
1.6.1. Détection par fluorescence 38
1.6.2. Imagerie 39
1.6.2.1. NanoSIMS 39

1.6.2.2. Imagerie par fluorescence à rayon X 40
2. La multicellularité bactérienne 42
2.1. *Quorum sensing* : vers une organisation multi-unicellulaire 43
2.2. Agrégats cellulaires 46
2.2.1. *Vibrio fischeri* 46
2.2.2. Corps fructifères de *Myxococcus xanthus* 48
2.2.3. *Staphylococcus aureus* 50
2.3. Biofilms 52
2.3.1. Cycle de vie 52
2.3.2. Communication au sein du biofilm 54
2.3.2.1. Exemple des *Pseudomonas* 54
2.3.2.2. Homéostasie des métaux et formation de biofilms chez *P. aeruginosa* 55
2.3.2.3. Notion de bien commun et régulation de population 56
2.4. Bactéries filamenteuses 57
2.4.1. Les cyanobactéries 57
2.4.1.1. Formation des filaments 57
2.4.1.2. Accès aux métaux 59
2.4.2. Autres exemples : bactéries câbles et procaryotes magnétotactiques multicellulaires 60
2.4.3. *Streptomyces* 61
3. Les Actinomycetes 62
3.1. Terminologies utilisées chez les champignons 62
3.2. Caractéristiques 62
3.2.1. Classification 62
3.2.2. Morphologies 64
3.2.3. Cycle de vie 66
3.2.3.1. Germination des spores et croissance active 67
3.2.3.2. Croissance aérienne 67
3.2.3.3. Formation des spores et dispersion 70
3.2.3.4. Tension de surface et Streptomyces 72
3.3. Usines de production de métabolites secondaires 79
3.3.1. En interaction avec les Actinomycetes 82
3.4. Les *Actinosynnema* 84
3.4.1. Histoire 84
3.4.2. Intérêts industriels 86
4. Objectif de la thèse 89

Matériels et méthodes 91

1. Cultures bactériennes 92
1.1. Conditions de culture 92
1.2. Vecteurs 93
1.3. Microscopie 94
1.4. Microscope Axio Zoom et confocal 94
1.5. Microscopie électronique à balayage 95
1.6. Microscopie électronique à transmission 95
2. Analyse des métaux par fluorescence à rayon X (XRF) 95
3. Bio-informatique 98
4. Génétique 98
4.1. Techniques usuelles de biologie moléculaire 98
4.2. Construction des plasmides 99
4.1. qPCR 103
4.2. Transformation par conjugaison et recombinaison homologue 100
4.3. Extraction ARN 101
5. Protéomique 105
5.1. Préparation des échantillons de protéome et protéolyse trypsique en gel 106
5.2. Analyse NanoLC-MS/MS 106

Résultats et discussion 109

1. Imagerie des souches 110
2. Nouvelles données sur l'imagerie des synnemata 113
2.1. Microscopie électronique à balayage 113
2.2. Microscopie électronique à transmission 118
3. Répartition des métaux au sein des synnemata 120
3.1. Répartition générale au sein de la structure 121
3.1.1. Données préliminaires 121
3.1.2. Nouvelles analyses 123
3.1.2.1. Répartition des métaux dans un synnemata entier 124
3.1.2.2. Répartition des métaux à l'extrémité du mycélium aérien 131
3.1.2.3. Répartition des métaux au sein de bactéries/filaments 132
4. Identification de gènes impliqués dans l'acquisition et l'exportation du fer et du zinc 140
5. Etude de l'expression de gènes impliqués dans l'import/export du fer et du zinc 144
5.1. Rappels sur les opérons *cnt* et *znu* 145
5.2. Etude de l'expression d'une GFP fonctionnelle chez *A. pretiosum* sous le contrôle d'un promoteur constitutif 146
5.2.1. Vecteur non intégratif 149

5.2.2. Vecteur intégratif 152
5.3. Etude de fusions transcriptionnelles entre des promoteurs d'opérons putatifs et la mNeonGreen 154
6. Etude des protéomes de cultures d'*A. pretiosum* dans différentes conditions 159
6.1. Etude comparative entre les différents protéomes 162
6.1.1. Identification et rôle des 20 protéines les plus abondantes 162
6.1.2. Analyse comparative entre le protéome du milieu $TSB^{1/100ème}$ solide et $TSB^{1/50ème}$ liquide 166
6.1.3. Etude des protéines propres aux synnemata 168
6.2. Recherche de protéines impliquées dans l'import/export du fer et du zinc dans les différents protéomes 169
7. Etude du niveau d'expression de différents opérons impliqués dans l'import/export du fer et zinc 172
8. Etude des gènes et protéines impliqués dans la formation du mycélium aérien et la sporulation chez *A. pretiosum* 177
8.1. Gènes impliqués dans la formation des synnemata et spores 177
8.2. Analyses protéomiques 179
Conclusion générale et perspectives 181
Références bibliographiques 187
Annexe 1 219
Annexe 2 220
Annexe 3 222

Listes des figures

Figure 1 : Diversité fonctionnelle et contenu métallique des métalloprotéines. 15

Figure 2 : Tableau périodique des éléments. 16

Figure 3 : Toxicité du fer et stress oxydant. 17

Figure 4 : Les importeurs majeurs du fer chez les bactéries. 21

Figure 5 : Mécanisme d'acquisition du fer par le système Isd chez S. aureus. 22

Figure 6 : Système d'acquisition des métaux via les métallophores. 23

Figure 7 : Interactions sociales médiées par les sidérophores. 24

Figure 8 : Systèmes d'efflux du fer chez les bactéries. 26

Figure 9 : Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB chez une bactérie Gram négatif. 27

Figure 10 : Représentation de la structure de AdcA chez S. pneumoniae. 30

Figure 11 : Modèle de transport du zinc par les protéines de la famille ZIP. 31

Figure 12 : Régulation du transport du zinc et du fer par l'opéron cnt. 32

Figure 13 : Mécanismes de transport du zinc chez les bactéries à Gram positif. 33

Figure 14 : Représentation des changements de conformation de Zur en réponse au zinc. 34

Figure 15 : Imagerie de la répartition du fer chez des bactéries unicellulaires. 41

Figure 16 : Multicellularité chez les procaryotes. 43

Figure 17 : Quorum sensing chez Vibrio fischeri 45

Figure 18 : Schéma simplifié du lien entre les 2 quorum sensing chez Vibrio fischeri. 47

Figure 19 : Images de corps fructifères de M. xanthus. 49

Figure 20 : Prédation de M. xanthus. 50

Figure 21 : Transcriptome spatial d'un biofilm de E. coli K12. 53

Figure 22 : Cycle de vie du biofilm. 54

Figure 23 : Différences dans les schémas de distribution des métaux révélés par LA-ICP MS. 56

Figure 24 : Structure du filament chez les cyanobactéries. 58

Figure 25 : Bactéries câbles et réorganisation magnétique. 61

Figure 26 : Abondance relative des nouvelles Actinobacteria. 63

Figure 27 : Aperçu du mode de vie des Actinomycetes. 65

Figure 28 : Hétérogénéité multi-échelle chez les micro-organismes filamenteux. 66

Figure 29 : Modèle de l'activation des regroupements de gènes impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques chez Streptomyces. 68

Figure 30 : Orchestration de l'assemblage de la paroi cellulaire et de la division cellulaire. .. 70

Figure 31 : Événements majeurs au cours du développement de Streptomyces. 72

Figure 32 : Opéron ramCSAB de S.coelicolor permettant la biosynthèse de SapB. 74

Figure 33 : Modèle d'intégration des chaplins au sein de la paroi de S. coelicolor. 75

Figure 34 : Images de microscopie électronique à balayage de spores de S. coelicolor. 76

Figure 35 : La formation des bâtonnets chez S. coelicolor. 77

Figure 36 : Modèles d'action des protéines tensioactives dans le développement aérien des champignons et bactéries filamenteux. 78

Figure 37 : Cycle de développement des Actinomycetes. 79

Figure 38 : Liste des composés notables dérivés des Actinobacteria et leur principal mode d'action. 81

Figure 39 : Rôle des Actinomycetes dans le métabolisme des plantes. 84

Figure 40 : Arbre phylogénétique des bactéries du genre Actinosynnema. 84

Figure 41 : Images en microscopie électronique à balayage des synnemata et leurs spores. .. 85

Figure 42 : Caractéristiques génomiques de A. pretiosum X47 et A. mirum 101^{T} 86

Figure 43 : Groupe de gènes biosynthétiques de l'ansamitocine chez A. pretiosum X47. 87

Figure 44 : Illustrations du mécanisme de fluorescence des éléments. 96

Figure 45 : Photographies illustrant les différents montages utilisés pour l'imagerie XRF. ... 97

Figure 46 : Schéma illustrant la séquence ADN intrégrée dans l'ADN chromosomique d'A. mirum et A. pretiosum. 100

Figure 47 : Images de cultures d'A.mirum et pretiosum après 5 jours en milieux solides. ... 111

Figure 48 : Images de cultures d'A.mirum et pretiosum après 5 jours en milieux liquides... 112

Figure 49 : Images en microscopie électronique à balayage des synnemata d'A. mirum déshydratés après 5 jours de culture sur milieu eau/agar. ... 115

Figure 50 : Images de microscopie électronique à balayage de synnemata d'A. pretiosum déshydratés après 5 jours de culture sur eau/agar. ... 117

Figure 51 : Images de microscopie à balayage d'une colonie de 6 jours d'A. pretiosum sur milieu YMG. ... 118

Figure 52 : Images en MET des cellules de synnemata d'A. pretiosum. ... 119

Figure 53 : Images obtenues à la lumière blanche et cartographie de la répartition des éléments. ... 122

Figure 54 : Superposition de la répartition du calcium, du zinc et du cuivre au sein d'une région du mycélium aérien d'un synnemata déshydraté. ... 123

Figure 55 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. mirum ($TSB^{1/100ème}$). ... 125

Figure 56 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. mirum (Eau/agar). ... 126

Figure 57 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. pretiosum ($TSB^{1/100ème}$). ... 127

Figure 58 : Profils d'intensité de fluorescence (%) des éléments obtenues en XRF chez A. mirum et A. pretiosum. ... 128

Figure 59 : Profils d'intensité de fluorescence rapportés au soufre des éléments obtenues en XRF chez A. mirum et A. pretiosum ... 130

Figure 60 : Images XRF de la répartition des métaux au sommet du mycélium aérien d'un synnemata d'A. pretiosum (Eau/agar). ... 132

Figure 61 : Images XRF de la répartition des métaux dans les filaments à l'extrémité d'un synnemata d'A. pretiosum (Eau/agar). ... 133

Figure 62 : Profils d'intensité des différents éléments au sein de filaments à l'extrémité d'un synnemata (Eau/agar). ... 134

Figure 63 : Images XRF de la répartition des métaux dans un filament d'un synnemata d'A. pretiosum et profils d'intensité des différents éléments (Eau/agar). 135

Figure 64 : Images XRF de la répartition des métaux dans un filament d'un synnemata d'A. mirum et profils d'intensité des différents éléments ($TSB^{1/100ème}$)..... 136

Figure 65 : Filament du mycélium aérien « frais » d'A. mirum (cultivé en eau/agar) déposé sur une membrane, cryogénisé puis lyophilisé et enfin observé par nanoXRF. 138

Figure 66 : Schéma des différents clusters codant pour des transporteurs ABC de type ZnuABC. 143

Figure 67 : Prédiction de la structure tridimensionnelle des ZnuA..... 143

Figure 68 : Prédiction de l'interaction entre la protéine hypothétique ZnuX et la séquence additionnelle de la SBP ZnuA 3. 144

Figure 69 : Carte du plasmide pTMW018 avec les différents sites de restrictions et gènes de résistance. 147

Figure 70 : Spectre d'émission et d'excitation de la mNeonGreen..... 148

Figure 71 : Intensité de fluorescence sur des cultures d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformé avec les plasmides pIB139ermEpmNG et pMDV01 en milieu LB solide. 150

Figure 72 : Images au microscope confocal des cultures bactériennes d'A. pretiosum..... 151

Figure 73 : Observation à l'Axio Zoom de synnemata de culture d'A. pretiosum transformé avec le plasmide pIB139ermEpmNG cultivés sur milieu solide pauvre..... 152

Figure 74 : Site d'intégration pour la recombinaison homologue et séquence intégrée. 152

Figure 75 : Images de microscopie confocal sur des cultures bactéries et des synnemata d'A. pretiosum WT et transformant. 153

Figure 76 : Organisation de la région promotrice de l'opéron cnt chez A. pretiosum. 154

Figure 77 : Intensité de fluorescence sur des cultures LB liquide d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformants. 155

Figure 78 : Intensité de fluorescence sur des cultures d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformants en milieu $TSB^{1/100ème}$ liquide 0 µM, 5 µm et 10 µm EDTA..... 156

Figure 79 : Images de microscopie confocale sur des cultures d'A. pretiosum WT et transformants. 157

Figure 80 : Analyse en composante principale des échantillons analysés en protéomique. .. 160

Figure 81 : Diagramme de Venn des protéomes des 4 conditions de culture. 161

Figure 82 : Diagramme de Venn des 20 protéines les plus abondantes de chaque protéome. 163

Figure 83 : Volcano Plot comparant les protéines en milieu solide pauvre vs en milieu liquide pauvre. 167

Figure 84 : Heatmap des protéines impliquées dans le transport du fer ou du zinc détectées en protéomique. 170

Figure 85 : Niveau d'expression par RT-qPCR des gènes impliqués dans l'import et l'export du fer et du zinc. 174

Figure 86 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer et du zinc. 175

Figure 87 : Heatmap des protéines détectées en protéomique et impliquées dans la formation du mycélium aérien et la sporulation. 179

Figure 88 : Représentation schématique du carrefour d'échange des métaux entre deux cellules. 184

Listes des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des différentes conditions de culture mises en place 93

Tableau 2 : Les différents vecteurs et dérivés utilisés. 94

Tableau 3 : Liste des gènes ciblés ainsi que les amorces utilisées pour les qPCR. 104

Tableau 4 : Biomasses (en mg) d'échantillons obtenues pour les analyses protéomiques d'A. pretiosum. 105

Tableau 5 : Gènes putatifs impliqués dans le transport du fer et du zinc chez A. pretiosum. 142

Tableau 6 : Fonctions prédites des protéines communes aux 4 conditions de croissances étudiées. 164

Tableau 7 : Fonctions prédites des 10 protéines spécifiques aux synnemata les plus abondantes. 168

Tableau 8 : Quantité d'ARN16S obtenue par RT-qPCR pour chaque condition de culture.. 173

Tableau 9 : Comparaison des différents systèmes de transport des métaux détectés en RT-qPCR et/ou protéomique. 176

Tableau 10 : Gènes et protéines correspondantes du développement du mycélium aérien et de la sporulation chez A. pretiosum. 178

Listes des abréviations

°C : Degré Celsius

Å : Angstrom

ABC : *ATP Binding Cassette*

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AHL : Acyl-Homoserine Lactone

AP-3 : Ansamitocine P-3

Apm : Apramycine

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messager

ARNnc : ARN non codant

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BET : Bromure d'éthydium

CDF : *Cation Diffusion Facilitator*

c-di-GMP : *Bis-(30,50)-cyclic di-guanylic acid*

Chp : Chaplin

Cq : *Quantification cycle*

Da : Dalton

DtxR : *Diphtheria Toxin Repressor*

EDS : *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

Efe : *Elemental Ferrous iron uptake system*

EF-Ts : Facteur d'élongation thermo stable

EF-Tu : Facteur d'élongation thermo instable

eV : Electronvolt

FDR : *False Discovery Rate*

Fe (Fe^{2+}/Fe^{3+}) : Fer (formes ioniques)

Fec : *Ferric Dicitrate Transport System*

Feo : *Ferrous iron transport system*

Fep : *Ferric Enterobactin Transporter system*

Fhu : *Ferric Hydroxamate Uptake*

Fur : *Ferric Uptake Regulator*

Fut : *Ferric uptake system*

g : Gramme

GAP : *GTPase Activating Protein*

GDP : *Guanosine DiPhosphate*

GEF : *Guanine Exchange Factor*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GlcN-6P : Glucosamine 6-Phosphate

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GTP : Guanosine TriPhosphate

h : Heure

H_2O_2 : Péroxyde d'hydrogène

IdeR : *Iron Dependent Regulator*

Irr : *Iron Response Regulator*

Isd : *Iron regulated Surface Determinant*

L : Litre

LA-ICP MS : Spectrométrie de Masse à Plasma induit par Couplage Inductif par Ablation au Laser

LB : *Lysogeny Broth*

LUT : *Look-Up Table*

m : Mètre

M : Molaire (mol.L-1)

m/z : Masse/charge

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MFS : *Major Facilitator Superfamily*

$MgCL_2$: Chlorure de magnésium

min : Minute

mNG : *mNeonGreen*

MntH : *H^+-dependent Manganese Transport system*

MntR : *Manganese Transport Regulator*

mol : Mole

MS/MS : *Mass spectrometry/Mass spectrometry*

MurNAc : N-acétylmuramique

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NanoSIMS : *Nano Secondary Ion Mass Spectrometry*

NBD : *Nucleotide Binding Domain*

NIS : *NRPS independant synthetase*

NRAMP : *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*

NRPS : *Non Ribosomal Peptide Synthetase*

NSAF : *Normalized Spectral Abundance Factor*

pb : Paire de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

pH : Potentiel Hydrogène

Ppm : Partie par million

PSMs : *Peptides-to-Spectrum Matches*

ram : *Rapid Aerial Mycelium*

Rdl : Rodlin

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

rpm : Rotation par minute

RT-qPCR : *Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction*

SAM : S-adenosylmethionine

SBP : *Substrate Binding Protein*

Si_3N_4 : Nitrure de silicium

Sit : *Salmonella Iron Transport system*

SOD : Superoxyde dismutase

SST3 : Système de Sécrétion de Type 3

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TAG : Triacylglycérols

TMD : *TransMembrane Domain*

TSB : *Tryptic Soy Broth*

U.A : Unité arbitraire

UTR : *UnTranslated Region*

UV : Ultraviolet

V : Volt

WT : *Wild Type*

XRF : *X-Ray Fluorescence*

Yfe : *Yersinia ferrous iron transport system*

YMG : *Yeast extract, Malt extract and glucose*

ZIP : *ZRT-, IRT-like protein*

Zn (Zn^{2+}) : Zinc (forme ionique)

ZupT : *Zinc Uptake Transporter*

Zur : *Zinc Uptake Regulator*

Avant-propos

Au cours de ces dernières années, le groupe dans lequel j'ai effectué ma thèse s'est intéressé à l'acquisition des métaux, et particulièrement à un métallophore qui permet l'acquisition et l'absorption des métaux tels que le fer, le zinc ou le cobalt. Ce métallophore semble occuper une place importante au sein de la communauté bactérienne. En effet, il a d'abord été découvert chez *Staphylococcus aureus* (staphylopine), *Pseudomonas aeruginosa* (pseudopaline), *Yersinia pestis* et *pseudotuberculosis* (yersinopine), qui sont des bactéries pathogènes, et a également été identifié dans d'autres bactéries, telles que des bactéries environnementales. Deux d'entre elles ont particulièrement retenu notre attention, car en plus d'un opéron complet (opéron *cnt*) pour la production et la sécrétion de staphylopine, elles possèdent un gène codant une méthyltransférase permettant la méthylation de ce métallophore. Ces deux bactéries, *A. mirum* et *A. pretiosum*, sont toutes deux des bactéries du sol de la classe des *Actinomycetes,* découvertes et décrites dans les années 1975 et notamment étudiées dans le domaine de l'industrie pour leur capacité à produire des molécules antibiotiques et anti-tumorales. Outre le fait qu'elles présentent le gène d'une méthyltransférase dans l'opéron *cnt*, elles ont su attiser notre curiosité en raison de leur capacité à former des structures aériennes multicellulaires de plusieurs dizaines de µm. Ces petites structures, appelées des synnemata, se composent en trois parties : un mycélium végétatif en contact direct avec le substrat d'où proviennent les nutriments, un hyphe érigé et un mycélium aérien. Les bactéries capables de multicellularité sont plus répandues que ce que l'on pense. Elle apporte un avantage évolutif et communicatif au sein d'un groupe d'individus. De nombreuses bactéries relativement bien connues et étudiées sont capables de multicellularité. C'est le cas de *P. aeruginosa* ou *Bacillus subtilis* qui forment des biofilms, des cyanobactéries qui forment des chainettes dont certaines cellules sont différenciées pour l'acquisition de l'azote, ou encore certaines Actinobacteria qui forment des filaments bactériens de plusieurs millimètres.

Cette multicellularité soulève de nombreuses questions et repousse les connaissances jusqu'ici acquises quant au partage et à l'accès aux ressources par les bactéries. De nombreuses études s'intéressent à l'acquisition des nutriments et aux différents mécanismes mis en place par les bactéries. Ces études portent généralement sur des cultures de bactéries en mode de vie planctonique où l'acquisition et l'accès aux ressources sont facilités. Beaucoup d'études

s’intéressent également à ce phénomène dans des structures multicellulaires plus complexes comme les biofilms ou chez des bactéries filamenteuses. À la différence des synnemata, la plupart des structures multicellulaires étudiées se développent dans des environnements aqueux ou au sein d’une matrice où l’accès aux ressources est possible *via* des surfaces d’échange correspondant à l’ensemble de la cellule. Ici, l’aspect aérien des synnemata sous-entend que les cellules doivent nécessairement mettre en place des mécanismes permettant de partager les nutriments essentiels à leur développement tout au long de la structure et ce à partir du « sol » ou substrat de croissance.

Il existe un grand nombre de nutriments essentiels au développement des bactéries, parmi lesquels on retrouve les métaux, qui sont indispensables à de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la respiration ou la fixation de l’azote. Parmi ces nutriments, on compte le fer, le zinc, le soufre, le cuivre, le cobalt et le manganèse. Leur acquisition depuis l’environnement est donc primordiale, et les bactéries ont mis au point des mécanismes finement régulés et adaptés pour permettre l’acquisition et l’export de ces nutriments. Parmi ces mécanismes, les mieux caractérisés sont les transporteurs ABC de fer ou de zinc, ainsi que des transporteurs faisant appel à des métallophores spécifiques du zinc ou des sidérophores (métallophores spécifiques du fer). Les métallophores sont de petites molécules sécrétées par la bactérie et réimportées lorsqu'elles sont en contact avec le métal recherché. Une fois sécrétés dans le milieu, niche écologique ou matrice, ils deviennent un bien commun et peuvent être partagés avec tous les individus. Il existe à ce jour plusieurs techniques permettant l’étude et l’analyse de ces métaux au sein d’une structure bactérienne ou d’une cellule isolée en temps réel. Certaines de ces techniques nous ont servi pour essayer de répondre aux quelques questions principales que nous avions : quelle est la répartition des métaux au sein de ces structures aériennes ? Les métaux sont-ils aussi concentrés aux extrémités des filaments qu’à la base ? Si oui, quels sont les mécanismes mis en place par *A. mirum* et *A. pretiosum* pour faire transiter les métaux tout au long de leurs synnemata ? Existe-t-il des mécanismes de partage de ces métaux essentiels dans un synnemata ? Dans ces synnemata quel est le niveau d’expression des transporteurs de métaux ?

Ces questions ont structuré l’introduction de ce manuscrit, qui dans une première partie s’attache à évaluer le rôle des métaux et des transporteurs impliqués dans leur homéostasie. La deuxième partie décrit des exemples de multicellularité dans le monde bactérien pour mieux appréhender l’organisation multicellulaire que l’on retrouve dans notre modèle pour enfin se

focaliser dans une troisième et dernière partie sur une description de notre modèle d'étude et des bactéries apparentées.

Introduction

1. Les métaux chez les bactéries

1.1. Rôles essentiels des métaux

L'origine de la vie sur Terre est une question fondamentale. Depuis toujours de nombreux scientifiques et amateurs de la théorie de l'évolution s'interrogent sur le rôle joué par les éléments dans l'émergence de la vie. C'est en effet ce qui est suggéré par des études stipulant que la vie sur Terre pourrait être liée à la présence des métaux (Rossetto and Mansy, 2022; Nitschke et al., 2024). L'augmentation du dioxygène terrestre a provoqué des modifications géochimiques drastiques, en particulier en ce qui concerne les métaux. Le fer, auparavant majoritaire sous sa forme Fe^{2+}, s'est oxydé pour devenir insoluble sous sa forme Fe^{3+}. A l'inverse d'autres métaux tels que le cuivre sont devenus plus accessibles en passant d'une forme Cu^{+} à Cu^{2+} (Enriquez and Do, 2012). De la même manière, la biodisponibilité du zinc sous forme ionique a augmenté au sein des océans, contribuant à l'adaptation des cellules à leur environnement et favorisant l'apparition de domaine de fixation du zinc dans la structure des protéines (Mulkidjanian and Galperin, 2010).

Sous forme d'ions métalliques, les métaux jouent des rôles essentiels dans de nombreuses activités cellulaires bactériennes. Ils sont impliqués dans la synthèse de macromolécules biologiques, dans des processus enzymatiques et la transduction de signaux (Rossetto and Mansy, 2022). Les métaux permettent également la protection contre des agressions environnementales en agissant, par exemple, sur le stress oxydant par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme qui fonctionne en fixant des métaux tels que le fer (FeSOD), le zinc ou le cuivre (CuZnSOD)(Culotta et al., 2006). Plus précisément, et comme décrit plus haut, les métaux prennent également part à la structure même des protéines en formant des métalloprotéines, représentant près de la moitié des protéines impliquées dans le métabolisme (Figure 1) (Andreini et al., 2008; Wilson et al., 2004).

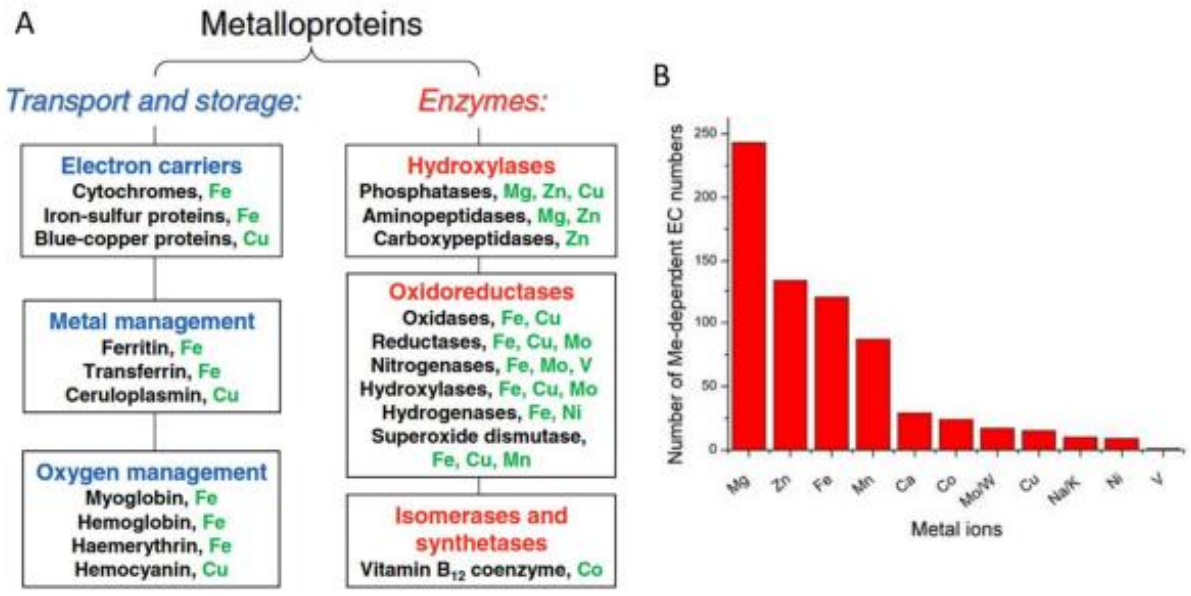


Figure 1 : Diversité fonctionnelle et contenu métallique des métalloprotéines.

(A) Classification des métalloprotéines selon leur fonction. Le cofacteur métallique impliqué est précisé en vert. D'après (Wilson et al., 2004). (B) Proportion de divers ions métalliques catalytiques contenus dans des métalloenzymes de structures connues. Le numéro EC (EC number) définit une réaction catalytique donnée. D'après (Andreini et al., 2008).

Parmi ces métaux, le fer figure parmi les plus importants. Sa capacité à passer d'une forme oxydée (Fe^{3+}) à une forme réduite (Fe^{2+}, forme biodisponible) fait de lui un élément décisif dans les mécanismes impliquant des transferts d'électrons. Le zinc fait également partie des principaux métaux essentiels. Chez les eucaryotes, près de 10% des protéines incluraient un site de fixation au Zn, contre 6% chez les procaryotes, représentant globalement plusieurs milliers de protéines (Andreini et al., 2006). Au cours de ma thèse j'ai été amenée à étudier la répartition des métaux au sein d'une structure bactérienne complexe, notamment en essayant d'évaluer le niveau de transcription de certains transporteurs de métaux. Devant la quantité et la diversité des transporteurs de métaux, j'ai décidé de me centrer principalement sur le fer et le zinc. Cette partie du manuscrit se focalisera donc essentiellement sur ces deux métaux (Chandrangsu et al., 2017) et les mécanismes de transport des autres métaux divalents seront brièvement abordés. Par ailleurs, cette partie introductive se focalisera essentiellement sur l'homéostasie des métaux chez les bactéries à Gram-positif étant donné que les bactéries étudiées au cours de cette thèse font partie de cette catégorie.

1.2. Le fer

1.2.1. Généralités

Le fer est un métal appartenant au groupe des métaux de transition au sein du tableau périodique des éléments (Figure 2).

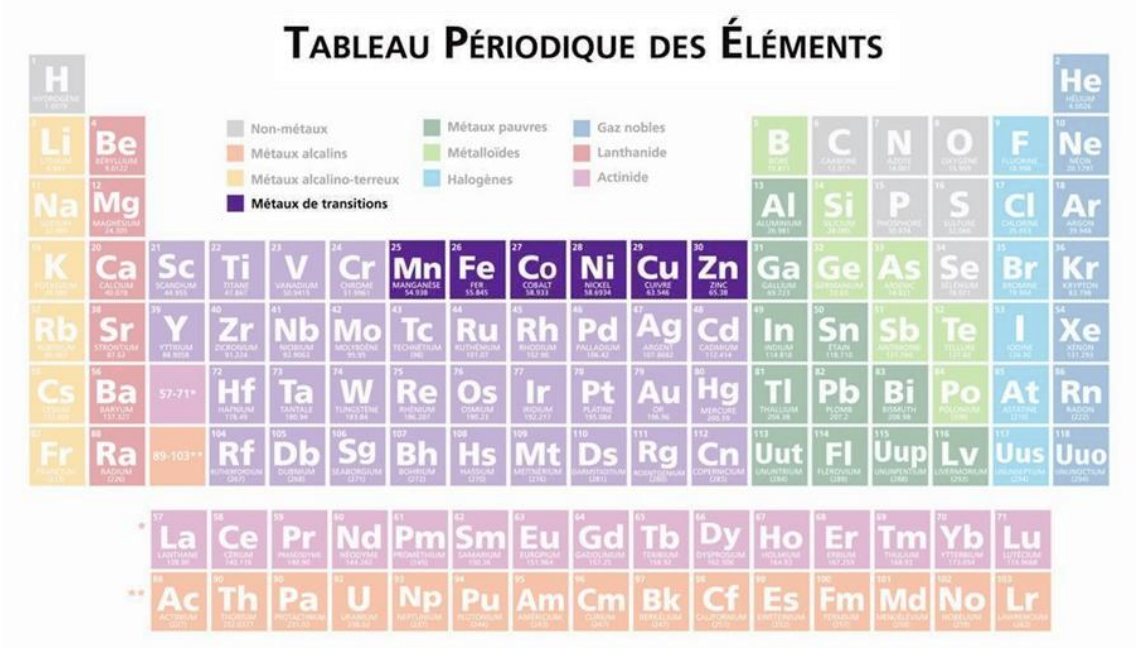


Figure 2 : Tableau périodique des éléments.

Les éléments de transition forment un groupe important en raison de leur structure atomique. En effet, leur couche électronique incomplète leur confère la capacité de former des cations ainsi que des liaisons covalentes avec d'autres éléments. Ainsi, ces métaux peuvent se lier de manière structurale à de nombreuses protéines et participer à divers processus cellulaires.

D'un point de vue quantitatif, le fer représente l'élément le plus abondant sur Terre, et forme une grande partie du noyau terrestre (Ilbert and Bonnefoy, 2013). Il se place devant l'oxygène avec une abondance de près de 32% contre 30% pour l'oxygène. Dans l'environnement, ses formes majoritaires sont le fer réduit (Fe^{2+}, soluble et biodisponible) et le fer oxydé (Fe^{3+}, insoluble) (Williams, 2012). Le passage de la forme ferreuse (Fe^{2+}) à la forme ferrique (Fe^{3+}) se fait par l'intermédiaire d'une réaction d'oxydo-réduction.

Ces réactions sont indispensables aux métabolismes de nombreux organismes en prenant part à des processus tels que la respiration ou la photosynthèse (Kosman, 2019). Si le

fer est essentiel au développement de tous les organismes vivants, il est également associé à des effets nocifs à fortes concentrations.

Le principal effet toxique connu du fer est la réaction de Fenton, également retrouvée avec le cuivre. Un excès de fer, sous sa forme Fe^{2+}, peut interagir avec du peroxyde d'hydrogène dans la cellule favorisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que des ions superoxydes (Cadenas, 1989; Stohs and Bagchi, 1995). Par l'intermédiaire du cycle d'Haber-Weiss, ces produits vont eux-mêmes participer à la formation de radicaux hydroxyles, hautement réactifs, causant d'importants dommages à tous les composants de la cellule. Par ajout de groupements peroxyles, la structure des lipides est modifiée ce qui altère leur incorporation dans la membrane. Les groupements hydroxyles de protéines vont être oxydés, de même que l'ADN provoquant des mutations du génome, également appelé génotoxicité (Figure 3).

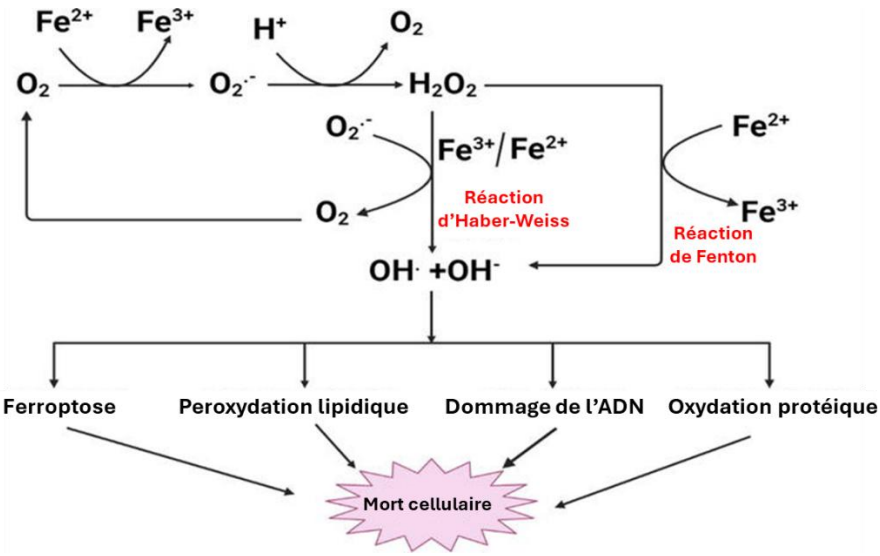


Figure 3 : Toxicité du fer et stress oxydant.

1.2.2. Homéostasie du fer chez les bactéries à Gram positif

L'homéostasie des métaux correspond à l'ensemble des mécanismes mis en place par la cellule pour maintenir la concentration intracellulaire de ces derniers autour de valeurs physiologiques. Ces mécanismes impliquent des systèmes hautement régulés d'import, d'export et de stockage des métaux dans la cellule.

Dans l'environnement, la concentration des nutriments fluctue d'un écosystème à un autre. Pour autant, certaines bactéries sont capables de se développer dans des environnements extrêmes, très pauvres en nutriments comme les eaux salées ou les déserts par exemple. Dans le cadre des métaux, les bactéries sont ainsi confrontées à un défi majeur et doivent maintenir l'homéostasie de ces derniers pour prospérer. C'est le cas du fer dont la proportion biodisponible est extrêmement variable, entre des environnements qui peuvent être riches en fer soluble (environnement anoxiques par exemple) et d'autres où le fer est quasiment absent ou bien très peu biodisponible (en présence d'oxygène ou bien à l'interface hôte/pathogène par exemple) (Williams, 2012). Les bactéries régulent donc la mise en place de mécanismes d'acquisition et d'export du fer pour pallier ces variations de concentration ce qui fera l'objet des trois prochaines sous-parties.

1.2.2.1. Mécanismes d'acquisition du fer libre

Chez les bactéries, les métaux, sous forme libre, doivent nécessairement passer à travers la membrane cellulaire. A ce jour, plusieurs transporteurs du fer ont été mis en évidence chez les bactéries à Gram-positif. Ils incluent les transporteurs FutABC et YfeABCDE, MntH, ZupT, IroT, EfeUOB et les systèmes Feo (Brown et al., 2021).

1.2.2.1.1. Les transporteurs ABC

La principale famille de transporteurs du fer chez les bactéries correspond aux transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) (Figure 4). Ils sont composés de deux domaines transmembranaires (*TransMembrane Domain*, TMD), qui constituent le canal de translocation du substrat, et de deux domaines d'hydrolyse de l'ATP (*Adenosine Tri-Phosphate*) ou de liaison aux nucléotides (*Nucleotide Binding Domain*, NBD), qui fournissent l'énergie nécessaire à la translocation du ou des composés. Ils sont caractérisés par la même architecture modulaire avec les deux TMD en hélices α complexées aux deux NBD. Chez les procaryotes, les transporteurs ABC sont localisés sur la membrane plasmique et l'hydrolyse de l'ATP se fait du coté cytoplasmique. Il existe 3 familles de transporteurs ABC : les importateurs de type I ou de type II et les transporteurs à facteur de couplage énergétique (*Energy Coupling Factor*, ECF) ou importateurs de type III (Lewinson and Livnat-Levanon, 2017; ter Beek et al., 2014). Les importateurs de type I et II dépendent d'une *Substrate Binding Protein* (SBP) qui lie le substrat dans le milieu extracellulaire et le délivre aux TMD. Dans les importateurs de type III, la fixation du substrat est réalisée grâce à un domaine hydrophobe intégré à la membrane (Theodoulou and Kerr, 2015).

Pour le transport des métaux, ce sont les importateurs de type II qui sont utilisés. Les SBP rattachées à ces transporteurs présentent différentes structures tridimensionnelles qui leur permettent de fixer les métaux soit sous forme libre soit sous forme complexée (Berntsson et al., 2010). Ces protéines se composent de deux domaines reliés par une région charnière. Les sites de fixation restent dans une configuration ouverte jusqu'à fixation du ligand. Une fois ce dernier lié, la SBP délivre le ligand au TMD puis celui-ci passe à travers le canal grâce à un changement de conformation induit par l'hydrolyse de l'ATP au niveau cytoplasmique.

Certains transporteurs ABC sont capables de transporter plusieurs métaux. C'est le cas des systèmes *Yersinia ferrous iron transport* (Yfe) ABCD et *Salmonella iron transport* (Sit) ABCD qui sont homologues et importent le fer mais également le manganèse. Chez *Yersinia pestis* YfeA correspond à la SBP qui lie le fer, avec une faible affinité, et le manganèse, avec une forte affinité. YfeC et YfeD assure le transport membranaire du métal grâce à l'hydrolyse de l'ATP par YfeB (Bearden and Perry, 1999). Dans le cas des systèmes SitABCD, le fer est transporté avec une plus forte affinité que le manganèse (Sabri et al., 2006). Néanmoins des études ont démontré que des mutants pour ces systèmes n'induisaient qu'une diminution modérée de la croissance bactérienne suggérant que d'autres transporteurs sont aussi impliqués dans l'homéostasie du fer (Bearden and Perry, 1999). Le système *ferric uptake* (Fut) ABC est quant à lui uniquement dédié au transport du fer. Il se compose de deux SBP (FutA1 et FutA2), une perméase FutB et une ATPase FutC. Les deux SBP présentent 52% d'homologie et possèdent vraisemblablement des rôles différents dans l'import du fer puisqu'une délétion de FutA1 ou FutA2 induit une diminution de l'acquisition du fer de 37% et 84% respectivement (Katoh et al., 2001).

1.2.2.1.2. Le système H+-dependent manganese transport (MntH)

Ce système possède environ 36% d'homologie de séquence avec le système de transport eucaryote du fer, le système NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*). Le système MntH se compose de dix hélices α formant un pore à travers la membrane. Il assure préférentiellement le transport du manganèse (Mn^{2+}) qui interagit directement avec le transporteur. Des études ont montré que le fer, ainsi que le cadmium, le cobalt, le zinc, le nickel et le cuivre pouvaient être transportés par MntH selon le degré d'affinité suivant : $Mn^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+}$ (Figure 4) (Makui et al., 2000).

1.2.2.1.3. Les Zinc Uptake Transporter (ZupT)

Ils appartiennent à la famille des *ZRT-*, *IRT-like protein* (ZIP) qui assurent majoritairement le transport du zinc. Ils ont une structure ressemblant à celle des transporteurs MntH avec huit hélices α qui forment un pore à niveau de la membrane et qui contient un noyau binucléaire (Zhang et al., 2017). Bien que les mécanismes de transport des métaux par ZupT ne soient pas bien compris, il semblerait que ce dernier fonctionne à la manière d'une perméase et permet le transport de nombreux métaux en dehors du zinc comme le fer, le cobalt et le manganèse (Figure 4). Pour autant, ce transporteur n'est que très faiblement présent au niveau de la membrane et ne participe donc que minoritairement au maintien de l'homéostasie du fer (Grass et al., 2005).

1.2.2.1.4. Le système Elemental ferrous iron uptake (EfeUOB)

Retrouvé majoritairement chez les bactéries pathogènes, ce système assure spécifiquement le transport du fer (Cao et al., 2007). Il se compose d'une protéine transmembranaire EfeU, agissant comme une perméase et de deux protéines extracellulaires EfeO et EfeB (Figure 4). Ce système semble transporter à la fois le fer sous sa forme réduite (Fe^{2+}) que sa forme oxydée au travers d'une mécanisme « dual ». Ainsi, un modèle proposé chez *Bacillus subtilis* suggère que EfeU et EfeO fonctionnent en tandem pour l'import du fer sous sa forme ferrique. EfeB fonctionne comme une oxydase qui catalyse l'oxydation du fer (Fe2+) en fer (Fe3+) qui peut alors être pris en charge par le transporteur membranaire EfeUO (Miethke et al., 2013).

1.2.2.1.5. Le système ferrous iron transport (Feo)

Le système Feo transporte exclusivement le fer réduit (Fe^{2+}) et se compose de trois protéines différentes : FeoA et FeoC, des protéines cytoplasmiques de petites tailles, et FeoB, une protéine transmembranaire qui possède une activité GTPase (Figure 4) (Lau et al., 2016). Les rôles de FeoA et FeoC ne sont pas très bien caractérisés. FeoA possède un domaine SH3-like qui lui permettrait d'interagir avec une *GTPase Activating Protein* (GAP) ou une *Guanine Exchange Factor* (GEF) et permettre ainsi à FeoB de fonctionner. De son côté, FeoC fixerait le fer cytoplasmique et jouerait un rôle dans la régulation de la transcription des mécanismes de transport du fer par l'intermédiaire d'un motif en hélice-boucle-hélice (Hung et al., 2012; Linkous et al., 2019).

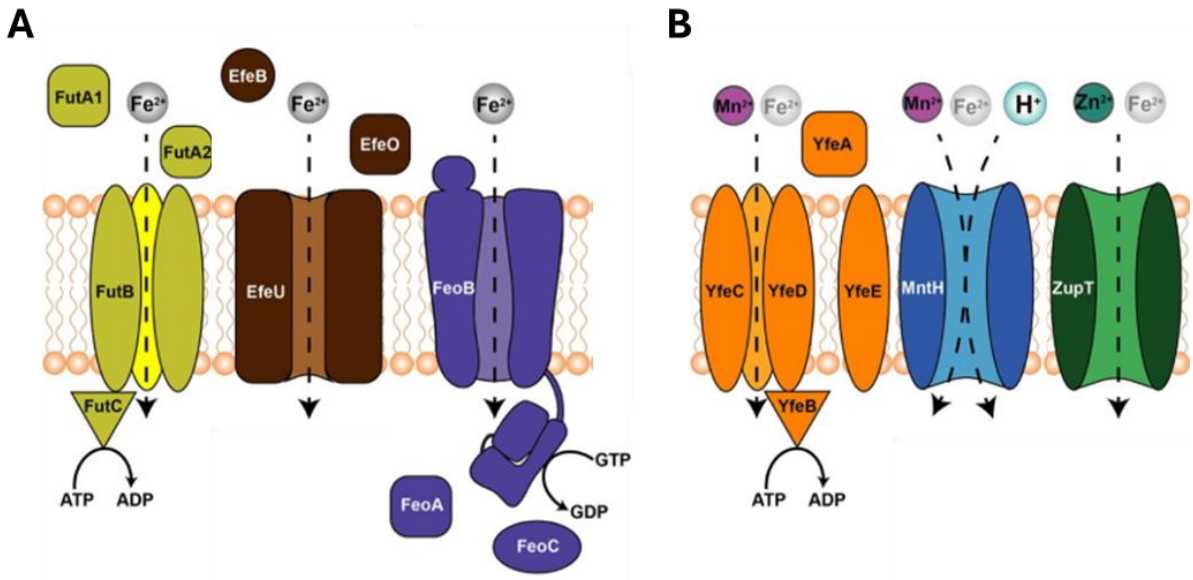


Figure 4 : Les importeurs majeurs du fer chez les bactéries.
Les transporteurs peuvent divisés en deux catégories : (A) ceux dédiés au transport du fer (FutABC, EfeUOB, FeoABC) et (B) ceux dédiés aux transports de plusieurs métaux dont le fer (YfeABCD, MntH, ZupT) (inspiré de (Brown et al., 2021)).

1.2.2.2. Mécanismes d'acquisition du fer complexé

Lorsque le fer est sous forme oxydée (*i.e.*, sous forme précipité et donc très peu disponible) ou bien qu'il est déjà sous forme de complexe (comme dans l'hème par exemple), des mécanismes différents de ceux décrits pour les formes libres se mettent en place. Ces mécanismes correspondent soit à l'import d'une molécule déjà complexée au fer, soit à la synthèse et l'export de chélateur capables d'extraire le fer, et c'est alors ce complexe qui est importé dans la cellule. A l'instar des mécanismes d'acquisition directs du fer, le transport du fer complexé doit néanmoins passer à travers la membrane cellulaire grâce à des transporteurs ABC.

1.2.2.2.1. Utilisation de l'hème

L'hème, composé d'un anneau de porphyrine complexé avec du fer, joue un rôle essentiel en tant que cofacteur dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans le transport de l'oxygène via l'hémoglobine. Il représente environ 70 % de la teneur totale en fer chez l'Homme (Runyen-Janecky, 2013). Le système d'acquisition du fer par l'intermédiaire de l'hème est particulièrement répandu chez les bactéries pathogènes. Il correspond à l'utilisation d'une molécule d'hème endogène (synthétisée par la bactérie) ou directement issu de l'hôte *via* une molécule d'hémoglobine (Choby and Skaar, 2016). Dans les deux cas, les bactéries utilisent des récepteurs et des transporteurs qui facilitent la translocation de cette molécule vers

l'intérieur de la cellule (Huang and Wilks, 2017). Chez les bactéries à Gram positif, le système d'acquisition de l'hème le plus décrit est le système Isd (*Iron regulated Surface Determinant*) chez *Staphylococcus aureus*. Ce système comprend 10 protéines qui agissent ensemble pour acquérir le fer d'une molécule d'hème libre, contenue dans l'hémoglobine ou bien du complexe hémopexine/hémoglobine. IsdA et IsdB sont ancrées à la surface de la membrane cellulaire via des sortases et lient l'hémoglobine. IsdB extrait l'hème de l'hémoglobine pour le transférer ensuite à IsdA avant de transiter vers IsdC qui assure la translocation de l'hème vers la membrane. C'est ensuite IsdE qui assure la translocation membranaire de l'hème (Pishchany et al., 2014). Une fois dans la cellule, l'hème est dégradé par des oxygénases (IsdGI) libérant le fer alors utilisable par la cellule (Figure 5).

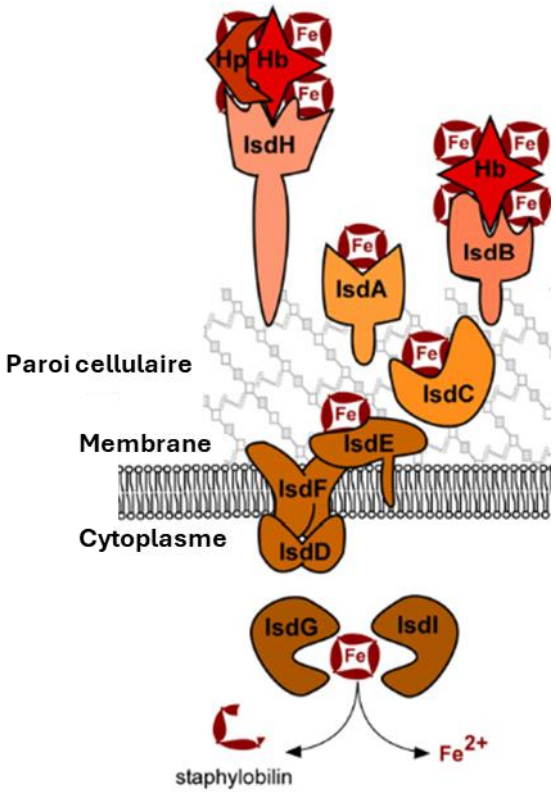


Figure 5 : Mécanisme d'acquisition du fer par le système Isd chez S. aureus.
IsdH est le principal récepteur du complexe hémoglobine/hémopexine tandis que IsdB est le principal récepteur de l'hémoglobine. IsdA peut se lier à l'hème libre ou accepter l'hème de IsdB et IsdH. L'hème est transféré à IsdC, qui est incorporé dans la paroi cellulaire et transmet l'hème au complexe membranaire IsdDEF. IsdDEF transporte l'hème vers le cytoplasme pour une utilisation intacte ou pour une dégradation par les hémooxygénases IsdG/I qui libèrent le fer (Choby and Skaar, 2016).

1.2.2.2.2. Les sidérophores

Chez les bactéries, un système de chélation des métaux existe par l'intermédiaire de métallophores. Ce sont de petites molécules (généralement inférieures à 1 kDa) organiques produites par les organismes, tels que les bactéries, les champignons ou les plantes. Ils ont une forte affinité pour un métal spécifique, souvent essentiel tel que le fer, le zinc ou le cuivre (Hofmann et al., 2020). Le fonctionnement de ces chélateurs s'organise en cinq étapes : la biosynthèse du métallophore à l'intérieur de la cellule, sa sécrétion vers l'environnement extracellulaire, sa liaison à un ion métallique avec qui il forme alors un complexe, la récupération du complexe métallophore-métal et enfin la libération du métal dans la cellule (Figure 6).

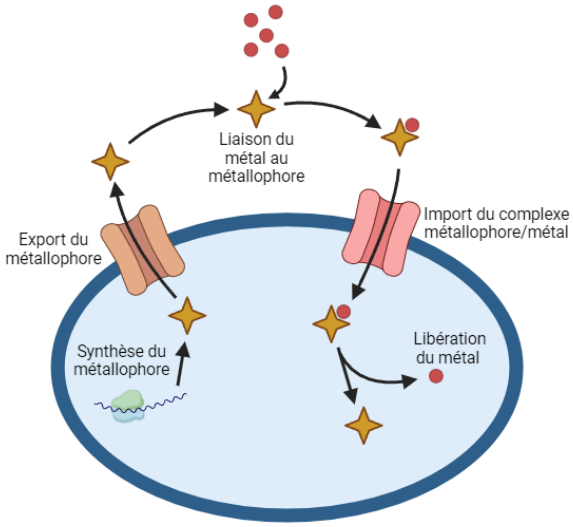


Figure 6 : Système d'acquisition des métaux via les métallophores.

La première étape de synthèse du métallophore est induite au cours d'une carence en métal. Deux voies existent : une voie dépendante du complexe *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) et une voie indépendante du complexe NRPS (NRPS *independant synthetase*, NIS) (Barry and Challis, 2009). Les NRPS sont des complexes multienzymatiques à la fois impliqués dans la synthèse de peptides indépendamment des ribosomes ou d'une matrice ribonucléique (Iacovelli et al., 2021). L'export du métallophore hors de la cellule met en jeu deux familles de protéines : les MFS (*Major Facilitator Superfamily*) et les transporteurs ABC. Une fois dans le milieu extracellulaire, le métallophore fixe le métal pour lequel il est le plus spécifique. Le complexe métal/métallophore doit ensuite être récupéré par la cellule et ceci par l'intermédiaire d'un transporteur ABC. Enfin, une fois dans la cellule, plusieurs

mécanismes existent pour dissocier le métal de son chélateur. Cela peut se faire par l'hydrolyse du métallophore, la modification de sa structure ou enfin son recyclage (Ge and Sun, 2014).

Chez les bactéries, il existe de très nombreux métallophores qui varient en fonction de leur structure et surtout de leur capacité chélatrice (Hofmann et al., 2020). De cette manière, chaque métallophore est en théorie capable de fixer spécifiquement un ion métallique : sidérophore pour le fer, zincophore pour le zinc ou chalkophore pour le cuivre. Pour les sidérophores, il en existe plus de cinq cents connus répartis dans des écosystèmes variés (sol, eau marine, végétaux et chez certains animaux). Parmi les sidérophores les plus étudiés, on retrouve la yersiniabactine, produite par *Y. pestis*, ou l'enterobactine, produite par *Streptomyces* spp. (Hofmann et al., 2020). D'autres bactéries du genre *Streptomyces* produisent la desferrioxamine, un sidérophore utilisé en tant que chélateur de fer dans certaines pathologies (Barona-Gómez et al., 2006; Eto et al., 2013). Souvent, une même bactérie peut produire plusieurs sidérophores différents. Par exemple, *S. aureus* peut produire les staphyloferrines A et B, la staphylobactine mais aussi l'aureochéline (Ge and Sun, 2014; Ghssein et al., 2016). Les bactéries non pathogènes produisent également des sidérophores et/ou métallophores comme c'est le cas chez les bactéries du genre *Actinosynnema* qui produisent la mirubactine (Giessen et al., 2012).

Une fois sécrétés, les sidérophores peuvent être utilisés par plus d'une espèce bactérienne à la fois. Ils deviennent alors un bien commun et participent à des mécanismes de coopération, compétition ou de piratage (Figure 7) (Kramer et al., 2020).

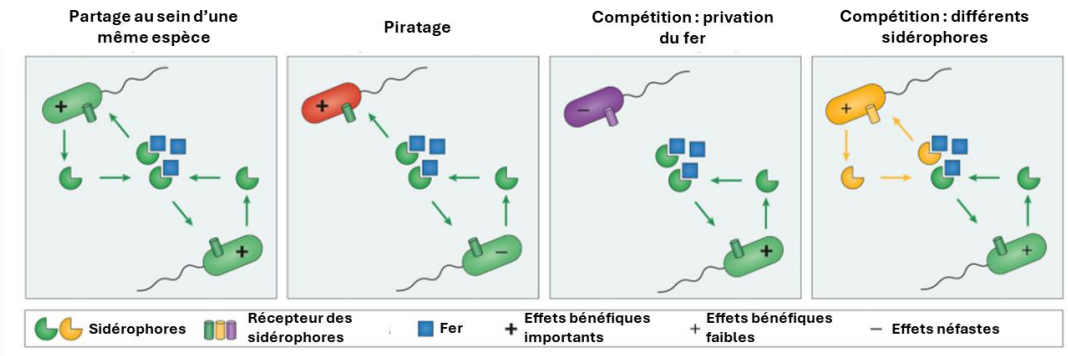


Figure 7 : Interactions sociales médiées par les sidérophores.

Certains sidérophores sont également capables de fixer d'autres ions métalliques que le fer. Par exemple, chez *S. aureus*, le sidérophore staphylopine est capable de fixer également le cuivre, le cobalt, le nickel ou le zinc avec des affinités néanmoins inférieurs qu'avec le fer

(Laffont and Arnoux, 2020). Cette capacité permet aux sidérophores de contribuer à de nombreuses fonctions cellulaires.

1.2.2.3. Export

Les mécanismes d'export du fer hors des cellules bactériennes sont relativement peu étudiés. Cependant, il est évident que dans certaines circonstances, simplement réguler à la baisse l'acquisition de fer peut ne pas être suffisant pour assurer la survie cellulaire. Par exemple, en raison du lien étroit entre le stress oxydant et les niveaux élevés de fer intracellulaire (réaction de Fenton), il est nécessaire de pouvoir réguler rapidement l'homéostasie du fer. Pour cela, l'élimination active du fer est indispensable par l'intermédiaire de systèmes d'efflux. Il existe quatre principales classes connues de systèmes bactériens d'efflux du fer (Bradley et al., 2020; Pi and Helmann, 2017).

Parmi elles, les ATPases de type-P qui sont des protéines de membrane cytoplasmique composées d'un domaine transmembranaire contenant 6 à 8 hélices, d'un domaine de liaison à l'ATP et d'un domaine régulateur appelé domaine A. Par exemple, chez *B. subtilis* la protéine PfeT active l'export du fer hors de la cellule pour protéger la bactérie d'une intoxication (Guan et al., 2015). Par ailleurs, des bactéries de la classe des Actinomycetes présente également ce type d'efflux annoté CtpD chez *Mycobacterium tuberculosis*. Il permet à la bactérie d'éliminer le fer avec une forte affinité, et il est proposé que ce système soit mis en place en réponse à une dégradation des centres fer-souffres générée par un stress oxydant (Patel et al., 2016). D'autres études ont également montré que ce système était impliqué dans la détoxification en zinc des bactéries en fonctionnant aussi comme un système d'efflux (Boudehen et al., 2022).

Les transporteurs d'ions métalliques de type CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) sont également impliqués dans l'export du fer. Ils sont ubiquitaires chez les procaryotes et les eucaryotes, avec un large éventail de cations transportés. Les protéines sont composées de six hélices transmembranaires et un domaine cytoplasmique soluble à l'extrémité C-terminale. Peu d'informations sont disponibles sur le fonctionnement de ces systèmes mais il semblerait qu'ils utilisent les protons H+ pour permettre l'export des métaux. Des études ont mis en leur fonction chez *Escherichia coli* (YiiP ou FieF), *Pseudomonas aeruginosa* (AitP) et *Shewonella oneidensis* (FeoE) (Pi and Helmann, 2017).

Les MFS fonctionnent dans le transport transmembranaire de nombreuses petites molécules incluant des cations (Yan, 2015). Leur mécanisme de transport n'est pas bien

compris mais il semblerait qu'il implique des changements de conformation du MFS permettant au ligand de passer de la cellule vers le milieu extracellulaire (Drew et al., 2021). Ils se composent de deux domaines, chacun constitué de six hélices transmembranaires. IceT, chez *Salmonella typhimurium*, est le principal exemple rapporté avec une activité d'exportation de fer chez les bactéries. En effet, une mutation invalidante sur le gène codant cette protéine induit une accumulation de fer dans le cytoplasme (Frawley et al., 2013).

Pour finir, les ferritines membranaires sont aussi impliquées dans l'export du fer chez les bactéries. Elles contiennent à leur extrémité N-terminale une activité ferroxidase nécessaire pour le transport du fer. Le domaine C-terminal est ancré dans la membrane et présente une homologie significative avec les transporteurs de fer vacuolaires (VIT1). Chez *Bradyrhizobium japonicum*, en situation de stress oxydant la protéine MbfA favorise l'export du fer et confère une résistance à l'intoxication ferrique (Sankari and O'Brian, 2014).

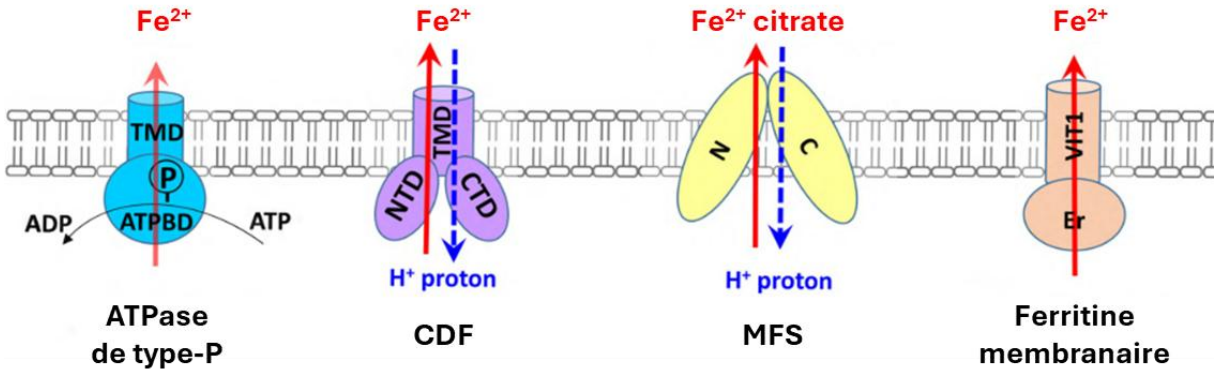


Figure 8 : Systèmes d'efflux du fer chez les bactéries.

Quatre groupes différents de transporteurs peuvent fonctionner comme des pompes d'efflux de Fe^{2+} : les ATPase de type-P ; les facilitateurs de diffusion de cations (CDF) ; la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) et la ferritine membranaire (Pi and Helmann, 2017).

1.2.2.4. Régulation

Dans la cellule, le stock de fer directement disponible pour le métabolisme et la synthèse protéique doit être régulé. Des études ont montré que cette quantité de fer devait se trouver dans une fourchette physiologique comprise entre 1 et 10 µmol.L^{-1} (Bradley et al., 2020). Les mécanismes mis en place par la cellule pour maintenir l'homéostasie du fer consistent en la régulation des protéines impliquées dans l'import et l'export du métal. Le principal senseur de ce mécanisme est le régulateur transcriptionnel Fur (*Ferric Uptake Regulator*) qui se fixe au niveau de l'ADN dans des régions spécifiques (riches en bases AT), appelées boite FUR. Dans sa forme libre (i.e., lorsque le fer est peu présent), le régulateur Fur ne peut pas se fixer sur une

boite FUR ce qui permet une levée de la répression des gènes en aval. Lorsque le fer est abondant, le complexe Fur-fer se fixe sur la boite FUR et empêche la transcription des gènes en aval. Par exemple chez *E. coli* (une bactérie Gram négatif), Fur régule l'expression de l'ARN RyhB, un petit ARN inhibiteur. Ce dernier est notamment impliqué dans la croissance normale et la survie cellulaire en condition limitante pour le fer. Lorsque le fer est présent, la cellule capte le fer grâce aux différents transporteurs qu'elle possède. Le fer intracellulaire se fixe au régulateur Fur et le complexe Fur-fer se lie à l'ADN. Le gène *ryhB*, situé en aval de la boite FUR, est alors inhibé ce qui lève l'inhibition de la synthèse protéique. Ainsi, le fer est intégré dans les protéines ferriques bactériennes ce qui réduit les stocks de fer directement disponibles dans la cellule. En condition limitante pour le fer, Fur inactif, n'inhibe plus *ryhB* ce qui réduit l'incorporation du fer dans les protéines et rééquilibre les niveaux cytoplasmiques du métal (Figure 9) (Jacques et al., 2006).

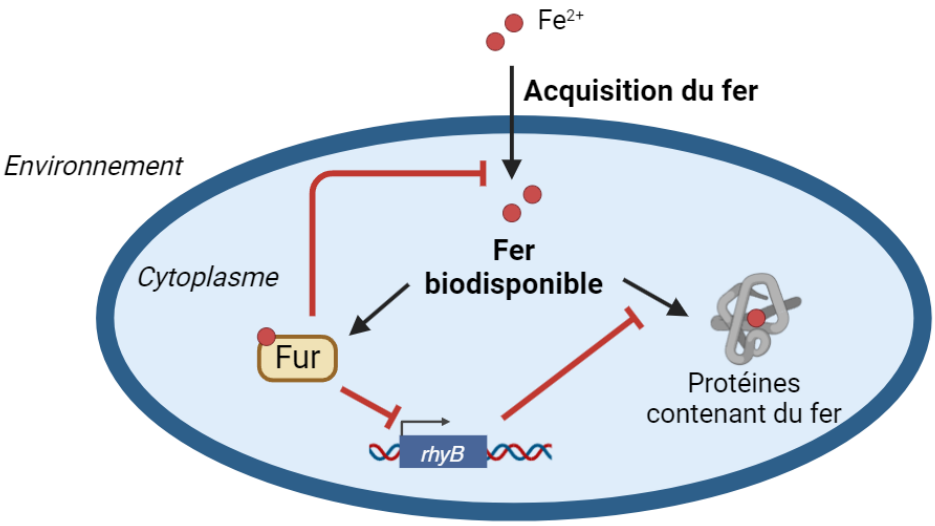


Figure 9 : Régulation de l'homéostasie du fer par Fur et RyhB chez une bactérie Gram négatif.

Bien que le gène *ryhB* ne soit pas présent chez les bactéries à Gram positif, des systèmes analogues à celui décrit précédemment semblent existent chez des bactéries à Gram positif. Chez *B. subtilis*, FsrA est un petit ARN inhibé par Fur ce qui prévient la synthèse d'enzymes contenant du fer. Chez *M. tuberculosis*, l'ARN MrsI est prédit comme étant ciblé par un homologue de Fur (IdeR) pour réguler l'homéostasie du fer (Coronel-Tellez et al., 2022). Plus généralement, le régulateur Fur cible l'activité de nombreux systèmes de transports du fer et de synthèse des protéines contenant du fer (Bradley et al., 2020).

Un second système de régulation de l'homéostasie du fer existe chez les bactéries à Gram positif et impliquent des protéines de la famille DtxR/IdeR (*Diphtheria Toxin Repressor/Iron Dependent Regulator*). Ce système a d'abord été mis en évidence chez *Corynebacterium diphtheriae* en tant que répresseur de la virulence de manière fer dépendante (Pappenheimer, 1977). Les protéines de cette famille agissent de manière similaire à Fur en ciblant des séquences consensus de l'ADN (riches en bases GC) et régulent l'activité de nombreux gènes. Le fer fonctionne comme un co-répresseur de ce régulateur qui a pour conséquence de diminuer la production de sidérophores et la dégradation de l'hème, réduire l'import du fer et favorise son stockage (Cheng et al., 2018).

Dans d'autres cas les métaux ne sont pas directement détectés mais ce sont des produits reflétant leur concentration cellulaire qui sont utilisés. Irr (*Iron Response Regulator*) ne se fixe pas directement au métal mais à des molécules contenant du fer telles que l'hème. La détection se fait grâce à une interaction directe avec des ferrochélatases qui catalysent l'insertion de fer dans les anneaux de protoporphyrine terminant la biosynthèse de l'hème. La régulation qui en découle est liée à la fixation de Irr à l'ADN qui induit un contrôle de l'expression de divers gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. En absence d'hème, c'est-à dire lorsque le Fe^{2+} est en quantité insuffisante, la ferrochélatase, après avoir lié un anneau de protoporphyrine, se dissocie de Irr qui se fixe sur l'ADN induisant une réponse transcriptionnelle. A l'inverse, en présence d'hème, c'est-à-dire lorsque le Fe^{2+} est en quantité suffisante, la protéine Irr est dégradée après liaison avec l'hème enlevant ainsi la régulation exercée sur l'ADN (Bradley et al., 2020).

1.3. Le zinc

1.3.1. Généralités

A l'instar du fer, le zinc fait également partie du groupe des métaux de transition (Figure 2) et intervient dans de nombreux processus métaboliques et enzymatiques. En revanche il est beaucoup moins abondant que le fer sur Terre. Dans la croûte terrestre, il représente moins de 1% des éléments retrouvés, principalement sous forme Zn^{2+}. Cependant son rôle est tout aussi important. En effet, il intervient dans la structure de certaines protéines (structure en doigt de zinc), dans l'expression génique en se liant à des protéines régulatrices et dans l'activité d'enzymes telles que l'ARN polymérase (Hussain et al., 2022). Dans les bactéries, sa concentration est de 10^{-3} à 10^{-4} $mol.L^{-1}$ faisant de lui le deuxième métal le plus abondant dans

le cytoplasme après le fer. Néanmoins, en raison de sa forte interaction avec ses ligands, sa concentration biodisponible n'est que de l'ordre du picomolaire (Chandrangsu et al., 2017).

Comme le fer, le zinc est également associé à des phénomènes de toxicité. Bien qu'il joue un rôle essentiel dans les fonctions cellulaires, un excès de zinc peut conduire à une perturbation de l'expression génique ou des modifications de la croissance cellulaire. D'autres effets toxiques sont également connus et impliquent des phénomènes de substitution métallique (ou mismétallation). En temps normal, la fixation d'un métal sur une protéine dépend de nombreux paramètres comme l'affinité protéine/métal ou simplement la biodisponibilité de ce dernier dans la cellule. Au cours d'un stress oxydatif, le fer contenu dans une protéine s'oxyde et est rejeté hors de la protéine. Il arrive alors que ce métal soit remplacé par un autre plus abondant. Cette substitution conduit à la perte de fonction de la protéine et par conséquent une perturbation du métabolisme cellulaire. Par exemple, les enzymes Fer-dépendante peuvent fixer du zinc à la place du fer et perdre leur fonction enzymatique (Imlay, 2014). Les mécanismes impliqués dans l'homéostasie du zinc sont décrits dans le chapitre suivant.

1.3.2. Homéostasie du zinc chez les bactéries à Gram positif

1.3.2.1. Mécanismes d'acquisition du zinc libre

Les mécanismes de transport assurant l'entrée du zinc dans la cellule peuvent être divisés en deux catégories selon le type de protéines impliquées : les transporteurs ABC et les transporteurs ZIP (Figure 13). D'autres systèmes moins spécifiques existent néanmoins.

1.3.2.1.1. Les transporteurs ABC

Le transporteur ABC le plus répandu est le transporteur ZnuABC (aussi appelé AdcABC). Il possède une forte affinité pour le zinc par l'intermédiaire d'une SBP (ZnuA/AdcA) (Capdevila et al., 2016). Chez certaines bactéries, telle que *Streptococcus pneumoniae*, deux SBP, AdcA et AdcAII, peuvent coexister et assurer une meilleure survie de la bactérie en jouant des rôles complémentaires vis-à-vis des concentrations variables de zinc (Luo et al., 2021). Par soucis de conformité avec la littérature existante et les annotations de génomes, le système AdcABC correspondra au système ZnuABC (utilisé pour les bactéries à Gram négatif) dans ce manuscrit.

Que ce soit chez les bactéries à Gram négatif ou positif, les SBP de ces systèmes possèdent des structures conservées comprenant une organisation à deux lobes avec des

domaines C et N-terminaux $(\beta/\alpha)_4$ reliés par un lobe rigide en hélice α (Ducret et al., 2023; Luo et al., 2021). La séquence N-terminale contient une région riche en résidus histidine permettant la liaison du zinc. La séquence C-terminale permet d'aider à la capture du zinc (Figure 10).

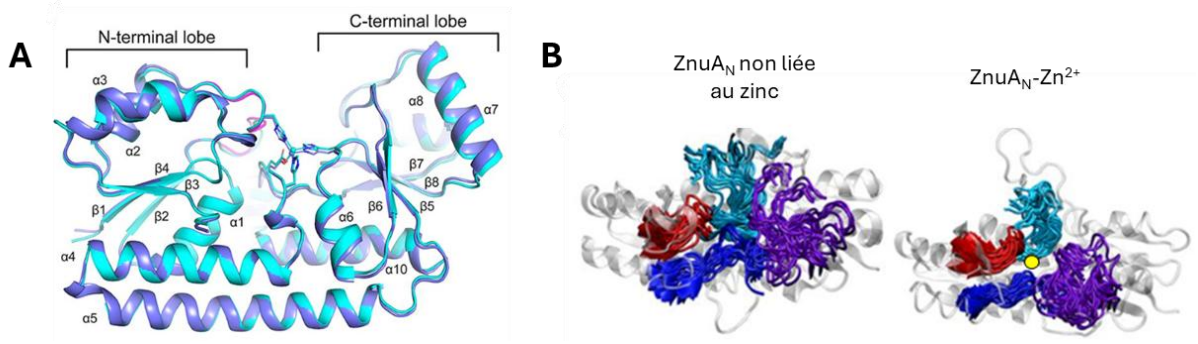


Figure 10 : Représentation de la structure de AdcA chez S. pneumoniae.

(A) Structure tridimensionnelle de la protéine AdcA mettant en évidence sa partie N-terminale (à gauche) qui porte les résidus histidine et le lobe C-terminal (à droite). (B) Illustration du changement de configuration entre la forme Apo et la forme complexée du lobe N-terminal de AdcA. Le zinc apparait en jaune. (Luo et al., 2021)

Une fois le zinc lié à la SBP, il est transféré aux TMD (ZnuB/AdcB) avant d'être internalisé grâce à l'activité ATPase de ZnuC/AdcC.

1.3.2.1.2. Les Zinc Uptake transporter (ZupT)

Les protéines de la famille des ZIP sont impliquées dans le transport membranaire de nombreux métaux et notamment le zinc. Initialement découverte chez des eucaryotes, elles sont aujourd'hui identifiées dans de nombreux organismes allant de l'Homme aux bactéries. La première protéine ZIP bactérienne a été identifiée chez *E. coli* et nommée ZupT (Grass et al., 2002; Roberts et al., 2021). Cette protéine contient huit hélices transmembranaires potentielles. Il existe également une région variable entre TMD-3 et TMD-4, dans laquelle les groupements amino et carboxyl se trouvent à la surface externe de la membrane plasmique. La région variable contient un domaine riche en résidus d'histidine et permet la liaison aux métaux au niveau cytoplasmique (Li et al., 2013). Sur la base d'une structure obtenue par cryo-microscopie électronique, un modèle a été proposé concernant le transport du zinc par cette protéine (Figure 11). En situation de carence en zinc, la protéine adopte une conformation ouverte vers le milieu extracellulaire lui permettant de fixer du zinc au niveau du site M1 (résidus glutamate et histidine). Le zinc est ensuite transporté vers un second site (M1') puis interagit avec des résidus glutamate et aspartate avant d'être libéré dans la cellule. Ce mécanisme se poursuit jusqu'à atteindre une concentration de zinc suffisante dans la cellule. Ce seuil est en quelque sorte détecté par les résidus histidine contenus dans la région intracellulaire du transporteur. Une fois

ce seuil atteint, ces deux résidus recrutent le zinc et forment un troisième site (M3), cette fois-ci inhibiteur, en interagissant avec les résidus aspartate et glutamate utilisés lors de l'import du zinc qui bloque l'accès au premier site d'interaction du zinc (M1). La région variable régule alors le transport du zinc jusqu'à ce que la concentration de ce dernier retourne en dessous du seuil par le biais de l'utilisation biologique du zinc par la cellule ou par les différents systèmes d'efflux (Pang et al., 2023).

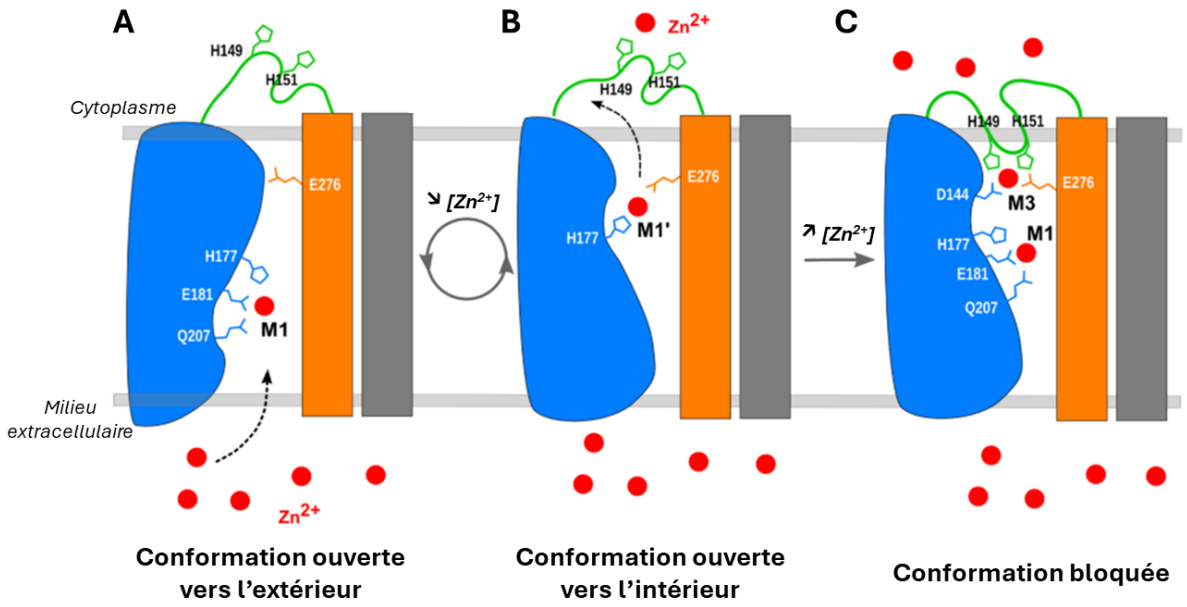


Figure 11 : Modèle de transport du zinc par les protéines de la famille ZIP.

En présence de Zn^{2+} extracellulaire, ZIP adopte une conformation supposée orientée vers l'extérieur dans laquelle le Zn^{2+} a accès à un site de liaison (M1) impliquant des résidus Glu, His et Gln. L'accès du Zn^{2+} au site M1 déclenche un changement de conformation de l'orientation vers l'extérieur à une conformation orientée vers l'intérieur, le Zn^{2+} restant dans le site M1. La chaîne latérale du résidu His change de conformation et livre un ion Zn^{2+} à deux résidus Glu et Asp. Le Zn^{2+} est ensuite libéré dans le cytosol. Avec l'accumulation de Zn^{2+} intracellulaire, deux résidus His fonctionnent comme un capteur de Zn^{2+} avec les résidus Asp et Glu pour former le site M3 qui inhibe la libération supplémentaire de Zn^{2+} et le changement de conformation de l'orientation vers l'intérieur à l'orientation vers l'extérieur pour un autre cycle de transport (Pang et al., 2023).

1.3.2.2. Mécanisme d'acquisition du zinc complexé

Comme décrit pour le fer, le zinc peut être acquis par l'intermédiaire de métallophores. Parmi ces derniers, il existe des systèmes de transport communs à ces deux métaux. Chez *S. aureus*, la staphylopine est impliquée dans le transport du cuivre, du nickel, du cobalt, du zinc, du fer (Fe^{2+}) et du manganèse par ordre d'affinité (Ghssein et al., 2016). Ce métallophore est également capable de former un complexe, avec une très forte affinité, avec Fe^{3+} en fonction du pH (Ghssein et al., 2016; Laffont and Arnoux, 2020). La staphylopine est codée par l'opéron *cnt* contenant neuf gènes : *cntKLM* codent les enzymes nécessaires à la biosynthèse de la

staphylopine, *cntE* code pour le système d'export du métallophore, enfin *cntABCDF* codent quant à eux pour le système d'import du complexe métal/staphylopine par le biais d'un transporteur ABC. L'opéron *cnt* répond aux concentrations en zinc et en fer environnementales par l'intermédiaire des régulons Fur et *Zinc Uptake Regulator* (Zur) au niveau transcriptionnel. Le premier niveau de régulation s'effectue en amont des gènes impliqués dans les gènes de biosynthèse de la staphylopine. Cette région contient une boite Fur suivie d'une boite Zur permettant une régulation à la fois par le fer et le zinc de manière indépendante. Le deuxième niveau de régulation est interne à l'opéron. Il se situe en amont des gènes de transport et contient une boite Fur superposée à une boite Zur permettant une régulation coopérative par le fer et le zinc. Ainsi, en condition riche en zinc ou en fer, la production de la staphylopine est fortement inhibée par Fur/Zur. A l'inverse, les mécanismes d'export de la staphylopine et d'import du complexe staphylopine/métal sont moins efficacement régulés par les éléments régulateurs permettant à la cellule d'optimiser le système en utilisant la staphylopine déjà sécrétée pour importer les métaux (Fojcik et al., 2018).

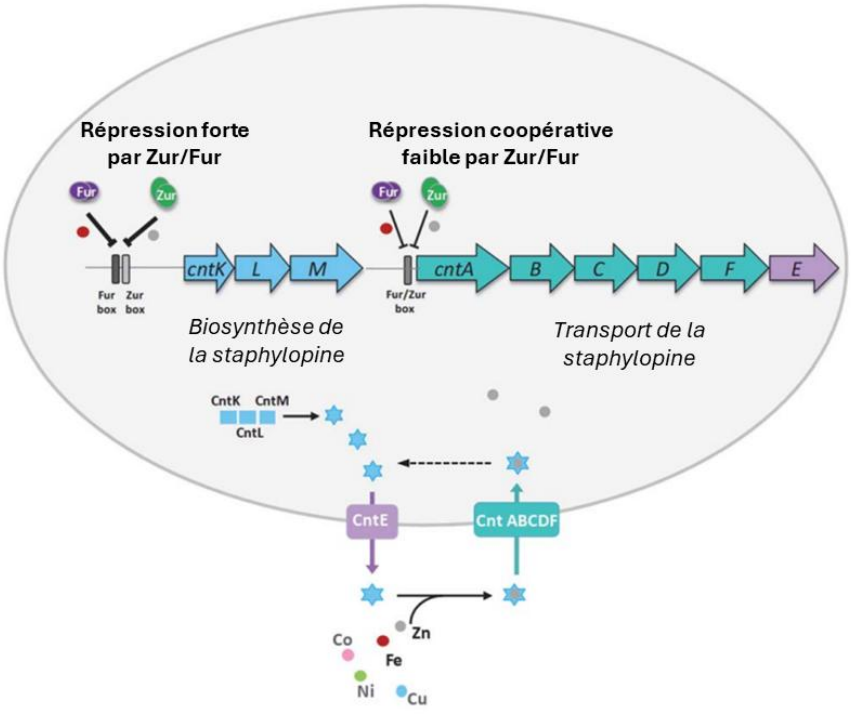


Figure 12 : Régulation du transport du zinc et du fer par l'opéron cnt.
(Fojcik et al., 2018)

Bien que le système codé par les gènes *cnt* soit capable de transporter de nombreux métaux, seuls le fer et le zinc sont capables d'exercer une fonction régulatrice sur ce système.

D'autres bactéries utilisent également ce genre de système pour importer les métaux. Ils sont retrouvés chez des bactéries pathogènes : la pseudopaline chez *P. aeruginosa*, la yersinopine chez *Y. pestis* et *Y. tuberculosis*, et la bacillopaline chez *Paenibacillus mucillaginosus*. Des études bio-informatiques ont identifié des analogues de CntM au sein des quatre phylum bactériens, regroupant des bactéries pathogènes mais également des bactéries environnementales (Morey and Kehl-Fie, 2020)

1.3.2.3. Export

Lorsque la concentration intracellulaire en zinc dépasse un certain seuil, les bactéries mettent en place des systèmes d'efflux pour éliminer le zinc. Ces systèmes sont analogues à ceux décrits pour le fer puisque la cellule utilise des transporteurs appartenant à la famille des CDF et des ATPases de type-P (Figure 13). Parmi les CDF, ZitB et YiiP (FieF) ont été identifiés chez *E. coli* dans l'efflux de métaux lourds tels que le cobalt ou le zinc, de même que CzcD dans l'export du zinc chez des bactéries du genre *Pseudomonas* mais aussi chez *B. subtilis*. Chez d'autres bactéries à Gram positif, des CDF ont aussi été identifiés dans l'export du zinc tel que ZntA (Suryawati, 2018). Le mécanisme de transport impliquant des ATPase de type-P le plus décrit utilise la protéine CadA a également été décrit dans l'export du zinc chez *B. subtilis* (Gaballa and Helmann, 2003) et chez *Mycobacterium tuberculosis* (Botella et al., 2011; Boudehen et al., 2022).

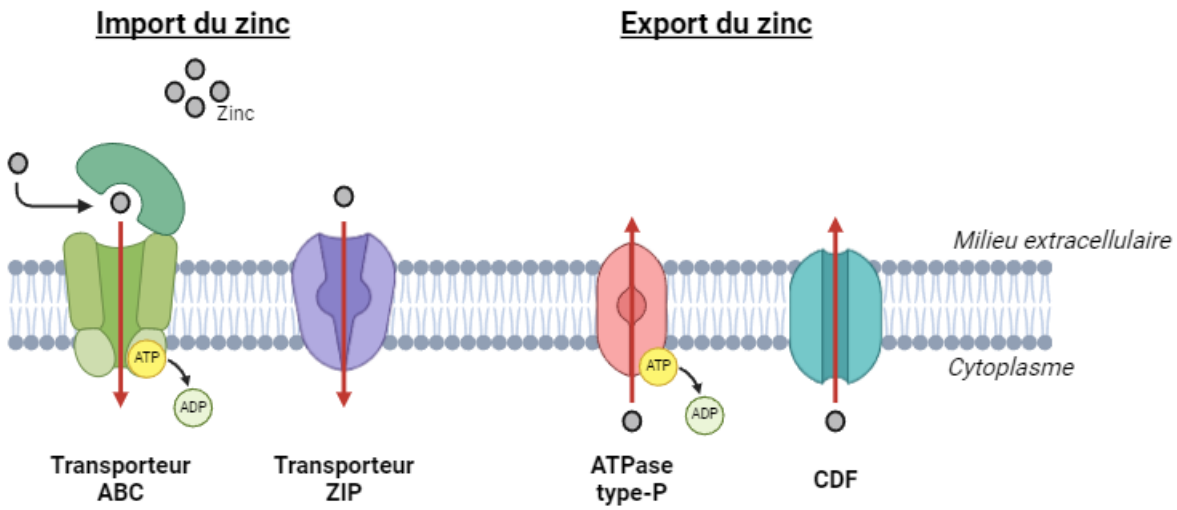


Figure 13 : Mécanismes de transport du zinc chez les bactéries à Gram positif.

1.3.2.4. Régulation

Le mécanisme de régulation principal de l'homéostasie du zinc est le système Zur. Il appartient à la même famille protéique que Fur et est donc impliqué dans la régulation des systèmes de transport du zinc. Zur est une protéine dimérique contenant un atome de zinc dans la structure de chaque monomère (Zur_2:Zn_2). Ce dimère possède en plus un site de liaison au zinc fonctionnant comme un senseur de la concentration cytoplasmique du zinc. La forme Apo de Zur fonctionne comme un inhibiteur des systèmes d'efflux afin de limiter la perte de zinc dans un environnement carencé de ce dernier. Lorsque la concentration en zinc intracellulaire augmente, le régulateur Zur fixe un atome de zinc sur un des sites senseurs du dimère (Zur_2:Zn_3). Cette conformation permet au régulateur de se lier avec une faible affinité à l'ADN. A plus forte concentration, tous les sites senseurs sont occupés (Zur_2:Zn_4) permettant à Zur de se lier à l'ADN avec une forte affinité. Il fonctionne alors comme un répresseur de la transcription des systèmes d'import du zinc au profit des systèmes d'efflux (Figure 14) (Capdevila et al., 2016; Ducret et al., 2023).

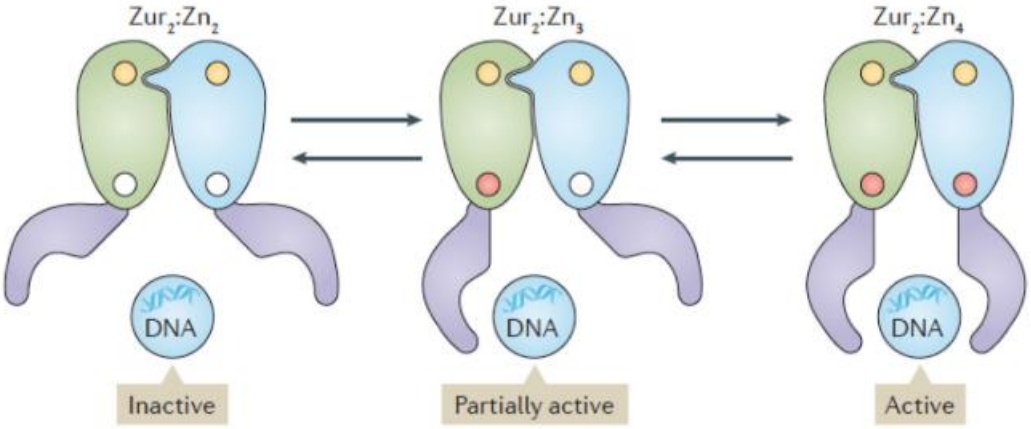


Figure 14 : Représentation des changements de conformation de Zur en réponse au zinc.
(Chandrangsu et al., 2017)

Un autre système de régulation existe et agit directement les systèmes d'efflux du zinc. Chez *B. subtilis*, l'absence de zinc est détectée par une protéine, CzrA, qui se lie à l'ADN et inhibe la transcription des systèmes d'efflux. En présence de zinc, ce dernier se fixe à la protéine senseur dissociant la protéine CzrA de l'ADN permettant ainsi la dérépression des gènes codant les deux systèmes d'efflux décrits précédemment (Chandrangsu et al., 2017).

Pour finir, chez *S. pneumoniae*, une autre protéine régulatrice a été décrite, AdcR, appartenant à la famille des *MarR zinc uptake repressor*. Elle possède une structure proche de

CzrA mais avec une hélice alpha additionnelle dans la région entre les deux dimères. Elle fixe deux atomes de zinc à différents degrés d'affinité ce qui lui permet, en condition riche en zinc, d'inhiber l'expression des systèmes d'import du zinc et de contribuer à la virulence bactérienne (Capdevila et al., 2016).

1.4. Répartition des métaux chez les bactéries

1.4.1. Les mécanismes de stockage du fer et du zinc

Les métaux ne sont pas seulement accessibles à partir de l'environnement des bactéries. Effectivement, ces dernières peuvent les puiser directement dans des réserves intracellulaires. Ces réserves correspondent à un stock de protéines contenant elles-mêmes les métaux d'intérêt.

1.4.1.1. Le fer

Il existe trois types de protéines de stockage du fer chez les bactéries. La première, et la plus importante, est la ferritine qui est également retrouvée chez les eucaryotes. Deux autres protéines de stockage, propres aux procaryotes, existent et sont les protéines Dps et les bactérioferritines. Bien que ces protéines soient retrouvées dans différentes espèces, elles peuvent coexister au sein d'une même bactérie. Par ailleurs, certains gènes de la ferritine et de la bactérioferritine sont communs entre différentes bactéries.

Elles partagent la même structure tridimensionnelle composée de vingt-quatre (pour les ferritines et les bactérioferritines) ou de douze sous-unités (les protéines Dps) formant une capsule sphérique et renfermant une cavité centrale capable de stocker le fer. La large structure des ferritines et bactérioferritines leur permet de stocker jusqu'à trois milles atomes de fer tandis que les protéines Dps n'ont une capacité de stockage que d'environ cinq cents atomes de fer (Andrews et al., 2003). Pour être stocké, les protéines interagissent avec le fer ferreux (Fe^{2+}) qu'elles oxydent pour obtenir du fer ferrique (Fe^{3+}). Cette étape est réalisée par l'intermédiaire de sites catalytiques présents au sein des protéines elles-mêmes. Pour les ferritines et les bactérioferritines, ces sites appelés des ferroxidases et sont situés au sein de chaque sous-unité. Ils permettent la fixation d'ions ferreux qui seront oxydés en ion ferrique et qui migreront au niveau de la cavité centrale de la protéine. Concernant les protéines Dps, le site ferroxidase n'étant pas conservé, l'oxydation du fer est effectuée à l'interface entre deux sous-unités (Ilari et al., 2000).

Il existe également des formes de stockage du fer au sein d'organelles bactériens (Greening and Lithgow, 2020). Le premier du genre est retrouvé chez les bactéries magnétotactiques qui produisent des magnétosomes. Ces organelles reliés à la membrane plasmique contiennent des cristaux de magnétite (Fe_3O_4) ou de greigite (Fe_3S_4) qui s'alignent avec les filaments du cytosquelette. Pour autant, leur rôle semble plus être lié à l'alignement le long du champ magnétique plutôt que dans le stockage direct du fer. D'autres organelles de stockage du fer sont aussi délimités par une membrane mais diffèrent des magnétosomes. Ce sont des ferrosomes qui ont en effet été observés chez des bactéries comme *Shewanella putrefaciens*. Bien que des études démontrent leur rôle à l'interface hôte-pathogène en favorisant la séquestration du fer chez *Clostridium difficile* (Pi et al., 2023), leur mécanisme de formation et leurs fonctions de manière générale restent incomprises (Grant and Komeili, 2020; Greening and Lithgow, 2020).

1.4.1.2. Le zinc

Dans la cellule, le zinc peut lui aussi interagir avec plusieurs molécules qui modulent la bioaccessibilité sous forme libre dans le cytoplasme. Une première classe de molécules de faible poids moléculaire contient des groupements thiols comme le glutathion ou la bacillithiol chez *B. subtilis* (Helbig et al., 2008; Newton et al., 2009). En plus de ces thiols, l'histidine contribue à la chélation du zinc dans la cellule. Chez *Acinetobacter baumannii*, elle forme un complexe mobile avec le zinc qui peut alors être acheminé vers différentes protéines (Nairn et al., 2016). Néanmoins, ces molécules ne participent qu'indirectement au stockage du zinc en interagissant avec le stock de zinc libre dans la cellule.

Un autre type de protéines de faible poids moléculaire, les métallothionéines, permet aux micro-organismes qui les produisent de lutter contre la toxicité intracellulaire du zinc en interagissant avec ce métal grâce à leur structure riche en cystéine. Initialement décrite chez la cyanobactérie *Synechococcus PCC 7942* (Hantke, 2005), la métallothionéine SmtA est en effet capable de fixer quatre ions Zn^{2+} sur neuf résidus cystéines. Des protéines SmtA-like ont aussi été identifiées dans plusieurs espèces de bactéries incluant plusieurs *Pseudomonas*, *E. coli* ou d'autres cyanobactéries et permettent le stockage intracellulaire du zinc (Blindauer et al., 2002; Blindauer, 2008).

1.5. Homéostasie des autres métaux

Les autres métaux retrouvés dans l'environnement possèdent eux aussi des systèmes de transport et de détection qui leur sont propres. Par ailleurs, ces systèmes sont parfois même dépendants de la biodisponibilité d'autres métaux.

Chez *E. coli*, le manganèse utilise le système d'import MntH. En période de carence en fer, Fur est désactivé ce qui induit le système d'import du manganèse. Ce mécanisme est également utilisé au cours d'un stress oxydant pour pallier l'oxydation du fer qui a entrainé une perte de l'activité enzymatique. En important le manganèse suite à une carence en fer ou une oxydation de ce métal, la cellule peut maintenir un niveau d'activité minimal (Martin et al., 2015). En parallèle, le manganèse utilise l'expression constitutive d'une protéine appartenant à la famille des CDF (MntE) ainsi qu'une ATPase de type-P (MgtA) comme mécanisme d'export. Cette dernière a également été rapportée comme participant à l'homéostasie du calcium et du zinc. D'un point de vue fonctionnel, le gène *mntE* contrôle *mgtA*. L'ARN *mgtA* contient une région aptamère en 5'-UTR (*UnTranslated Region*) capable de lier le manganèse ou le calcium et qui fonctionne en tant que système riboswitches. De cette manière, le manganèse et le calcium activent leur export respectif au cours d'un excès de leur concentration (Martin et al., 2019). Les riboswitches sont des systèmes de régulation qui interviennent au niveau de la région 5'-UTR d'un ARNm en modulant l'expression de gènes (Bédard et al., 2020). Ils possèdent une région très conservée appelée aptamère qui est impliquée dans la détection directe et spécifique d'un ligand, et d'une région appelée plateforme d'expression qui sert à moduler l'expression des gènes en réponse à cette détection. En général, la fixation du ligand sur l'aptamère induit un changement conformationnel qui affecte le repliement de la plateforme d'expression régulant ainsi l'expression des gènes via différents mécanismes comme le blocage de la traduction ou la dégradation de l'ARNm. Ces systèmes, également appelés métalloriboswitches, participent au maintien de l'homéostasie de nombreux autres métaux comme le magnésium, le cobalt et le nickel (Wedekind et al., 2017).

Le calcium joue également un rôle essentiel dans le développement des bactéries en agissant en tant que second messager mais aussi en tant qu'intermédiaire ou cofacteur dans de nombreux processus biologiques. Pour cela, ce métal possède également des mécanismes de transport pour assurer le maintien de son homéostasie. Les canaux calciques sont largement identifiés chez les bactéries comme la poly-β-hydroxybutyrate polyphosphate (PHB-PP) décrite chez *E. coli* comme permettant la translocation du calcium vers le cytoplasme. Un autre type

de canal calcique a été identifié chez *B. subtilis* (YetJ) et serait impliqué dans la maturation du biofilm (King et al., 2020).

Les mécanismes de transport sont également soumis à divers processus de régulation. Chez *B. subtilis*, le manganèse est détecté par la protéine MntR (*Manganese Transport Regulator*) faisant partie de la famille des DtxR. Le manganèse se fixe sur des régions spécifiques du régulateur ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription des gènes codant les systèmes d'import du manganèse. Ce système est partagé avec un autre métal, le cadmium, qui possède même une affinité plus forte pour MntR. Il bloque ainsi l'expression de protéines responsables de son acquisition. Pour le cuivre, le régulateur impliqué est CueR, qui lie Cu^{+} avec une très forte affinité pour contrôler l'expression des mécanismes de transports (Kliegman et al., 2006). Pour le calcium, des mécanismes d'efflux sont mis en place lorsque la concentration de ce dernier devient trop importante dans la cellule. Des systèmes de pompes calciques ATP-dépendante permettent alors à la cellule de retrouver des niveaux physiologiques de calcium intracellulaire. De nombreuses familles de pompes existent et sont divisées en deux groupes. Le premier groupe contient deux types d'ATPase de type P et F, identifiées chez de nombreux pathogènes : CaxP chez *Streptococcus pneumoniae*, CtpE chez *Mycobacterium smegmatis* ou encore PA3920 et PA2435 chez *P. aeruginosa*. Le deuxième groupe correspond à un échangeur d'ions couplant l'export du calcium avec l'import d'autres ions (King et al., 2020).

Ainsi, chaque métal possède des systèmes de transport et des régulateurs qui lui sont propres. Pour autant, l'homéostasie de chaque métal est dépendante des autres d'autant plus que certains partagent des mécanismes de transport commun au sein d'une bactérie. Comme décrit précédemment, certains systèmes d'acquisition des métaux utilisant des molécules sécrétées qui sont de fait partagées au sein d'une communauté bactérienne et sont donc un bien commun quelques fois indispensables pour des bactéries partageant la même niche.

1.6. Etude de la répartition des métaux chez des bactéries isolées

1.6.1. Détection par fluorescence

Un premier outil permettant l'étude de la répartition des métaux dans la cellule est l'utilisation de métallophores fluorescents. Certains métallophores sont naturellement fluorescents. Dans le cadre des sidérophores, la pyoverdine perd ainsi sa fluorescence lorsque qu'elle se fixe au fer permettant une détection de type « turn-off ». Il est également possible de

faire fluorescer les métallophores de manière synthétique en les couplant avec des fluorophores. Cette technique requière un groupement accessible sur le métallophore pour la conjugaison sans pour autant que cette dernière n'impacte le site de fixation du métal. L'avantage de cette technique est que la fixation du métal active l'émission et permet ainsi une détection de type « turn-on », plus directe (Zheng and Nolan, 2012). Une autre technique consiste à utiliser des sondes fluorescentes (fluorophores) se fixant sur l'agent chélateur du métal. Cette technique permet une détection précise et en temps réel de la concentration en métal directement dans l'échantillon. Elle peut se décliner en sondes de type « turn-on » ou « turn-off » voire en sondes ratiométriques dont la longueur d'ondes de fluorescence change après fixation du métal (Sahoo and Crisponi, 2019).

D'autres techniques permettent le métal libre dans la cellule. C'est la cas de la ferrozine pour le fer ferreux ou de la fluozine pour le zinc qui se lient à leur métal respectif en émettant de la fluorescence. Si ces techniques permettent une détection directe et rapide de la concentration des métaux, elles ne permettent pas d'avoir une information complète de la concentration totale des métaux dans la cellule puisque ces sondes ne peuvent pas fixer leur ligand lorsqu'il est déjà complexé avec une protéine (Riemer et al., 2004; Zhao et al., 2008). Des approches plus précises, utilisant l'imagerie, permettent de contourner ce problème et de détecter les métaux dans leur ensemble, qu'ils soient libres ou non.

1.6.2. Imagerie

1.6.2.1. NanoSIMS

La technique NanoSIMS (*Nano Secondary Ion Mass Spectrometry*) est une méthode analytique avancée utilisée pour la caractérisation chimique et isotopique d'une surface solide par l'intermédiaire d'un laser générant des ions secondaires. Cette technique permet donc la cartographie d'éléments présents même à l'état de trace, comme les métaux qu'ils soient présents dans des structures membranaires telles que des granules ou des vacuoles, en descendant jusqu'à un seuil de détection de l'ordre du partie par milliard (ppb). Cette technique, bien que destructive, a l'avantage de permettre la détection de plusieurs éléments en parallèle. Plus précisément, elle est capable de mesurer l'abondance d'un ou plusieurs éléments en fournissant également des informations sur les différents isotopes présents. Elle a été utilisée pour l'imagerie de métaux dans les plantes et microalgues ainsi que chez les bactéries (Penen et al., 2016; Chadwick et al., 2019).

1.6.2.2. Imagerie par fluorescence à rayon X

Les premières études faisant état de structures de stockage des métaux chez les bactéries ont en effet utilisé des techniques de microscopie électronique à transmission (Gorby et al., 1988). Les ferrosomes sont visibles avec cette technique et il est possible de visualiser plus précisément la composition chimique de ces organelles en couplant la microscopie électronique avec des sondes EDS (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*) (Grant et al., 2022; Pi et al., 2023). L'utilisation de techniques d'imagerie plus résolutives permet de mieux visualiser la localisation et la répartition des métaux au sein d'une cellule. C'est le cas de la technique d'imagerie de fluorescence à rayon X (XRF) qui permet de visualiser la concentration et la distribution d'éléments traces à l'échelle cellulaire (Victor et al., 2018). Par ailleurs, la préparation des échantillons pour le MET est plus adaptée à l'observation des cellules individuelles plutôt qu'à celle de grandes structures, ou même de structures en 3D, contrairement à l'imagerie nano-XRF. Dans ce cas, l'organisation des structures multicellulaires peut être maintenue pour la cartographie (cartographie en 2D, mais la 3D est également possible). Un autre avantage par rapport au TEM est que nous pouvons cartographier de grandes zones avec le nano-XRF, ce qui est adapté aux structures multicellulaires (Pushie et al., 2014; Lemelle et al., 2017).

Bien que cette technique soit moins sensible que le nanoSIMS, elle offre l'avantage de ne pas détruire l'échantillon analysé et permet l'analyse d'éléments plus lourds tels que les métaux. Couplée à la microscopie électronique, cette technique permet de localiser avec précision la répartition des métaux dans la cellule. Par exemple, chez les bactéries magnétotactiques, il est possible de visualiser les concentrations de fer au cours du processus de formation des magnétosomes (Chevrier et al., 2022).

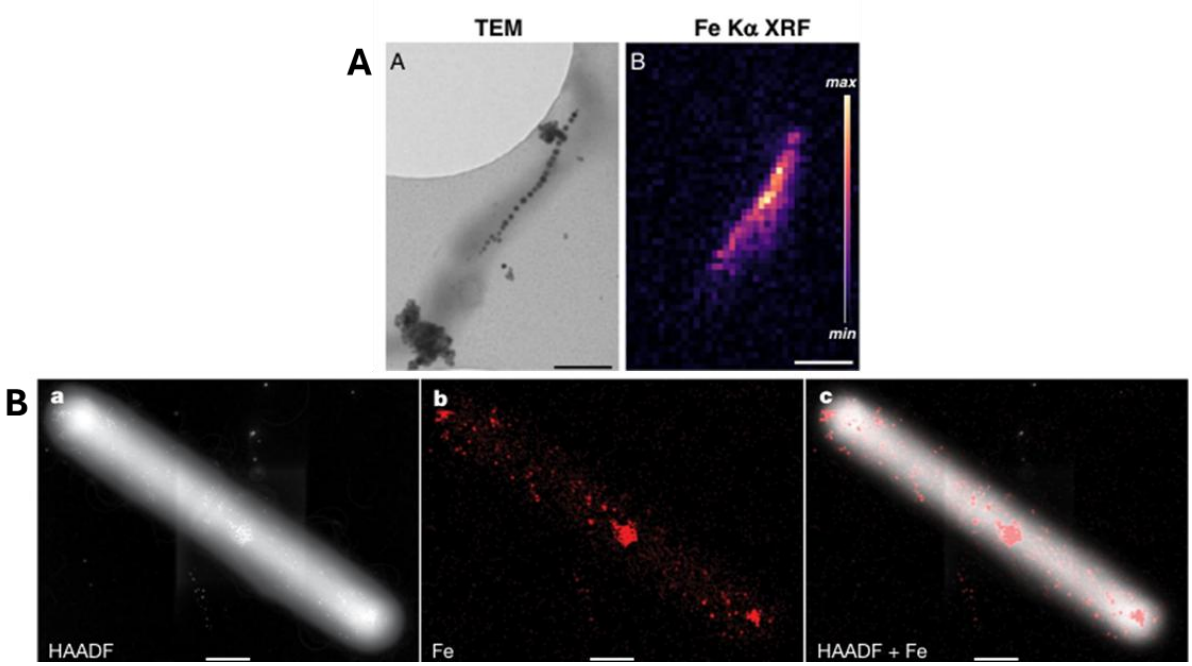


Figure 15 : Imagerie de la répartition du fer chez des bactéries unicellulaires.

(A) Visualisation du fer contenu dans les magnétosomes d'une bactérie magnétotactique par microscopie électronique (à gauche) et par XRF (à droite) (Chevrier et al., 2022). (B)Visualisation du fer contenu dans les ferrosomes de Clostridioides difficile par microscopie électronique à rayon X (microscopie électronique à transmission à gauche, microscopie électronique à transmission à rayon X au milieu, fusion des deux images à droite) (Pi et al., 2023).

2. La multicellularité bactérienne

La multicellularité chez les organismes procaryotes n'est pas un phénotype rare (Shapiro, 1998). Quand on pense aux bactéries, nous avons tendance à les considérer comme des cellules isolées, qui se développent dans des cultures liquides en suspension bien agitées. Cependant, la plupart d'entre elles ont la capacité de se développer et de survivre les unes attachées aux autres et à des surfaces. Sur ces surfaces, les bactéries s'organisent entre elles par l'intermédiaire de mécanismes biochimiques (signaux extracellulaires) entre les cellules, leur permettant de former des structures particulières. De nombreuses espèces de bactéries sont connues pour leur comportement multicellulaire coordonné, comme c'est le cas pour *E. coli* ou *B. subtilis* (Shapiro, 1998). Les biofilms sont une des structures procaryotes multicellulaire les plus répandues mais on retrouve également d'autres types de structures comme les corps de fructification (fruiting body) chez *Myxococcus xanthus* ou encore des colonies en forme de champignons chez certaines Actinobacteria (Kolter and Greenberg, 2006; Monds and O'Toole, 2009; Muñoz-Dorado et al., 2019; Vos, 2021).

La prolifération, la colonisation de nouveaux milieux ainsi que la survie des bactéries nécessite un accès efficace aux ressources qu'elles puisent de leur environnement. Bien que le mode de vie planctonique (unicellulaire) soit plus intéressant d'un point de vue énergétique en s'affranchissant de la nécessité de produire des molécules d'adhésion, il emprunte certaines caractéristiques du mode de vie multicellulaire en permettant aux cellules de percevoir des signaux extracellulaires de leur environnement et de communiquer avec d'autres bactéries (Lyons and Kolter, 2015). En situation de stress, le mode vie multicellulaire offre néanmoins plusieurs avantages aux bactéries. Il permet la protection contre des prédateurs, qu'ils soient bactériens ou non, mais aussi contre des stress environnementaux incluant la température, le pH, la dessiccation ou bien l'oxydation. C'est le cas, par exemple, des biofilms bactériens qui s'entourent d'une matrice extracellulaire riche en polysaccharides pour se protéger de stress physiques et biologiques (Flemming and Wingender, 2010). La proximité des bactéries au sein de cette communauté favorise également la communication et le partage de toutes sortes de molécules. Chez des bactéries prédatrices, l'attaque de leurs proies est plus efficace en essaim de cellules qu'en étant isolées (Dayel and King, 2014). De même, des bactéries filamenteuses retrouvées à l'interface oxique/anoxique dans les sédiments marins peuvent transmettre les ressources puisées au sein du milieu oxique vers des régions anoxiques plus profondes par le biais du filament (Pfeffer et al., 2012). Un autre avantage de la multicellularité est la

spécialisation de certaines cellules en fonction de leur localisation dans la communauté comme c'est le cas des cyanobactéries. Cela permet une meilleure utilisation des ressources et une économie d'énergie en répartissant le travail entre les cellules (Flores and Herrero, 2010). Un avantage indirect de cette spécialisation se base sur le renouvellement cellulaire qui permet aux bactéries naissantes de puiser des nutriments des bactéries en apoptose (Claessen et al., 2014) (Figure 16).

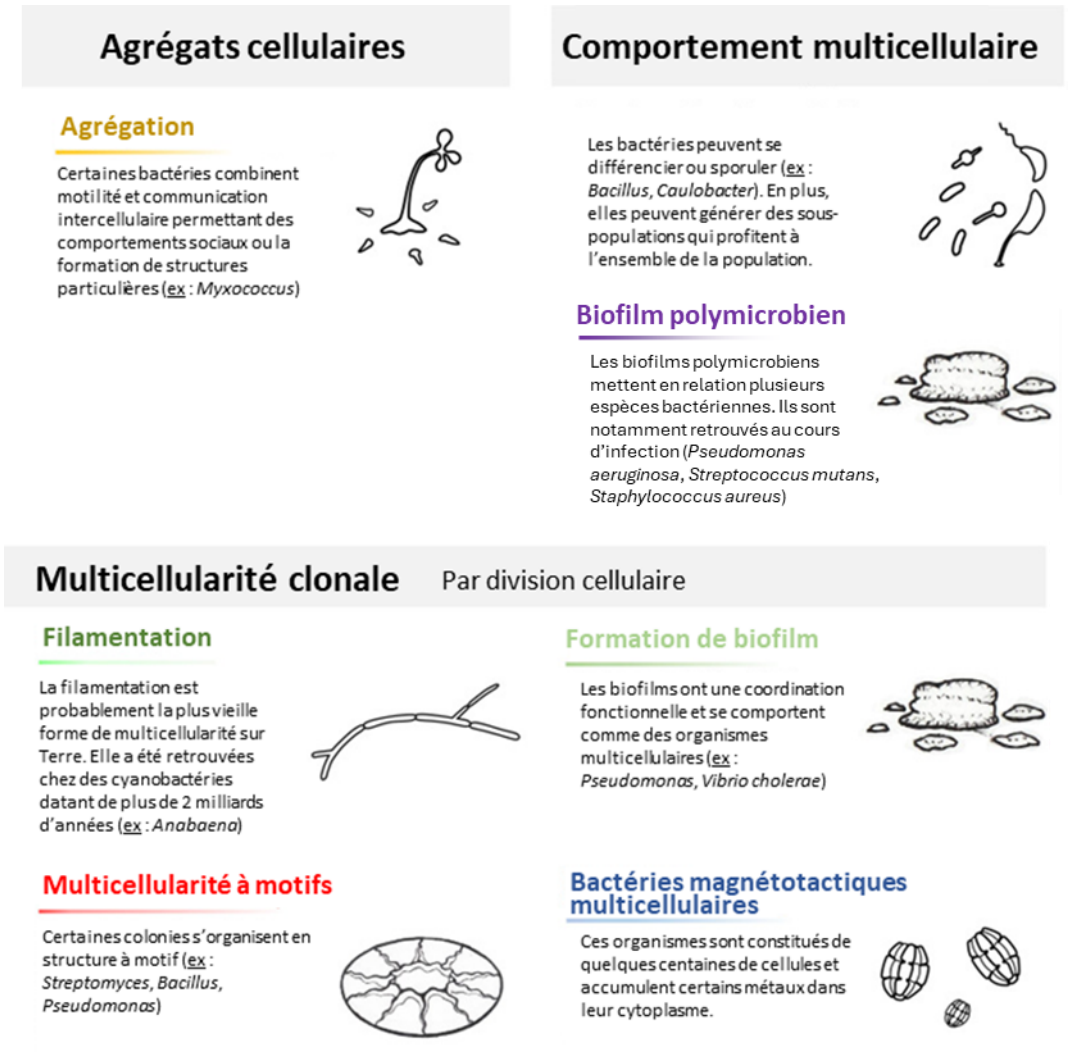


Figure 16 : Multicellularité chez les procaryotes.
Plusieurs types de multicellularité existent et présentent des capacités différentes allant de simples agrégats cellulaires à la formation de structures particulières, tels que des corps fructifères chez Myxococcus, ou des agencement en filaments chez les cyanobactéries (inspiré de (Mizuno et al., 2022).

2.1. *Quorum sensing* : vers une organisation multi-unicellulaire

Même au sein d'une organisation unicellulaire, les bactéries mettent en place des mécanismes de communication à distance, appelé *quorum sensing*. Ce mode de communication

se base sur la libération, par une cellule, de molécules de signalisation extracellulaires, appelées auto-inducteurs. A faible densité cellulaire, ces auto inducteurs diffusent dans le milieu extracellulaire et se retrouvent à de trop faibles concentrations pour être détectées par les autres cellules. A forte densité cellulaire, l'accumulation des auto inducteurs dépasse alors un seuil de détection qui permet d'engendrer une réponse cellulaire. En effet, ces molécules sont détectées par les cellules par le biais de récepteurs localisés soit à la membrane ou bien dans leur cytoplasme, ce qui induit la modulation de l'expression de gènes ainsi que l'expression de ces mêmes auto inducteurs (Rutherford and Bassler, 2012). Les systèmes de *quorum sensing* diffèrent en fonction du type de bactérie et notamment en fonction du type d'organisation des membranes.

Chez les bactéries à Gram négatif, la base des connaissances actuelles sur le *quorum sensing* provient d'études réalisées sur une bactérie marine bioluminescente *Vibrio fischeri* (Nealson and Hastings, 1979). L'aptitude de cette dernière à produire de la lumière est notamment utilisée par le calamar hawaïen *Euprymna scolopes* pour se camoufler dans les eaux claires. Néanmoins, son activité luciférase a également permis de mieux comprendre les interactions cellules-cellules au sein d'une communauté bactérienne. En effet chez *V. fischeri*, deux protéines, LuxI et LuxR, contrôlent l'activité luciférase de l'opéron *luxCDABE* et permettent la production de lumière (Li and Tian, 2012; Visick et al., 2000). LuxI est une enzyme synthase qui catalyse la production de la molécule auto inductrice acyl-homoserine lactone (AHL) 3OC6-homoserine lactone tandis que LuxR est un activateur transcriptionnel liant à la fois l'ADN et un récepteur d'auto inducteur cytoplasmique. Une fois produite, l'AHL peut diffuser à travers les membranes jusqu'à atteindre un seuil de détection correspondant à une certaine densité cellulaire. Ensuite, l'AHL va se lier à LuxR et activer la transcription de l'opéron *luxCDABE*. Cette cascade de réaction induira alors une production intense de lumière (Figure 17).

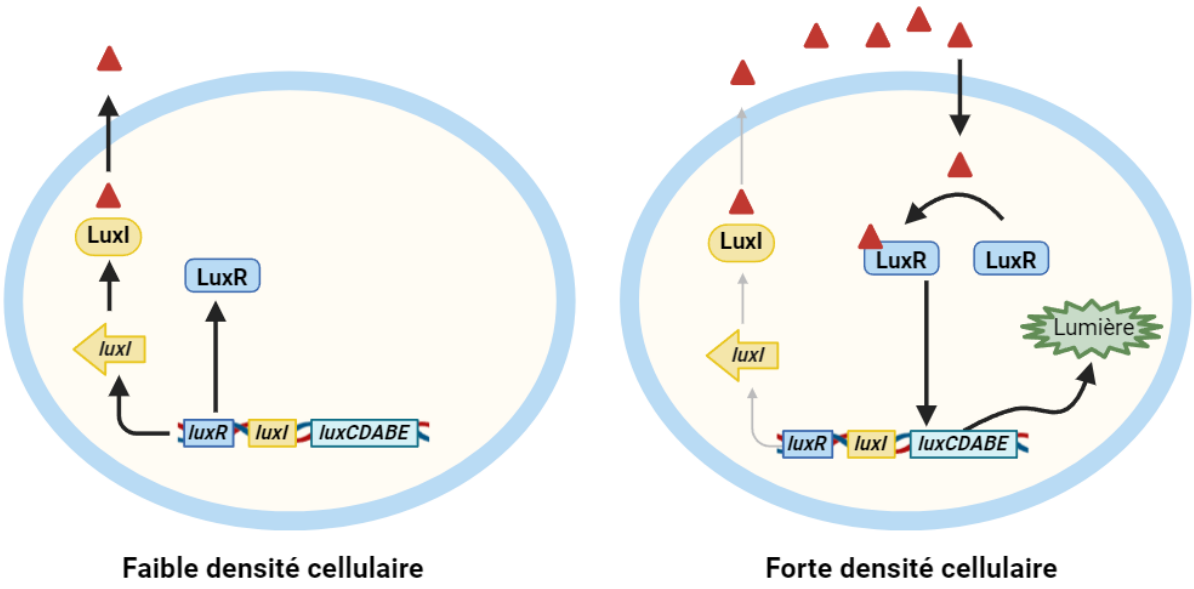


Figure 17 : Quorum sensing chez Vibrio fischeri

A faible densité cellulaire, LuxI et LuxR sont produits. LuxI permet la production d'AHL (triangle rouge) qui diffuse hors de la cellule. A forte densité cellulaire, la concentration d'AHL extracellulaire devient importante permettant ainsi sa diffusion vers l'intérieur de la cellule et interagit avec LuxR. Ce complexe se fixe à l'opéron luxCDABE et permet la production de lumière (inspiré de (Li and Tian, 2012)).

La plupart des bactéries à Gram négatif connues utilisent des protéines de type LuxI/LuxR et communiquent à l'aide d'AHL ou toute autre molécule utilisant la S-adenosylmethionine (SAM) comme substrat (Wei et al., 2011). Ces systèmes sont particulièrement efficaces en raison de la forte spécificité d'interaction entre LuxR et les signaux AHL. Concernant les protéines de type LuxI, ces dernières possèdent également une forte spécificité d'interaction avec leur cible grâce à une poche *acyl-binding pocket* qui interagit avec un noyau méthionine d'une SAM de manière spécifique (Waters and Bassler, 2005). De cette manière, le *quorum sensing* reste spécifique au sein d'une espèce et ceci même à l'intérieur d'une population bactérienne hétérogène.

Les bactéries à Gram positif utilisent majoritairement des peptides modifiés appelés peptides auto inducteurs qui proviennent du clivage de plus grands peptides sur lesquels sont ajoutés des noyaux lactones et thiolactones, des lanthionines ou encore des groupements isoprenyl. A forte concentration, ces peptides sont détectés par des senseurs de type histidine-kinase qui s'autophosphorylent, engendrant une cascade de signalisation intracellulaire et activant des éléments de réponse cytoplasmiques au niveau des cellules cibles. Ces derniers sont alors capables de moduler la transcription de gènes cibles. Les peptides auto inducteurs produits par les cellules ne peuvent pas diffuser à travers les membranes et dépendent de

transporteurs dédiés à la membrane des cellules ce qui renforce la spécificité d'interaction au sein d'une espèce (Waters and Bassler, 2005). La plupart de ces peptides ont été identifiés chez des Actinobacteria incluant une large gamme de molécules telles que : γ-butyrolactones, γ-butenolides ou des furans. Ces molécules non seulement induisent la production de métabolites spécialisés, mais régulent également la morphogenèse bactérienne et contrôlent des systèmes de régulation complexes. La première molécule de signalisation bactérienne découverte était le 2-isocapryloyl-3R-hydroxyméthyl-γ-butyrolactone provenant de *Streptomyces griseus*. Il a été démontré qu'il déclenche la sporulation et la production d'un antibiotique, la streptomycine (Creamer et al., 2021).

En assurant la communication et la coordination cellulaire au sein d'une niche et en modulant l'expression des gènes des bactéries, le *quorum sensing* permet aux bactéries de tirer un avantage de cette vie en communauté. Par exemple, en coordonnant la production d'enzymes extracellulaires efficaces uniquement au-delà d'une concentration proportionnelle à la densité cellulaire (Waters and Bassler, 2005). Cette communication permet la synchronisation d'une réponse à l'échelle d'une population ce qui évoque le fonctionnement d'un organisme multicellulaire.

2.2. Agrégats cellulaires

2.2.1. Vibrio fischeri

Chez *V. fischeri*, le *quorum sensing* n'est pas seulement impliqué dans la luminescence. Une étude a démontré que plusieurs *quorum sensing* coexistaient au sein d'une population de *V. fischeri* et que le système de *quorum sensing ain* contrôlait aussi la motilité bactérienne (Lupp and Ruby, 2005). Les deux systèmes, Ain et Lux, interviennent à des moments différents mais leurs fonctionnements restent toutefois liés. Des mutants dépourvus de motilité n'ont pas la capacité de coloniser le calamar au même titre que des mutants dépourvus de luminescence. En effet, ces derniers montraient une incapacité à coloniser l'organe même après une longue incubation (Lupp and Ruby, 2005).

Pour établir la symbiose avec son hôte, aux premières heures suivant l'éclosion de l'œuf, les bactéries forment des agrégats au niveau de l'épithélium des calamars sous l'impulsion du battements ciliaires des cellules de l'hôte (Nyholm et al., 2000). Après quelques heures dans cet état agrégé, les cellules colonisent alors les pores conduisant aux cryptes de l'organe lumineux. C'est ici que le système *ain* intervient, il dépend de l'activité du système *lux* grâce à

l'auto inducteur LitR et des *autoinducer synthase* LuxS et AinS (Dial et al., 2021; Fidopiastis et al., 2002). A faible concentration cellulaire, LuxS et AinS produisent respectivement les phéromones AI-2 et la N-octanoyl homoserine lactone (C8-HSL) qui contrôlent les enzymes LuxQ et AinR. Ces dernières fonctionnent alors comme des kinases et entrainent la phosphorylation et donc l'activation de l'élément de réponse LuxO. Ensuite, LuxO phosphorylé active la transcription de Qrr1 (un petit ARN) ce qui inhibe LitR (et donc la production de lumière) et augmente la motilité bactérienne en activant l'expression de gènes codant pour des flagellines. C'est au cours de cette étape que la migration vers les cryptes de l'organe lumineux s'effectue. Au fur et à mesure de la production d'auto inducteurs (et donc à une plus grande densité bactérienne), LuxQ et AinR acquièrent une activité phosphatase ce qui désactive LuxO, permettant ainsi la production de LitR, une augmentation de LuxR, de la luminescence et une diminution de la motilité bactérienne (Lupp and Ruby, 2005). Par conséquent, les 2 systèmes de *quorum sensing* sont interconnectés et agissent séquentiellement pour aboutir à la production de lumière au niveau de l'organe lumineux des calamars lorsque la densité cellulaire est optimale (Figure 18) (Lupp et al., 2003; Lupp and Ruby, 2005).

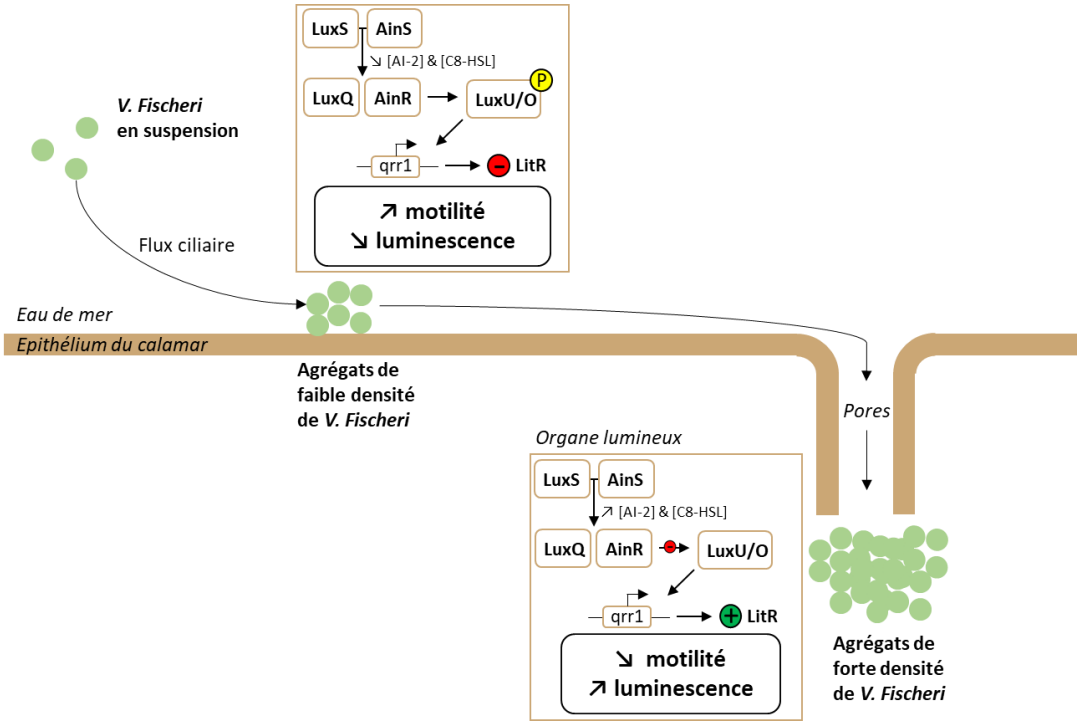


Figure 18 : Schéma simplifié du lien entre les 2 quorum sensing chez Vibrio fischeri.

Ce mécanisme de *quorum sensing* est également retrouvé chez *V. cholerae*, une bactérie pathogène, qui utilise le système Lux pour moduler l'expression des gènes de virulence. A

faible densité, LuxO phosphorylé réprime HapR, un répresseur des gènes de virulence. Ainsi, la bactérie colonise son hôte et prolifère. A mesure que la densité bactérienne augmente, le système Lux est inactivé favorisant la production de HapR. Ce répresseur active la production d'une protéase HapA qui permet le détachement des bactéries de l'hôte permettant la dissémination bactérienne (Cámara et al., 2002). Plus exactement, une étude a démontré que HapR était directement lié à l'agrégation bactérienne puisque, la délétion du gène codant HapR diminuait significativement l'agrégation et ce même à forte densité cellulaire. En effet, HapR réprime l'expression d'une DNase, Dns, impliquée avec une autre (Xds) dans la dégradation d'ADN extracellulaires. Ces derniers sont en effet retrouvés dans des agrégats de *V. cholerae* à forte densité cellulaire (Jemielita et al., 2018). Chez *V. fischeri*, LitR, l'homologue de HapR, ne semble pas réguler Dns et Xds. Néanmoins, ces deux DNases présentent les mêmes fonctions que celles observées chez *V. cholerae*. Dns semble être impliquée dans le processus d'agrégation puisqu'une délétion du gène *dns* chez *V. fischeri* entraine une suragrégation délétère. En effet, dans cet état les bactéries ne sont plus capables de se détacher de leur hôte pour migrer vers des zones plus riches. Dans les deux cas, les deux nucléases sont essentielles dans la colonisation de leur hôte puisqu'elles assurent également un accès important aux ressources grâce au phosphate issus de la dégradation des ADN extracellulaires (Fidopiastis et al., 2022).

2.2.2. Corps fructifères de *Myxococcus xanthus*

M. xanthus, une myxobactérie à Gram négatif découverte en 1941, a la particularité d'avoir un style de vie coopératif et de s'organiser en réseau multicellulaire (Shimkets, 1999). Plus exactement, cette bactérie exerce des comportements de réorganisation de sa population en réponse à son environnement. Ainsi, *M. xanthus* ne possède pas un mode de vie multicellulaire strict. En condition où les nutriments sont disponibles, les bactéries agissent à la manière de prédateurs et s'organisent effectivement en « essaim » multicellulaire capable de digérer leur cibles par l'intermédiaire d'enzymes extracellulaires (Dworkin, 1962; Pérez et al., 2016). En condition de carence, les cellules adoptent un comportement particulier au cours duquel elles forment des structures appelées corps fructifères (*fruiting bodies*) (Figure 19), capables d'émettre des myxospores qui germeront lorsque les conditions environnementales seront à nouveau propices à la croissance bactérienne.

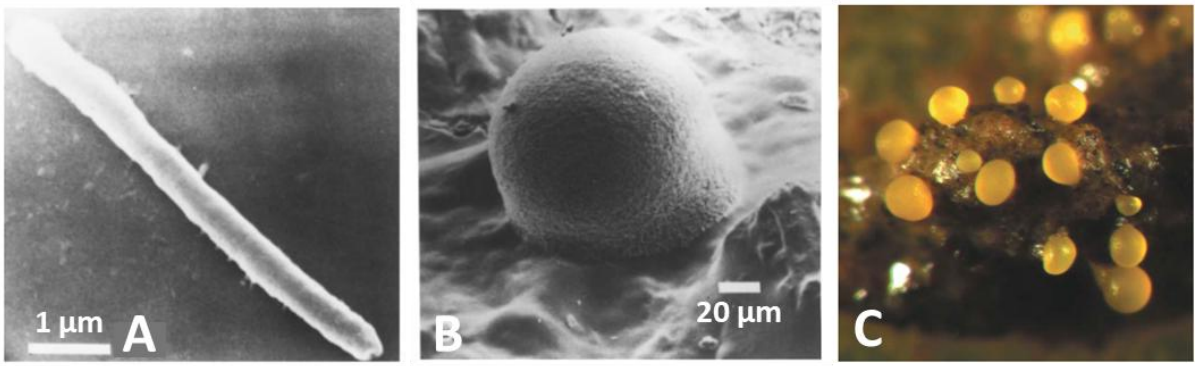


Figure 19 : Images de corps fructifères de M. xanthus.
Images en microscopie électronique (A) cellule de M. xanthus ; (B) corps fructifère. (C) Image de corps fructifères au microscope optique (Shimkets, 1999; Vos, 2021).

Cette capacité de *M. xanthus* à s'adapter à son environnement repose sur sa motilité, elle-même dépendante de sites d'adhésion et de pili du type IV, qui moduleront la direction du mouvement de la bactérie (Islam et al., 2020). Néanmoins, cette motilité est fortement dépendante des signaux environnementaux que perçoit cette bactérie pour accéder aux nutriments, ce que nous détaillerons dans cette partie.

La stratégie d'attaque de *M. xanthus* est basée sur une organisation en essaim qui pénètre la colonie de la proie et qui s'attaque à la cellule cible de manière frontale (Pérez et al., 2016). Cette attaque nécessite des points de contact avec la cible incluant un analogue d'un système de sécrétion de type 3 (SST3*) et un appareil de sécrétion de jonction adhérente (Tad) (Thiery and Kaimer, 2020). Ces deux systèmes fonctionnent de manière coordonnée de sorte que le système Tad est nécessaire pour tuer la cible mais ne provoque pas directement la mort de la cellule, à la différence du SST3*. Une fois l'interaction avec les bactéries cibles effectuée, *M. xanthus* libère des métabolites extracellulaires avec une activité antimicrobienne, comme la myxoviresine qui bloque la croissance bactérienne en agissant sur la signal peptidase de type II (Xiao et al., 2011). Elle sécrète aussi des enzymes hydrolytiques permettant de digérer à la fois la paroi bactérienne et les macromolécules issues de la dégradation des bactéries pour les utiliser en tant que nutriments (Figure 20) (Contreras-Moreno et al., 2024).

Par ailleurs, des études ont démontré que *M. xanthus* pouvait utiliser les métaux présents dans l'environnement pour tuer les bactéries (Figure 20), notamment le fer et le cuivre. Par exemple, *M. xanthus* augmente la concentration de cuivre au site d'interaction avec *Sinorhizobium meliloti* pour générer du stress lié à l'oxygène dans la cible, tuer la bactérie et

favoriser sa progression dans la colonie (Contreras-Moreno et al., 2020). Aussi, *M. xanthus* est fortement dépendante du fer pour effectuer son activité de prédation. Lorsque le fer est présent en quantité suffisante dans le milieu, ce dernier va inhiber la transcription d'un groupe de gène impliqués dans la transcription d'un sidérophore, myxochéline, et maintenir le phénotype de *M. xanthus* dans une configuration de prédateur (Dziewanowska et al., 2014). En condition de carence en fer, la bactérie va entrer dans une transition de phase avec un nouveau phénotype de *M. xanthus* qui émerge en devenant spécialisé dans la production du sidérophore. Ce changement permet à la bactérie prédatrice de maintenir l'activité des systèmes de sécrétion des protéines extracellulaires, qui dépendent du régulateur de capture du fer (Fur), pour transporter les enzymes hydrolytiques à travers la paroi bactérienne (Dong et al., 2022).

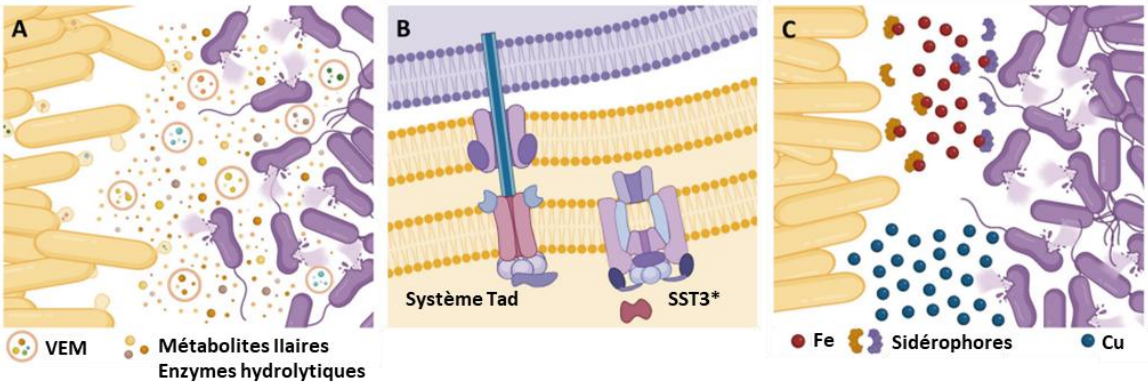


Figure 20 : Prédation de M. xanthus.

M. xanthus (cellules jaunes) utilise de nombreuses stratégies pour tuer ses cellules cibles (cellules violettes). (A) En sécrétant des métabolites secondaires et des enzymes hydrolytiques, la bactérie est capable de détruire la paroi bactérienne et d'y récupérer les nutriments essentiels pour son fonctionnement. (B) Pour cela la bactérie met en place des systèmes d'adhésion avec sa proie tels qu'un système de sécrétion de jonction adhérente et un pseudo système de sécrétion de type 3 qui permettent le rapprochement des membranes de la cible et de M. xanthus. (C) En s'adaptant à son environnement, M. xanthus est également capable de tirer profit des concentrations variables de métaux dans son environnement, en produisant des sidérophores qui le fer (Fe) ou aussi en agissant sur la capture du cuivre (Cu) (Contreras-Moreno et al., 2024).

2.2.3. Staphylococcus aureus

Chez *S. aureus*, la virulence bactérienne est dépendante du système Agr qui code un système de *quorum sensing*. Au sein de ce système, *agrD* code pour un peptide auto inducteur qui est libéré dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire d'un transporteur AgrB. Après accumulation de l'auto inducteur, ce dernier se fixe sur un senseur histidine-kinase membranaire, AgrC, qui s'autophosphoryle et active à son tour un élément régulateur, AgrA. AgrA phosphorylé maintient alors l'activation de la transcription du système *agr via* le

promoteur P2, active la production de facteurs de virulence *via* le promoteur P3 et réprime *rot*, un répresseur de toxine (Rutherford and Bassler, 2012). Néanmoins, ce système de *quorum sensing* dépend de nombreux régulateurs qui modulent l'activité de Agr en fonction des conditions environnementales. Par exemple, CodY, qui est activé par une carence en isoleucine, se fixe sur *agrC* et réprime l'expression à partir des promoteurs P2 et P3 (Majerczyk et al., 2008). De même, le système SrrA/SrrB diminue la transcription du système *agr* en condition anaérobie (Yarwood et al., 2001). De cette manière, *S. aureus* s'adapte à son environnement en formant un biofilm adhérent et n'activera son *quorum sensing* qu'en condition optimale avec un accès suffisant aux nutriments.

Comme décrit, dans leur environnement, les bactéries sont capables de s'adapter aux variations nutritionnelles et mettent en place des stratégies compétitives pour accéder aux ressources tels que les métaux. Ces derniers n'étant ni métabolisables biologiquement ni dégradables, il est essentiel pour les bactéries de les puiser dans leur milieu, quelques soient leur concentration, afin d'assurer le bon fonctionnement de nombreuses voies métaboliques et enzymatiques. Ainsi, elles peuvent prendre le dessus sur d'autres souches dans le cadre de symbioses, comme pour *V. fischeri,* ou s'adapter à des carences dans le cadre de prédation comme pour *M. xanthus.*

Chez *S. aureus,* le problème est tout autre. En effet, c'est une bactérie pathogène qui infecte de nombreuses espèces animales au niveau de la peau et des tissus mous (Mrochen et al., 2020). Chez les vertébrés, des mécanismes d'immunité nutritionnelle se mettent en place et restreignent l'accès aux métaux par l'intermédiaire de chélateurs qui diminuent la croissance bactérienne (Price and Boyd, 2020). Pour lutter contre cette carence en ions métalliques, *S. aureus* produit des sidérophores dont l'affinité est plus grande pour les métaux que les métallophores eucaryotes. C'est le cas des staphyloferrines A et B qui lient le fer pour ensuite l'importer au niveau de la cellule par des transporteurs ABC dédiés (Drechsel et al., 1993; Konetschny-Rapp et al., 1990; Price and Boyd, 2020). Pour autant, l'accumulation des métaux au sein du cytoplasme n'est pas toujours synonyme de croissance bactérienne. A la manière de l'accumulation de cuivre chez les cellules cibles de *M. xanthus,* une concentration excessive de cuivre chez *S. aureus* conduit à la production de radicaux libres de l'oxygène et donc à la mort de la cellule (Gunther et al., 1995).

2.3. Biofilms

2.3.1. Cycle de vie

Les biofilms servent à maintenir l'expansion de la colonie tout en protégeant les cellules de leur environnement. L'adhésion de ces structures à une surface leur fournit eau et nutriments nécessaires au développement de la colonie et assure la protection des cellules en les entourant d'une substance polymérique extracellulaire produite par les bactéries (Stewart and Franklin, 2008). Le biofilm se compose de près de 90% d'eau et de polysaccharides, le reste correspondant à la masse microbienne (Donlan, 2002; Sutherland, 2001). Parmi les bactéries les plus fréquemment étudiées dans le cadre de la formation des biofilms, la plupart sont des pathogènes opportunistes telles que celles du genre *Staphylococcus* mais aussi *E. coli* ou *P. aeruginosa*.

La formation du biofilm se décompose en plusieurs étapes à commencer par l'attachement initial. Ce dernier se fait grâce à des protéines de surface bactérienne qui permettent l'adhésion au support. Par exemple, *Staphylococcus epidermidis* produit une hydrolase AtlE qui hydrolyse le peptidoglycane de la paroi bactérienne et permet ainsi l'attachement de la cellule à des éléments de la matrice extracellulaire comme la vitronectine. D'autres protéines sont aussi impliquées dans cette étape telle que GehD qui se lie au collagène (Büttner et al., 2015). Ensuite, les bactéries vont adhérer et s'agréger grâce à des protéines d'adhésion (adhésines). Cette étape s'accompagne de la synthèse d'exopolysaccharides qui assurent l'attachement quasi définitif de la colonie. Pour reprendre le cas de *S. epidermidis*, la bactérie produit une adhésine polysaccharidique qui permet de lier les cellules entre elles et à la surface d'adhésion (Heilmann et al., 1996). La troisième étape correspond à la multiplication des bactéries et la formation de micro-communautés qui coopèrent. Cette coopération assure la bonne croissance bactérienne en permettant la bonne distribution des nutriments et l'élimination des déchets. Chez *E. coli*, une étude a montré, par cartographie transcriptomique, que certaines zones du biofilm étaient plus ou moins riches en nutriments que d'autres, ce qui constituait un gradient nutritionnel au sein du biofilm (de l'extérieur vers l'intérieur). Notamment, les gènes impliqués dans l'armature bactérienne et l'acquisition des métaux se retrouvaient plus exprimés à l'extérieur du biofilm, tandis qu'à l'intérieur les bactéries étaient plus impliquées dans l'utilisation des nutriments, le catabolisme et l'efflux (Wang et al., 2023).

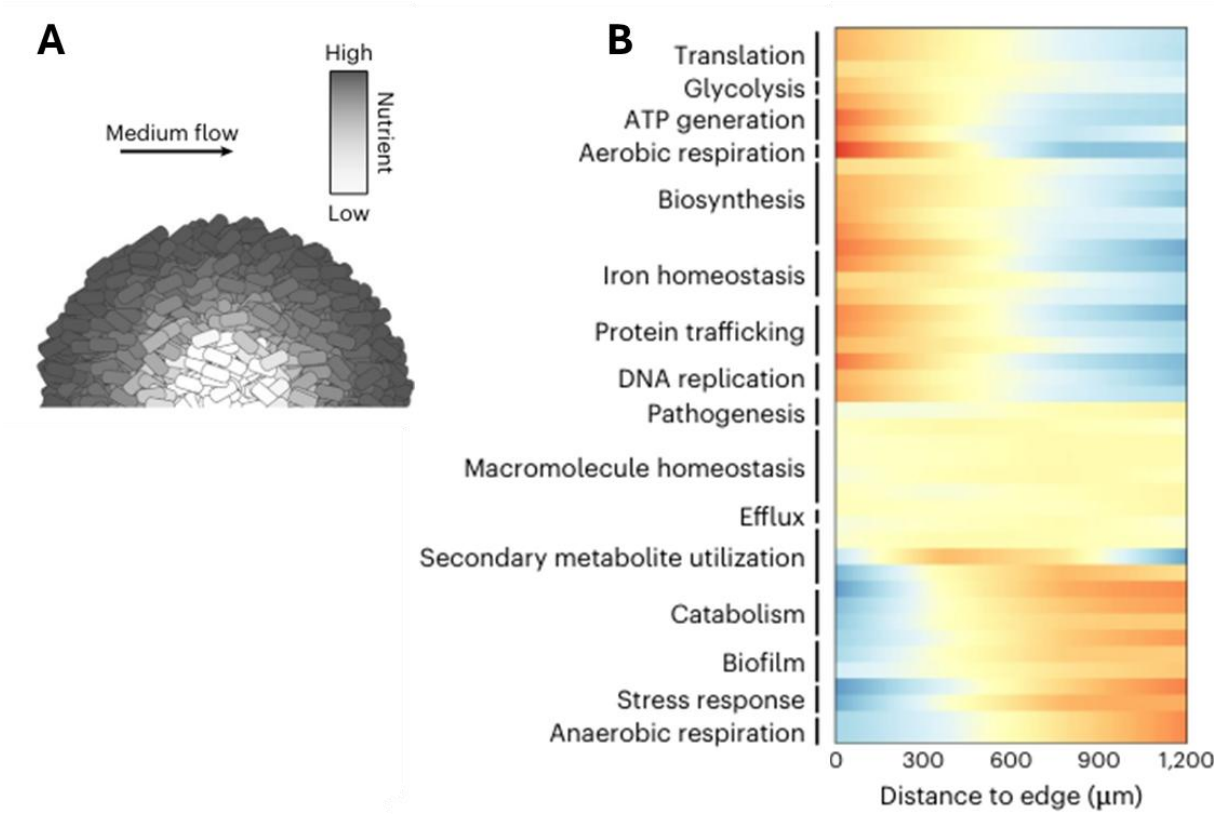


Figure 21 : Transcriptome spatial d'un biofilm de E. coli K12.
(A) Représentation schématique du gradient nutritionnel dans un biofilm (B) Heatmap représentant les différentes voies métaboliques différentiellement exprimées depuis le centre du biofilm (0 µm) et la périphérie (1200 µm) (Wang et al., 2023).

Par ailleurs, le gradient observé pour le métabolisme bactérien est corrélé avec un gradient d'oxygène où les cellules en périphérie sont dans un environnement aérobie tandis que celles au centre sont privées d'oxygène. Cette organisation coïncide ainsi avec l'hétérogénéité populationnelle du biofilm : les cellules au centre sont dans un état « dormant » alors que celles en périphérie sont plus actives. Ce *clustering* permet la phase de maturation du biofilm qui entretient la formation et le développement de micro-colonies en jouant sur les phénomènes de *quorum sensing*. Chez *E. coli*, la communication bactérienne est dépendante de la distance entre chaque micro-colonie ce qui maintient l'hétérogénéité du biofilm et confère une véritable organisation à plusieurs niveaux. Par exemple, les cellules les plus au centre possèdent un métabolisme plus lent qui devient de plus en plus actif en allant vers la périphérie, rendant ces dernières néanmoins plus vulnérables à d'éventuels stress environnementaux (Gu et al., 2013; Wang et al., 2023). C'est cette couche bactérienne externe du biofilm qui assure la dispersion. Cette étape permet de disséminer des cellules vers d'autres surfaces nutritives pour s'y développer à nouveau et favoriser la prolifération bactérienne. En effet par le biais de senseurs, les bactéries détectent des carences en nutriments ou en oxygène, libèrent de petites molécules

agissant sur un second messager *bis-(30 50)-cyclic di-guanylic acid* (c-di-GMP), ce qui active un changement d'état entre adhérence et motilité (Figure 22) (Oppenheimer-Shaanan et al., 2013).

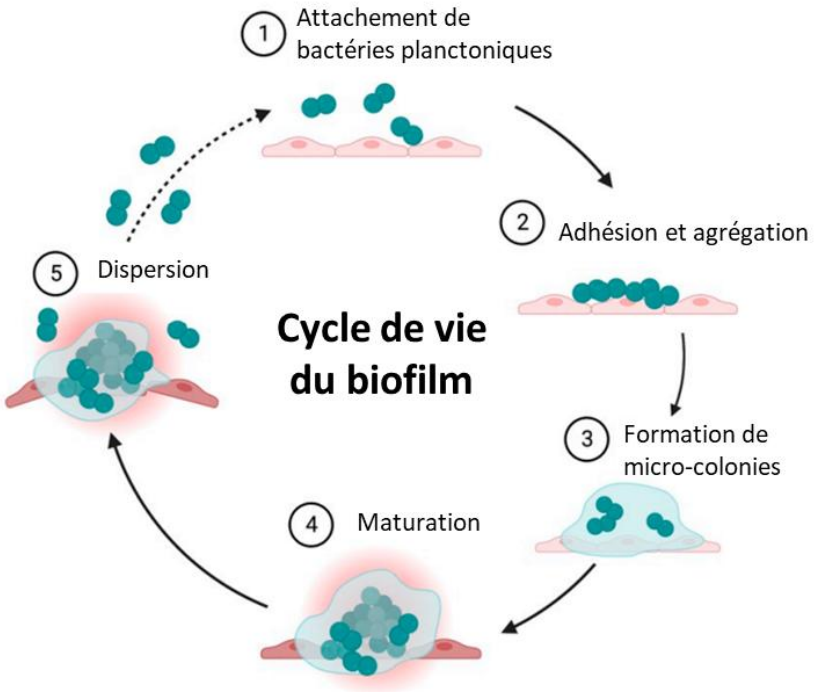


Figure 22 : Cycle de vie du biofilm.
(1) Attachement réversible de bactéries planctoniques. La première fixation des bactéries est influencée par des forces attractives ou répulsives générées par les niveaux de nutriments, le pH ou la température de la surface. (2) Agrégation des bactéries et attachement irréversible aux surfaces. (3) Formation d'une matrice externe composée de biomolécules complexes multicouches, formation de micro-colonies et sécrétion d'exopolysaccharides qui constituent la matrice externe. (4) Maturation des biofilms et acquisition d'une structure tridimensionnelle lorsqu'ils atteignent leur maturité. (5) Les biofilms entièrement matures se détachent, permettant aux cellules bactériennes de redevenir planctoniques et ainsi de former de nouveaux biofilms (Sharma et al., 2023).

La communication entre les différentes cellules d'un biofilm est essentielle, notamment en raison d'un environnement nutritionnel différent selon l'endroit du biofilm. L'accès aux ressources constituent un élément crucial dans la croissance d'une colonie, et dans ce cadre-là une forme de communication entre cellules peut se mettre en place comme c'est le cas pour l'accès à l'oxygène (Wang et al., 2023).

2.3.2. Communication au sein du biofilm

2.3.2.1. Exemple des Pseudomonas

Chez *P. aeruginosa*, la structure même du biofilm est modifiée selon la richesse du milieu. En colonie, cette bactérie forme des structures particulières en forme de champignon

(Klausen et al., 2003) : lorsque les conditions sont défavorables, les cellules motiles migrent vers des zones plus riche en nutriments en utilisant des systèmes chimiotactiques tels que CheY, qui lie la motilité bactérienne au gradient de concentration de ces nutriments (Barken et al., 2008). D'autres travaux ont également démontré l'aptitude de *P. aeruginosa* à s'allonger lorsque l'accès au carbone est limité afin d'augmenter la surface d'échange du biofilm avec son environnement (Steinberger et al., 2002). Chez *Pseudomonas putida*, la structure du biofilm est aussi impactée par son environnement. En l'absence de nutriments, l'hydrolyse du messager c-di-GMP est diminuée ce qui favorise la protéolyse de l'adhésine LapA et donc la dispersion du biofilm (Díaz-Salazar et al., 2017). Cette capacité d'adaptation est assurée par des chémorécepteurs. Chez *P. aeruginosa*, plusieurs cluster de gènes codent pour quatre systèmes de chémosenseurs impliqués à la fois dans la motilité bactérienne et dans les niveaux d'expression de c-di-GMP (Corral-Lugo et al., 2016). Par exemple, la voie de signalisation *wsp* active la formation du biofilm en réponse à une augmentation des niveaux de c-di-GMP (Hickman et al., 2005). Chez *P. putida*, 27 chémorécepteurs coexistent et répondent à de nombreux types de signaux comprenant des acides organiques ou des métabolites (Corral-Lugo et al., 2016).

2.3.2.2. Homéostasie des métaux et formation de biofilms chez P. aeruginosa

L'accès aux métaux est aussi essentiel pour le développement des biofilms puisqu'en diminuant les concentrations de fer, la formation des biofilms chez *P. aeruginosa* est altérée (Hunter et al., 2013). Pour cela, les bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des sidérophores qui sont essentiels pour le développement de la bactérie, telle que la pyoverdine qui lie le fer avec une forte affinité (Kang and Kirienko, 2017; Kirienko et al., 2016). Grâce à la protéine *Pseudomonas quinolone signal*, qui agit comme une molécule de *quorum sensing*, *P. aeruginosa* initie l'agrégation de plusieurs cellules et active la sécrétion de pyoverdine. Ensuite, le fer est capté par les cellules qui expriment le récepteur au complexe fer-pyoverdine, FpvA, et activera la transcription de *pvdS* codant pour le sidérophore (Kang et al., 2017; Kang and Kirienko, 2017). Au niveau transcriptionnel, PvdS est également sous le contrôle de Fur qui répond aux niveaux de fer intracellulaire (Ochsner et al., 1995). De cette manière, l'accès au fer est un des points de contrôle dans la formation du biofilm. Une étude a démontré que l'incapacité de certains mutants à initier l'attachement des cellules pouvait être contrée par une supplémentation du milieu en fer (O'Toole and Kolter, 1998). En produisant la pyoverdine, *P. aeruginosa* est capable d'initier la formation du biofilm (Banin et al., 2005).

Plus généralement, de nombreux métaux sont retrouvés au sein du biofilm de *P. aeruginosa* et suivent des gradients différents. Par exemple, le centre du biofilm sera plus riche en zinc et manganèse tandis que le fer est retrouvé de manière abondante au sein de toute la communauté (Figure 23) (Wakeman et al., 2016). Cette observation peut être expliquée par un protéome différent entre les bactéries du pourtour du biofilm et les bactéries au centre. En effet, un environnement pauvre en zinc ou en manganèse semble activer la production de sidérophores ce qui pourrait expliquer la présence du fer au sein de tout le biofilm.

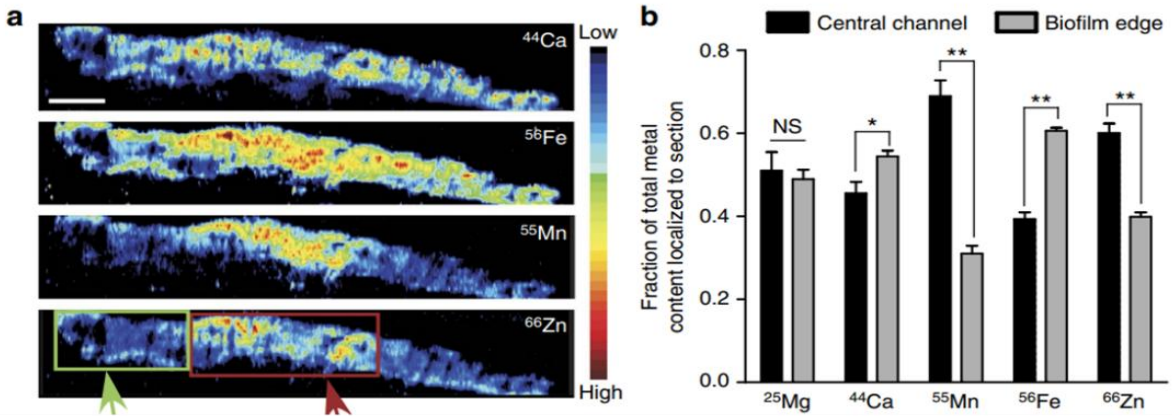


Figure 23 : Différences dans les schémas de distribution des métaux révélés par LA-ICP MS.
(a) Analyse par spectrométrie de masse à plasma induit par couplage inductif par ablation au laser (LA-ICP MS) d'une section de biofilm. Echelle = 2 mm. (b) Quantification des niveaux de métaux sur le bord (rectangle vert) et au niveau du canal central (rectangle rouge) d'un biofilm de P. aeruginosa (Wakeman et al., 2016).

2.3.2.3. Notion de bien commun et régulation de population

Au sein d'un biofilm, la pyoverdine n'est synthétisée que par quelques cellules qui se développent rapidement. D'autres populations de bactéries, qui ne produisent pas ou très peu de pyoverdine, existent et utilisent les sidérophores produits par le premier groupe pour se développer. La pyoverdine devient alors un bien commun entre des organismes producteurs et des « tricheurs » (Lee et al., 2016). Simultanément, les populations produisant moins de producteurs commencent à croître et finissent par rattraper leur retard sur celles qui étaient initialement plus rapides. La pyoverdine s'accumule pour finalement atteindre un plateau, réduisant ainsi l'avantage dont bénéficiaient les populations productrices. Par conséquent, l'augmentation de la fraction globale de producteurs suit un cycle (Figure 7) (Becker et al., 2018).

Une autre solution utilisée par les bactéries productrices consiste à produire des composés toxiques pour les cellules tricheuses tels que l'hydrogène cyanide ou l'H_2O_2. Ce

mécanisme implique entre autres la production de phénazines (facteurs de virulence). Chez *P. aeruginosa*, la pyocyanine est produite grâce au système de *quorum sensing* et est commune à de nombreuses souches, pathogènes ou environnementales. Cette toxine produit un stress oxydant au niveau des cellules cibles grâce à son activité redox qui produit du H_2O_2 et diminue en même temps les niveaux de glutathion. Les bactéries ne possédant pas de *quorum sensing* étant plus vulnérables face au stress oxydant, *P. aeruginosa* contrôle ainsi la présence d'autres bactéries grâce à ses facteurs de virulence. Par conséquent, la production de phénazine sélectionne les bactéries possédant des systèmes de *quorum sensing* et diminue le nombre de bactéries tricheuses (Dietrich et al., 2008; Castañeda-Tamez et al., 2018).

2.4. Bactéries filamenteuses

Les bactéries filamenteuses, incluant majoritairement des *Actinomycetes* et cyanobactéries, correspondent probablement au mode de vie multicellulaire le plus ancien sur Terre. Leur agencement en filaments, linéaires ou branchés, correspond à un enchainement de bactéries accolées qui peuvent même éventuellement partager leur cytoplasme ou périplasme (Flores and Herrero, 2010; Lyons and Kolter, 2015).

2.4.1. Les cyanobactéries

2.4.1.1. Formation des filaments

Les cyanobactéries sont l'une des formes de vie les plus anciennes sur Terre avec des traces de ces dernières datant de plus de 2 milliards d'années (Rasmussen et al., 2008). Elles sont ubiquitaires et sont même retrouvées dans des environnements extrêmes allant des zones polaires à des sources chaudes (Jones et al., 2002; Wharton Jr et al., 1983). Par conséquent, ces organismes ont évolué afin de pouvoir résister à leur environnement. Un de ces mécanismes d'adaptation correspond à une organisation en filaments. La filamentation offre en effet de nombreux avantages. Premièrement, elle permet de répondre au stress environnemental en facilitant la croissance cellulaire sans division membranaire complète ce qui favorise la multiplication des cellules jusqu'à ce que les conditions soient favorables. Ainsi les filaments offrent un autre avantage aux bactéries en leur permettant d'avoir accès à de nouvelles zones riches en nutriments au sein d'un environnement hétérogène. Pour cela, elles facilitent la colonisation bactérienne en augmentant la surface d'adhésion (Karasz et al., 2022). Enfin, la filamentation conditionnelle permettrait aux bactéries d'acquérir un avantage phénotypique, par

rapport à un mode de vie unicellulaire, en réponse aux signaux issus de prédateurs détectés par la colonie et transmis aux cellules (Corno and Jürgens, 2006).

Les cyanobactéries filamenteuses, du genre *Anabaena*, s'organisent en chaines de cellules appelées trichomes (Figure 24). Ces filaments peuvent contenir plusieurs dizaines à quelques centaines de cellules provenant de division binaire classique produisant deux cellules. Parfois, les cyanobactéries peuvent adopter un schéma de division alternatif et se reproduire par bourgeonnement de la cellule ou par division multiple d'une grosse cellule (Angert, 2005). Ces filaments permettent aux micro-organismes d'agir en communauté. La membrane externe des cellules végétatives qui composent cette structure est continue ce que suggère que le périplasme de ces cellules est communiquant au sein du filament (Figure 24) (Flores et al., 2006).

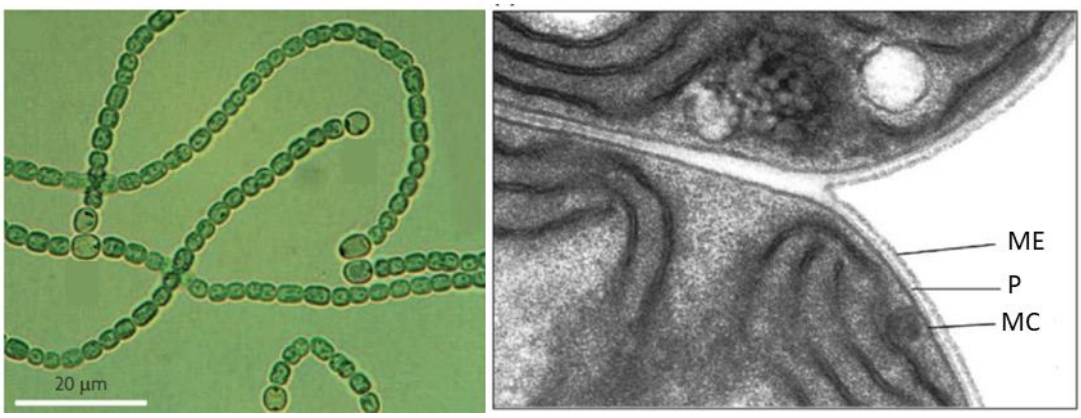


Figure 24 : Structure du filament chez les cyanobactéries.
Certaines cyanobactéries s'organisent en filament. (A) Image de filaments d'Anabaena spp. (Flores and Herrero, 2010). (B) Le périplasme des cyanobactéries contenues dans la filament est continu (Image en microscopie électronique ; ME = Membrane externe, P = Périplasme, MC = Membrane cellulaire) (Flores et al., 2006).

Ces structures multicellulaires sont également adaptées aux variations des conditions environnementales. En effet, les cyanobactéries sont dépendantes de l'azote pour faire fonctionner leur machinerie photosynthétique. En condition de carence prolongée en azote, un régulateur transcriptionnel, NtcA, active la différenciation d'une cellule végétative en hétérocyste. Sa structure membranaire particulière lui permet de former un environnement micro-oxique et de fixer l'azote avec une grande efficacité pour activer la transcription de la nitrogénase par l'intermédiaire du gène *nif* (Flores et al., 2019; Flores and Herrero, 2010). Cette enzyme permet ensuite la synthèse de composés aminés qui seront acheminés vers les cellules végétatives adjacentes sous forme de glutamine. Pour maintenir le système efficace, cette différenciation est toutefois régulée toutes les 10 à 15 cellules végétatives. Ces micro-

organismes ont aussi besoin d'oxygène pour produire des métabolites carbonés et ceci par l'intermédiaire d'une photosynthèse oxygénique dans les cellules végétatives. Ainsi, après leur différenciation, les hétérocystes inhibent la différenciation des cellules adjacentes par l'intermédiaire d'un inhibiteur, PatS, à travers le périplasme commun (Flores and Herrero, 2010). Néanmoins, d'autres ressources, notamment les métaux, conditionnent également le bon fonctionnement de la machinerie photosynthétique (Huertas et al., 2014; Zahra et al., 2020).

2.4.1.2. Accès aux métaux

L'abondance des cyanobactéries dans un milieu dépend de la biodisponibilité des métaux. Pour fonctionner, elles doivent importer les métaux depuis le milieu vers la cellule. La plupart des métaux sont captés par les cyanobactéries par l'intermédiaire de transporteurs de type ABC (Shcolnick and Keren, 2006).

Pour le cuivre, le transport est effectué par l'intermédiaire d'une métallochaperonne cytosolique soluble qui fixe le cuivre entre deux ATPase de type-P (chapitre précédent), CtaA et PacS, localisés à la membrane plasmique et sur la membrane thylakoïdale, respectivement. (Huertas et al., 2014). Le fer est aussi important dans le fonctionnement de ces micro-organismes puisqu'il est impliqué dans la structure des protéines de la chaine photosynthétique. Néanmoins, suite à l'oxygénation de l'atmosphère il y a plusieurs milliards d'années, les cyanobactéries ont dû faire face à une diminution de l'accessibilité au fer qui s'est oxydé (Ilbert and Bonnefoy, 2013). Ce problème se pose également dans les océans aujourd'hui où l'accès au fer est limité (Behrenfeld and Kolber, 1999). Des systèmes « classiques » d'acquisition du fer faisant appel à des sidérophores et des transporteurs de type TonB-dépendant (TBDT) existent (Yong et al., 2023). Pour contrer ces limitations en fer, les cyanobactéries ont développé des systèmes annexes pour s'adapter et s'émanciper des protéines contenant du fer tout en maintenant une activité photosynthétique. Il existe deux types de protéines au sien du thylakoïde qui assurent le transport d'électrons : la plastocyanine, une protéine dépendante du cuivre, et le cytochrome c_6, dépendante du fer. Dans la plupart des cyanobactéries et chez certaines algues, le cytochrome c_6 peut être remplacé par la plastocyanine dont le fonctionnement dépend du cuivre, ce qui réduit considérablement le besoin en fer.

Chez les plantes, le transport d'électrons est uniquement dépendant de la plastocyanine (Weigel et al., 2003). Néanmoins, lorsque les deux protéines coexistent, il devient alors nécessaire de réguler leur production pour éviter des phénomènes de compétition. Chez

Chlamydomonas reinhardtii, une espèce d'algue verte, lorsque le cuivre est en quantité limitée, le facteur de transcription CRR1 active la transcription du cytochrome c_6 (Kropat et al., 2005). Chez les cyanobactéries, le switch plastocyanine/cytochrome existe également et implique le facteur de transcription PetR, de la superfamille BlaI, qui se fixe aux promoteurs *petE* et *petJ*, qui codent respectivement pour la plastocyanine et le cytochrome c6. En l'absence de cuivre, PetR réprime *petE* et active *petJ*. En présence de cuivre, PetR est dégradé par la protéase PetP ce qui a pour conséquence de ne pas inhiber la transcription de plastocyanine qui est constitutive (García-Cañas et al., 2021).

2.4.2. Autres exemples : bactéries câbles et procaryotes magnétotactiques multicellulaires

D'autres formes de filaments existent, les bactéries « câbles » en sont un bon exemple. Elles forment des filaments de plusieurs centimètres de long dans les sols marins et sont capables de transporter les électrons sur de longues distances. En profondeur, les bactéries en milieu anoxique oxydent le soufre pour générer un flux d'électron qui ira vers l'interface sol-eau contenant de l'oxygène. A ce niveau, les bactéries réduiront l'oxygène (ou l'azote), produisant de l'eau et réduira l'acidité du milieu (Malkin et al., 2017; Pfeffer et al., 2012). L'étape d'oxydation du soufre génère également des flux de métaux. Le pH acide généré par cette oxydation dissout les sulfites de fer et les carbonates de calcium qui sont alors acheminés vers la zone oxygénée à l'interface sol-eau. Une fois dans cette zone, le fer mobilisé forme des minéraux et le calcium précipite sous forme de calcite de magnésium (Risgaard-Petersen et al., 2012) . De cette manière, le courant électrique généré par les filaments de bactéries câbles crée un environnement chimique favorable à la relocalisation d'éléments traces et de nutriments au niveau des sols marins.

Par ailleurs, d'autres micro-organismes vivent dans ces zones de transition oxique/anoxique. En effet, une majorité de bactéries du phylum des Protéobactéries sont retrouvées dans l'environnement des bactéries câbles (*Magnetovibrio*) avec notamment une forte association avec des bactéries prédatrices (*Bdellovibrionota* et *Myxococcota*) et des bactéries magnétotactiques (Figure 25) (Liau et al., 2022). Ces bactéries sont équipées de chaines de magnétosomes, de magnétite (Fe_3O_4) ou greigite (Fe_3S_4), qui leur permet de réagir aux champs magnétiques du milieu et de s'adapter aux flux d'oxygène pour se développer (Simmons and Edwards, 2007). Certaines de ces bactéries magnétotactiques sont décrites comme multicellulaires et forment de véritables structures procaryotes magnétotactiques de 10

à 30 cellules arrangées en hélice, reliées par des jonctions membranaires. Chaque agrégat ou organisme contient donc plusieurs centaines de magnétosomes réagissant à l'environnement biogéochimique créé par les bactéries câbles.

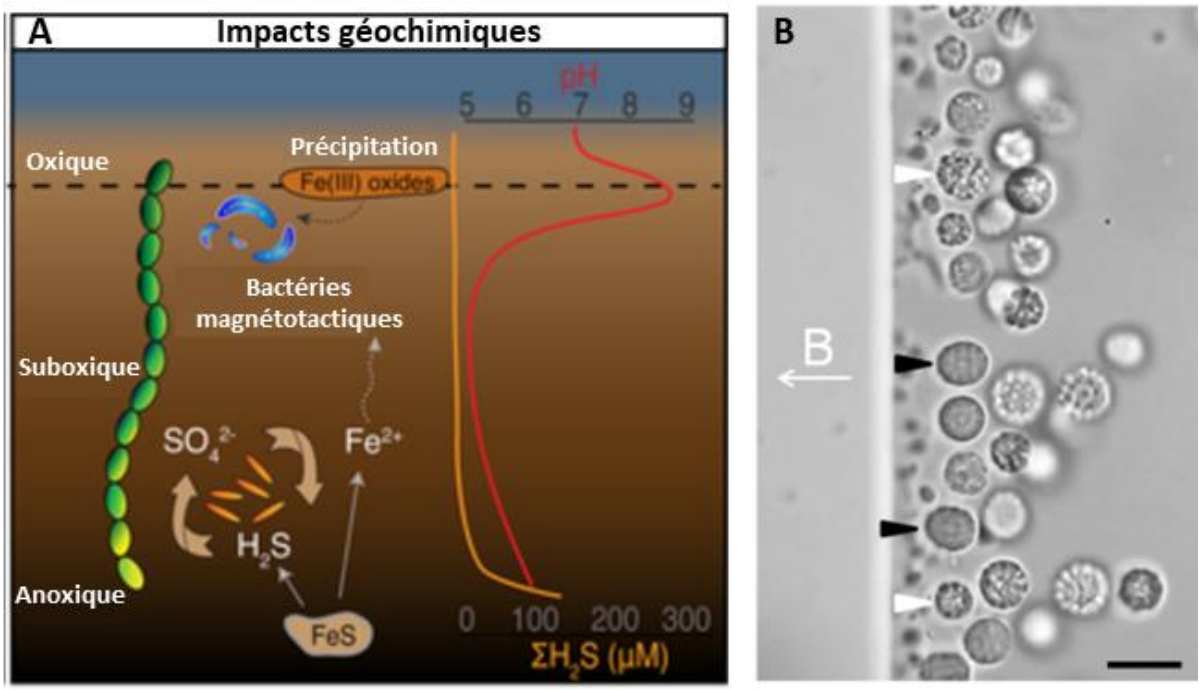


Figure 25 : Bactéries câbles et réorganisation magnétique.

De nombreuses espèces bactériennes dépendent de l'environnement généré par les bactéries câbles. (A) La dissolution acide des sulfites de fer stimule des bactéries à haute exigence en fer (par exemple, Magnetovibrio). Aussi, des modifications de la répartition de l'acidité favorisent le développement de bactéries alcalophiles à la surface des sédiments (par exemple, Thioalkalispira) (Liau et al., 2022). (B) Les procaryotes magnétotactiques multicellulaires s'alignent sur le champ magnétique (la direction du champ magnétique appliqué est indiquée au milieu à gauche, symbole B pour l'intensité d'induction magnétique) et s'accumulent au pôle nord de la gouttelette (Teng et al., 2018).

2.4.3. Streptomyces

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries à Gram positif appartenant au phylum des Actinobacteria (ou Actinomycetota). Leur mode de vie est assez similaire à celui de champignons filamenteux. En effet, les *Streptomyces* forment des hyphes branchés constituant un mycélium végétatif (Flärdh and Buttner, 2009), ce qui sera expliqué plus en détail dans la partie 3.

3. Les Actinomycetes

3.1. Terminologies utilisées chez les champignons

En raison de leur ressemblance morphologique, de nombreux termes utilisés pour la description des bactéries de la classe des Actinomycetes (ou Actinomycetia) sont empruntés au monde des champignons filamenteux, particulièrement en ce qui concerne leur structure cellulaire. En effet, les Actinomycetes sont filamenteux et forment des structures semblables à des hyphes avec une combinaison d'extension de la pointe et de ramification de ces hyphes. C'est ce qui leur a donné leur nom, qui dérive des mots grecs « aktis » ou « aktin » pour rayon et « mukēs » pour champignon (Barka et al., 2016). Les Actinomycetes étaient, au début, considérés comme des formes de transition entre les bactéries et les champignons. De nombreux Actinomycetes, comme les champignons, produisent un mycélium et se reproduisent par sporulation. Les spores sont des structures de résistance qui permettent aux organismes de survivre dans des conditions environnementales difficiles. Elles sont aussi capables de former des hyphes érigés. Cependant, les Actinomycetes ne possèdent pas de membrane nucléaire et renferment des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. La plupart d'entre eux sont sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens. De plus, leurs hyphes sont plus petits que ceux des champignons (Martín-González et al., 2009). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (existence d'espèces anaérobies strictes, sensibilité à des actinophages...) affirment leur classification parmi les bactéries (Demain and Solomon, 1985; Mariat and Sebald, 1990). En résumé, les similitudes morphologiques entre les Actinomycetes et les champignons ont conduit à l'utilisation de termes fongiques pour décrire les caractéristiques des Actinomycetes. Cependant, il est important de noter que ces organismes appartiennent à des groupes biologiques distincts et ont des caractéristiques biologiques et génétiques différentes.

3.2. Caractéristiques

3.2.1. Classification

Le phylum des Actinobacteria est l'une des plus grandes unités taxonomiques au regard des principales lignées actuellement reconnues dans le domaine bactérien (Ludwig et al., 2012). A ce jour, il regroupe 6 classes, 18 ordres, 14 sous-ordres, 63 familles et 374 genres, avec les *Streptomyces* comme le plus grand genre de ce phylum (Parte et al., 2020). Les Actinobacteria sont des bactéries à Gram-positif avec des génomes à fort pourcentage de guanine-cytosine (GC%) entre 50 et 70%. Beaucoup d'entre elles sont des organismes saprophytes (ils tirent les

substances qui leur sont nécessaires des matières organiques en décomposition) et passent la majorité de leur cycle de vie sous forme de spores semi-dormantes (Mayfield et al., 1972). La plupart d'entre elles sont des bactéries filamenteuses (Mariat and Sebald, 1990) et sont utilisées dans de nombreux domaines (médecine humaine, vétérinaire, biotechnologies et écologie). Dans une étude de 2021, des chercheurs du département égyptien de biotechnologie microbienne mettent en avant la forte diversité de ce phylum et insistent sur la nécessité de poursuivre les efforts sur l'isolement de ces bactéries métaboliquement polyvalentes (Selim et al., 2021). Si les Actinobacteria sont isolées depuis des environnements très divers, la majorité d'entre elles provient principalement d'un large éventail de sols terrestres (rhizosphère, sol hypersalin, calcaire), de plantes ainsi que de divers écosystèmes aquatiques d'eau douce ou marines, des points chauds de grotte volcanique ou des déserts (Figure 26) (Tiwari and Gupta, 2013). D'autres interagissent avec des organismes vivants comme des plantes ou des animaux et font partie du microbiote intestinal (Chevrette et al., 2019; Flórez et al., 2015; Golinska et al., 2015; Hidalgo-Cantabrana et al., 2017; Jose and Jha, 2017; Mohammadipanah and Wink, 2016; Rey and Dumas, 2017; Selim et al., 2021; Stach and Bull, 2005; Wang et al., 2018). De cette manière, les Actinobacteria ont su s'adapter à divers environnements par le biais de l'évolution de différent systèmes de biosynthèse de métabolites secondaires et des molécules bioactives, raison pour laquelle elles ont attiré notre attention (Adnani et al., 2017; Jose et al., 2021; Lewin et al., 2016; Sayed et al., 2020; Sivakala et al., 2021; van der Meij et al., 2017).

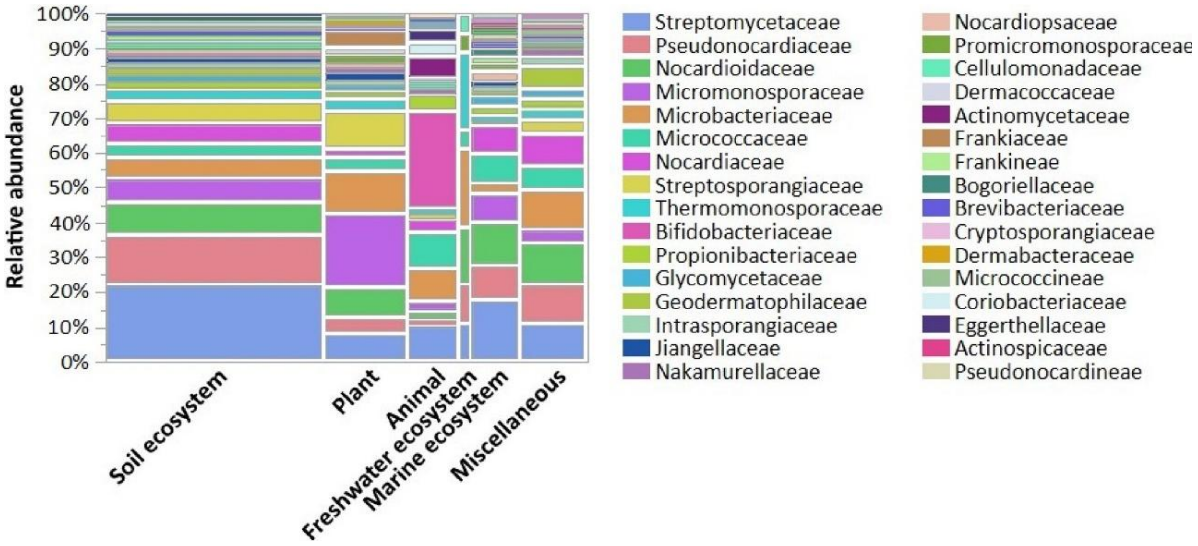


Figure 26 : Abondance relative des nouvelles Actinobacteria.

Le graphique en mosaïque montre les rapports relatifs des nouveaux membres affiliés aux Actinobacteria (au niveau de la famille) à partir de différentes sources d'isolement.

Les termes Actinobacteria et « Actinomycetes » sont souvent utilisés de manière interchangeable, mais ils désignent en réalité des unités taxonomiques différentes de micro-organismes. En effet, les Actinomycetes forment une classe appartenant au phylum des Actinobacteria caractérisé par leur capacité à former des filaments ramifiés appelés hyphes. Ainsi, toutes les Actinomycetes sont des Actinobacteria, mais toutes les Actinobacteria ne sont pas des Actinomycetes.

3.2.2. Morphologies

Les Actinomycetes présentent la plus grande différenciation morphologique parmi les bactéries Gram positif. Les Actinomycetes classiques produisent un mycélium radial bien développé et peuvent former différentes structures complexes, comme des spores, des chaines de spores, des sporanges et des sporangiospores. Les modes de croissance et d'extraction du mycélium du substrat, la position de la spore, le nombre de spores, les structures de surface des spores, la forme des sporanges et le fait que les sporangiospores aient ou non des flagelles sont toutes des caractéristiques morphologiques importantes de la classe des Actinomycetes. Les conditions de culture influencent la différenciation cellulaire chez ces bactéries. En effet, dans certains milieux, les souches produisent ou non des spores (Li et al., 2016). La couleur du mycélium et la production de pigments mélanoïdes diffusables sont aussi des caractéristiques permettant de classer les Actinomycetes. Ce sont des bactéries qui arborent différentes morphologies (Figure 27) : des coques (ex : *Micrococcus*), des bâtonnets (ex : *Arthrobacter*), des mycélium fragmentés (ex : *Nocardia*) ou de mycélium branché hautement différencié (ex : *Streptomyces*).

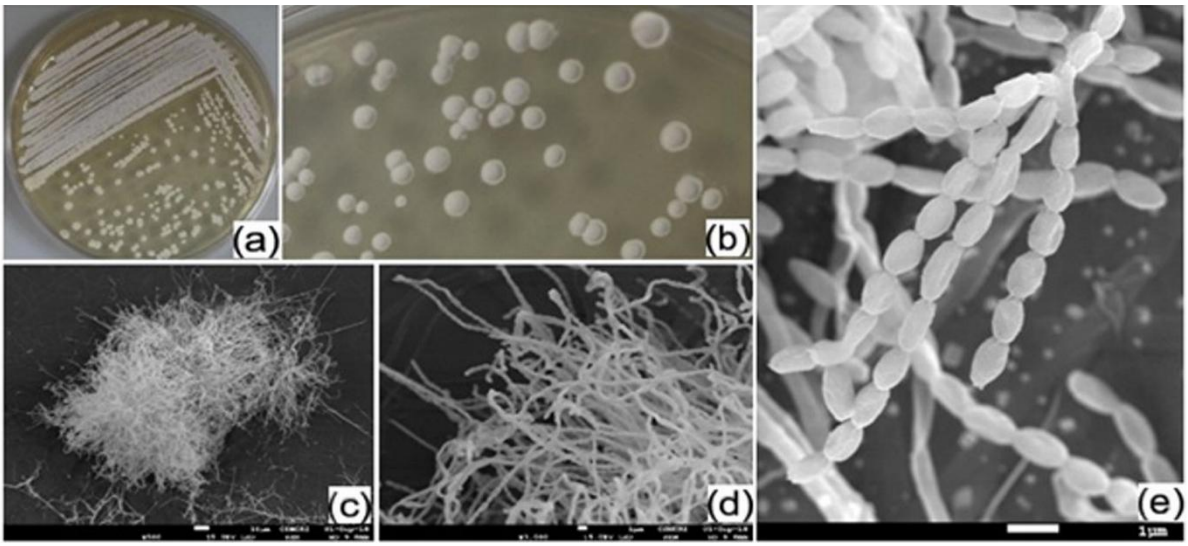


Figure 27 : Aperçu du mode de vie des Actinomycetes.
Les Actinomycetes se développent par extension de la pointe et ramification d'hyphes qui se différencient en spores. (a)(b) : morphologie de colonie ; (c)(d) : images MEB montrant une croissance filamenteuse ; (e) : image MEB focalisée sur les spores (Jose et al., 2021).

En plus de former des structures aériennes sur milieux solides, elles forment également des structures compactes en milieux liquides. Par exemple, les bactéries du genre *Streptomyces*, appartenant à la classe des Actinomycetes, présentent des morphologies allant de la croissance fragmentée à des touffes denses (ou *pellets*) en milieu liquide. La formation de ces *pellets* est généralement favorisée par des conditions de culture spécifiques, comme des concentrations élevées de nutriments, des agitations à grande vitesse ou encore un pH ou des températures particuliers. Ces *pellets* ont un grand intérêt industriel car ils facilitent la production de certains métabolites secondaires (Barka et al., 2016).

Que ce soit en milieu liquide ou solide, des études ont montré une hétérogénéité multi-échelle dans les structures des organismes filamenteux (Figure 28). L'une des conséquences de la croissance en *pellets* denses est que les hyphes dans la partie centrale de ces particules sont généralement en condition de carence en raison de la disponibilité limitée d'oxygène et de nutriments. L'impact de cette carence en nutriments et en oxygène sur la croissance en *pellets* est également présent dans d'autres communautés multicellulaires comme les biofilms qu'ils soient formés par une ou plusieurs espèces (Kragh et al., 2016; Zacchetti et al., 2018).

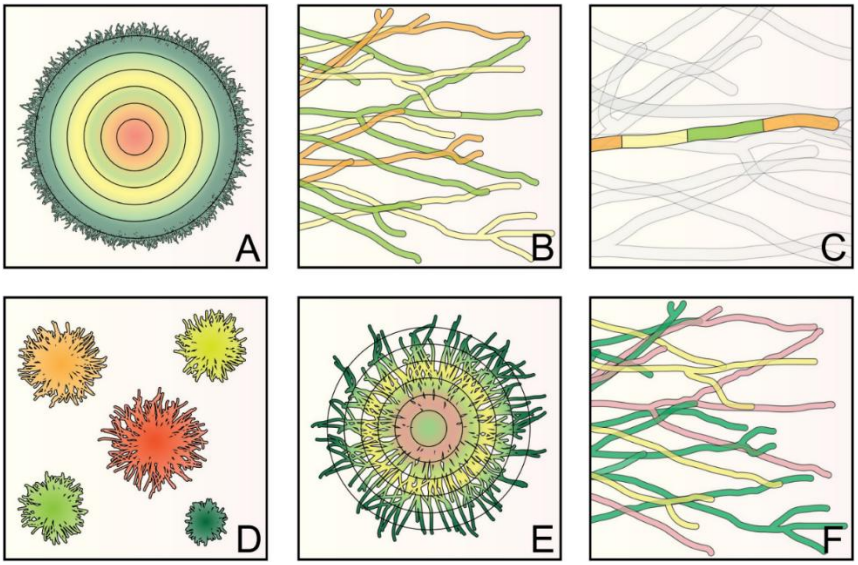


Figure 28 : Hétérogénéité multi-échelle chez les micro-organismes filamenteux.
L'hétérogénéité a été démontrée à différents niveaux organisationnels dans les cultures solides (A – C) et liquides (D – F). L'hétérogénéité interzonale (A) est caractérisée par des différences spatiales de production (et/ou de sécrétion) de molécules dans différentes zones de la colonie. L'hétérogénéité est également évidente entre les hyphes adjacents dans la même région de la colonie (B), et même entre des compartiments distincts d'un même hyphe (C). Dans les environnements de culture liquide, les pellets sont de taille hétérogène, ce qui coïncide avec des différences dans l'expression des gènes et la sécrétion de protéines (D). L'hétérogénéité est également évidente au sein des pellets (E), dont certaines peuvent être causées par le manque de nutriments et d'oxygène dans les parties centrales de ces structures. Comme dans les cultures en milieu solide, une hétérogénéité inter compartimentale est observée au sein des hyphes dans les cultures en milieu liquide (F) (Zacchetti et al., 2018).

3.2.3. Cycle de vie

Généralement les Actinobacteria sont chimioorganotrophes, mésophiles, neutrophiles, non halophiles et non fixatrices d'azote. Cependant, il existe cependant une forte diversité physiologique car on peut également retrouver des thermophiles, des psychrophiles, des acidophiles, des alcalophiles, des halophiles ou des fixatrices d'azote (Goodfellow, 2012).

Les Actinomycetes se distinguent entre autres par leur cycle de vie qualifié de complexe. En effet, elles ont la capacité de former des filaments, ou des structures semblables à des filaments, et former des spores, permettant aux bactéries de survivre dans des conditions environnementales défavorables. Le cycle de vie des Actinomycetes est le fruit de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence aboutissant à la mort (Barka et al., 2016).

3.2.3.1. Germination des spores et croissance active

Le cycle commence par la germination d'une spore uninucléoïde. Elle est capable de résister à la dessiccation ainsi qu'à d'autres stress de nature physique ou chimique. Les spores des Actinomycetes peuvent être flagellées. Lorsque les conditions sont propices, c'est-à-dire en présence de nutriments et d'un environnement humide, les spores germent pour donner naissance à des cellules actives avec une polarité cellulaire différente. Ce mycélium dit végétatif commence avec la germination d'une spore qui acquiert une polarité cellulaire et forme un hyphe (McCormick and Flärdh, 2012). Ce mycélium est formé d'hyphes multi-nucléoide, ramifiés et ancrés dans le milieu lorsque celui est solide. Il va permettre de puiser, jusqu'en profondeur du milieu, les nutriments nécessaire au bon développement des cellules qui vont sécréter des enzymes de dégradation permettant l'hydrolyse de macromolécules en monomères assimilables comme la cellulose, le mannane ou la chitine (Aguiar et al., 2023), des protéines (protéases) ou encore des acides nucléiques (nucléases) (Bao et al., 2021).

3.2.3.2. Croissance aérienne

Bien que les conditions ne soient pas encore bien comprises, certains signaux et/ou conditions de culture vont conduire à la formation d'un mycélium végétatif qui va se différencier et produire un mycélium aérien. Comme son nom l'indique, le mycélium aérien se développe de façon perpendiculaire au milieu (dans l'air) et ne peut donc pas puiser ses ressources nutritives dans le milieu. Pour cela, le mycélium aérien assure la survie de l'espèce en favorisant la dispersion des spores dans l'environnement loin de la colonie parentale afin de réduire la compétition des ressources. Le mycélium végétatif sert également de subtrat pour le mycélium aérien qui n'a pas un accès direct aux ressources du substrat. Pour cela, le mycélium végétatif met en place un système de mort cellulaire programmée et les produits issus de cette lyse sont réutilisés par le mycélium aérien (Figure 29) (Manteca et al., 2005; Miguélez et al., 1999). Le début du dévelopemment morphologique est corrélé à la production d'antibiotiques. La lyse libère des aminosucres (N-acétylglucosamine (GlcNAc) et N-acétylmuramique (MurNAc)), qui sont les composants du peptidoglycane, autour des colonies ce qui déclenche le développement et la production d'antibiotiques. En conditions riches, ce processus n'est pas mis en place par les bactéries. GlcNAc est internalisé sous forme de GlcNAc-6-phosphate et converti en glucosamine 6-phosphate (GlcN-6P), qui fonctionne comme un ligand pour le régulateur DasR. La liaison du GlcN-6P inactive le répresseur DasR (un régulateur global sensible aux nutriments présents dans l'environnement), ce qui entraîne la dé-répression des

activateurs spécifiques de la voie de gènes biosynthétiques des antibiotiques. La production d'antibiotiques qui en résulte (tels que l'antibiotique dépendant du calcium 574 (Cda), la coélimycine P1 (Cpk) et l'actinorhodine (Act)) fournit une ligne de défense pour protéger les nutriments libérés par l'apoptose du mycélium végétatif contre les bactéries saprophytes mobiles (Figure 29).

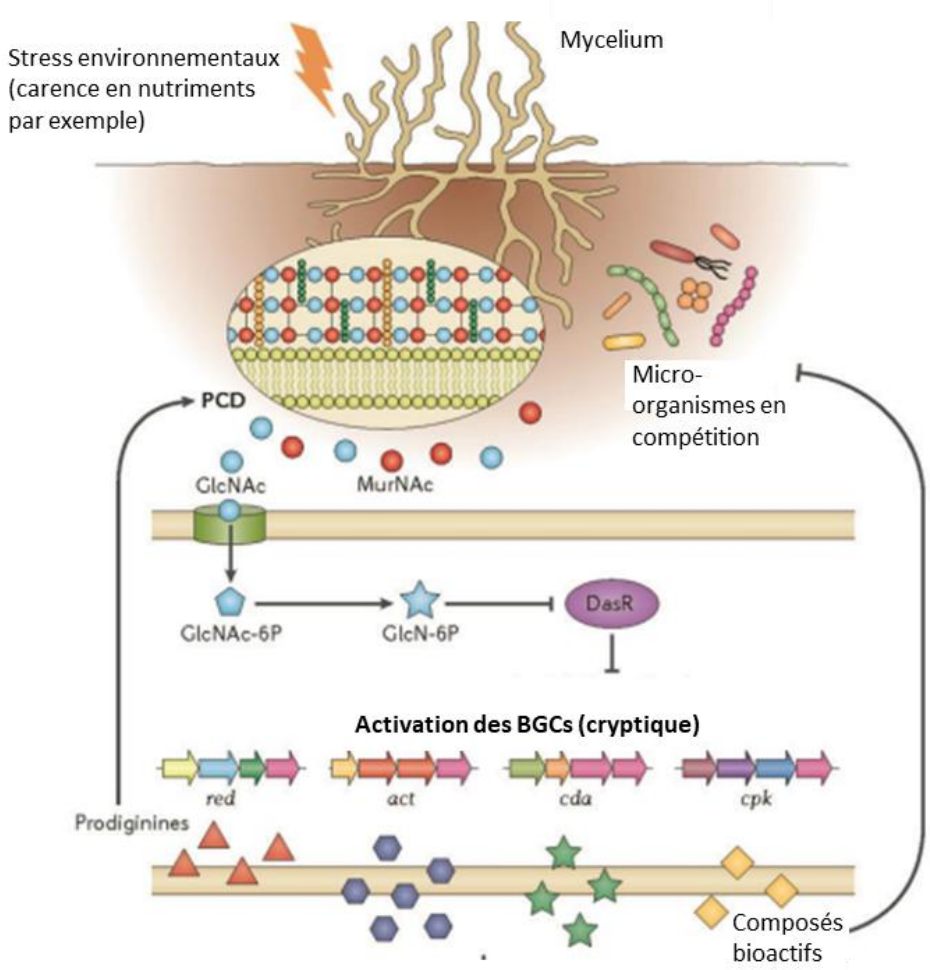


Figure 29 : Modèle de l'activation des regroupements de gènes impliqués dans la biosynthèse d'antibiotiques chez Streptomyces.

En cas de stress environnemental, la mort cellulaire programmée conduit à la dégradation autolytique des anciens mycéliums, libérant les nutriments nécessaires pour alimenter le nouveau mycélium aérien. Le peptidoglycane de paroi cellulaire est recyclé pour libérer les aminosucres N-acétylmuramique (MurNAc) et N-acétylglucosamine (GlcNAc). La GlcNAc est internalisée sous forme de GlcNAc-6P et convertie en GlcN-6P, qui fonctionne comme un ligand pour le régulateur global DasR. La liaison de GlcN-6P inactive le répresseur DasR, ce qui entraîne la dé-répression des activateurs spécifiques de voies des clusters de gènes biosynthétiques d'antibiotiques (BGCs). La production résultante fournit une ligne de défense pour protéger les nutriments libérés par l'autolyse contre les bactéries saprophytes mobiles (Bergeijk et al., 2020).

La synthèse de métabolites est optimale lorsque les Actinomycetes atteignent une phase de croissance avancée, généralement lorsque le mycélium est suffisamment développé

(Manteca et al., 2005). Cette phase s'associe souvent à des conditions de stress dues à la limitation des nutriments ou la compétition avec d'autres organismes. Le mycélium aérien offre ainsi plusieurs avantages puisqu'il permet dans un premier temps aux cellules de s'échapper d'un substrat appauvri pour libérer des spores qui migreront vers des zones plus riches. Par ailleurs, le développement de cellules en dehors du substrat permet une utilisation plus efficace de ressources par le mycélium végétatif qui est quant à lui limité dans sa capacité à explorer et coloniser de nouvelles niches écologiques. Enfin la formation d'une mycélium aérien est souvent associée à la production de métabolites secondaires, tels que des antibiotiques comme décrit précédement, permettant d'inhiber la croissance de microorganismes concurrents et d'optimiser l'exploitation des ressources locales par le mycélium végétatif (Dyson, 2009). La production de métabolites secondaires peut varier en fonction des espèces d'Actinomycetes, des conditions de culture et des stimuli environnementaux. Par ailleurs, toutes les Actinomycetes ne produisent pas nécessairement des métabolites secondaires (Chater, 2006; Khushboo et al., 2022; Yagüe et al., 2014).

Le mycélium aérien se développe dans l'air et de manière verticale. Les hyphes se développent au niveau apical (Flärdh, 2010; Zacchetti et al., 2018) et s'accompagnent de la formation de septa, conduisant à des unités uni-génomiques. Les zones d'assemblage de la paroi cellulaire se situent aux extrémités des hyphes, y compris les extrémités des nouvelles branches des hyphes. La septation est possible grâce aux protéines DivIVA qui jouent un rôle dans la division cellulaire et la morphologie de certaines bactéries (*Streptomyces*) (Figure 30). Elles interagissent notamment avec FtsZ, une protéine cruciale dans la formation des septa. Elles permettent également d'aider à déterminer où la division cellulaire se produit, contribuant ainsi à la morphogenèse et à la différenciation cellulaire en se localisant de manière asymétrique dans la cellule. En somme, DivIVA a un rôle crucial pour assurer une croissance et une division cellulaire correctes, ainsi que pour adapter les bactéries à différents environnements et modes de vie (Flärdh, 2010; Flärdh and Buttner, 2009).

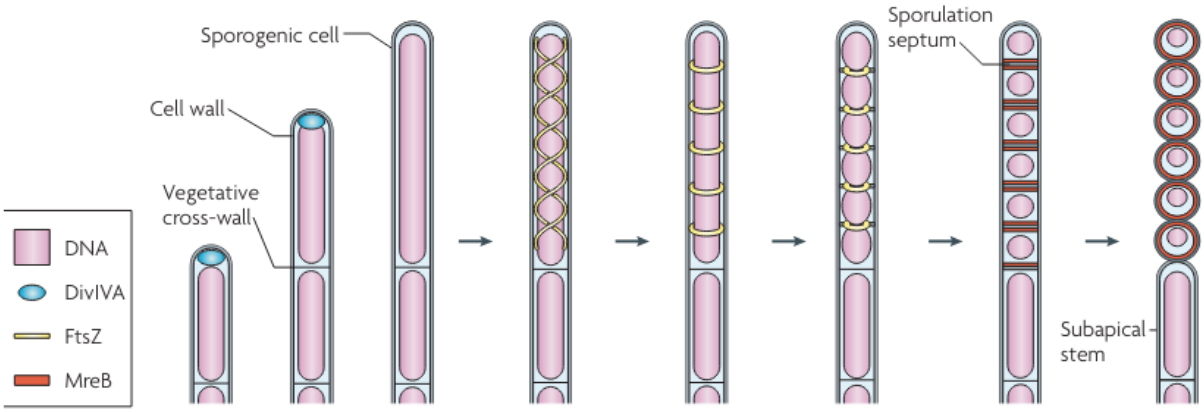


Figure 30 : Orchestration de l'assemblage de la paroi cellulaire et de la division cellulaire.
Les hyphes aériens se développent par extension de la pointe et portent des assemblages apicaux de DivIVA. La formation d'une cellule sporogène apicale (souvent enroulée et généralement plus longue que celle présentée dans ce schéma simplifié) implique l'arrêt de la croissance. FtsZ s'assemble en filaments hélicoïdaux, qui sont remodelés en anneaux Z régulièrement espacés qui dirigent la septation de la sporulation. Une fois les septa terminés, les préspores assemblent des parois de spores épaisses, ce qui nécessite l'actine bactérienne MreB. Initialement, MreB se localise dans les septa de fermeture, mais s'étend ensuite autour de la spore en développement (Flärdh and Buttner, 2009).

La différenciation cellulaire chez *Streptomyces* est également régie par différents gènes. Le premier groupe de gènes est appelé *bld* (*bald*, chauve) car les mutants *bld* ne présentent pas la même morphologie de colonie blanche caractéristique de la présence du mycélium aérien du type sauvage. Même si le rôle précis de ces derniers reste encore inconnu, il semble qu'ils soient impliqués dans différents processus de signalisation importants pour l'affranchissement des bactéries vis-à-vis de la tension de surface par l'intermédiaire de la voie *sky*. Cette voie contrôle l'expression des gènes *ram*, *chp* et *rdl* (*cf* ci-dessous) conférant une hydrophobicité de surface aux hyphes et aux spores aériennes. Le deuxième groupe de gènes est responsable de la maturation des hyphes aériens et la sporulation. Ils sont appelés gènes *whi* (*white*, blanc), faisant référence à l'apparence blanche des mutants en raison de leur incapacité à produire des spores. En effet, ces derniers sont à la fois impliqués dans la subdivision des extrémités des hyphes aériens en compartiments de préspores et la maturation des spores eux-mêmes (Figure 37) (Flärdh and Buttner, 2009; Li et al., 2016).

3.2.3.3. Formation des spores et dispersion

Lorsque les bactéries se retrouvent dans des conditions environnementales fortement défavorables, les Actinomycetes vont former des spores à partir du mycélium aérien afin de permettre la dissémination et la survie à long terme de l'espèce. Les hyphes aériens reproducteurs se différencient en longues chaines de spores grâce à un grand nombre de

protéines qui intéragissent entre elles. Ce développement est controlé entre autres par les gènes *bld*, *whi*, *fts*, *ssg* et *par*. En carence nutritionnelle, les métabolites dérivés de la paroi cellulaire, issus de l'apoptose du mycélium, stoppent la croissance précoce et inhibent la protéine DasR, senseur nutritionnel. Les protéines Bld et les signaux environnementaux contrôlent alors la croissance aérienne et la production d'antibiotiques. Le régulateur principal du développement BldD (lorsqu'il est lié au di-GMP cyclique tétramère) réprime la transcription des gènes de nombreuses protéines régulatrices clés du développement, notamment WhiB, WhiG, SsgA et SsgB, ainsi que FtsZ. Pour initier la sporulation, SsgA se localise dynamiquement dans les jeunes hyphes aériens et ParA est limité à la pointe de l'hyphe (SsgB et FtsZ sont encore diffuses à ce stade). Ensuite, SsgA et SsgB se colocalisent temporairement de chaque côté des hyphes aériens et ParA s'étend vers le bas sous forme de longs filaments. Des complexes ParB se forment ensuite sur les chromosomes non condensés, tandis que FtsZ s'assemble en filaments contournés. En interagissant avec SsgAB, des échelles de FtsZ se forment et délimitent les compartiments des spores. En parallèle, les protéines Whi (WhiAB et SsgB) contrôlent la croissance aérienne. La condensation et la ségrégation des chromosomes sont suivies par la fermeture du septum et la maturation des spores. Le début de la production d'antibiotiques est généralement corrélé à la transition de la croissance végétative vers la croissance aérienne. Les spores libérées peuvent alors être dispersées par divers moyens tels que le vent, l'eau ou les insectes permettant de coloniser de nouveaux environnements (Figure 31) (Barka et al., 2016; Bush et al., 2022).

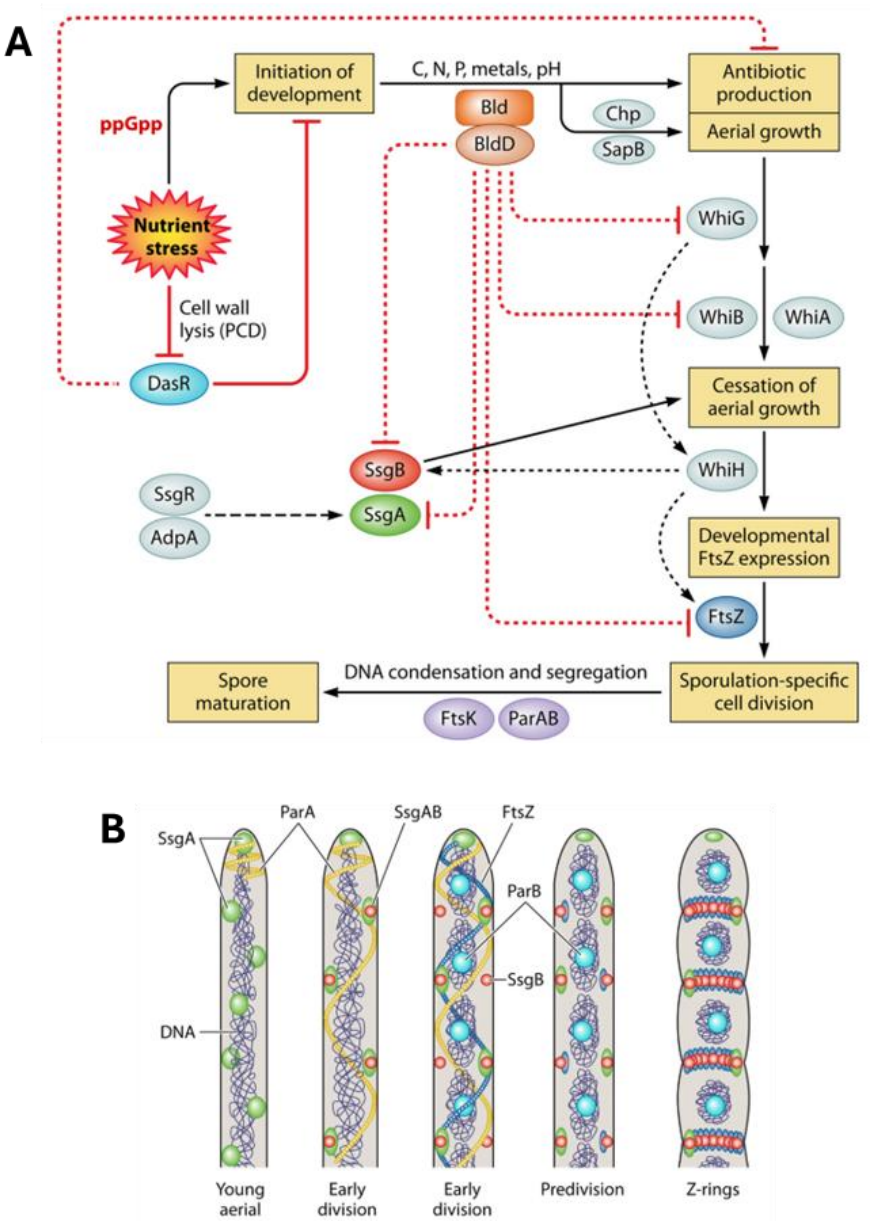


Figure 31 : Événements majeurs au cours du développement de Streptomyces.

(A) En carence nutritionnelle, la croissance végétative s'arrête pour permettre au mycélium aérien de former des spores. Les flèches noires pleines représentent les transitions majeures du développement. Les lignes pointillées sombres indiquent le contrôle transcriptionnel (flèches pour l'activation, ovales pour la répression). (B) les étapes de la sporulation sont contrôlées par différentes protéines : SsgA, SsgB, ParA, ParB et Fts (Barka et al., 2016).

3.2.3.4. Tension de surface et Streptomyces

La tension de surface est un phénomène physique qui se produit à l'interface entre deux phases, généralement entre un liquide et un gaz ou entre deux liquides non miscibles. Dans le cas des bactéries à croissance aérienne, comme les bactéries qui se développent à la surface d'un liquide ou d'un milieu solide, la tension de surface est un obstacle à la croissance des bactéries. Dans ce contexte, les bactéries doivent mettre en place des mécanismes pour pouvoir

s'affranchir de cette tension et développer leurs structures aériennes dans un environnement hydrophobe (Sadiki et al., 2017; Soumya et al., 2013). En effet, chez les Actinomycetes ce phénomène nécessite le passage des hyphes d'un milieu liquide à une surface à l'air libre s'accompagnant d'un changement d'hydrophobicité. Pour cela, elles doivent s'extraire de la force tensioactive présente à l'interface eau/air.

Dans la littérature, de nombreuses études s'intéressent à la formation des hyphes et du mycélium aérien des *Streptomyces*. Les hyphes du mycélium végétatif sont hydrophiles alors que les hyphes aériens sont hydrophobes, du fait d'une ou plusieurs couches superficielles aussi appelées « couches de bâtonnets ». Trois types de protéines sécrétées sont impliquées dans la diminution de la tension de surface et la rigidité des hyphes aériens : SapB, les *chaplins* (annotées Chp) et les *rodlins* (annotées Rdl) (Figure 37) (Claessen et al., 2004).

SapB est un petit peptide sécrété en « milieu riche » par *S. coelicolor*. Ce petit peptide est produit par le groupe de gènes de la formation des hyphes *rapid aerial mycelium* (*ram*), l'opéron *ramCSAB* (Figure 32). Un régulateur de réponse, RamR, contrôle l'activation de la transcription de l'opéron *ram*. Le gène *ramS* code pour un précurseur de 42 acides aminés, SapB. Le gène *ramC* code pour une SapB synthase qui va permettre la modification post-traductionnelle de SapB. RamC permettrait également de convertir quatre résidus sérine en déhydroalanines, dont deux réagissent avec des cystéines pour former des anneaux de lanthionine. Les lanthibiotiques sont des antibiotiques oligopeptidiques synthétisés par les ribosomes et produits par des bactéries à gram positif. Bien que SapB présente des similitudes avec les lanthibiotiques, il ne présente aucune activité antibiotique et semble avoir développé une nouvelle fonction en tant que peptide tensioactif (Capstick et al., 2007; Flärdh and Buttner, 2009). Une protéase inconnue élimine le peptide leader de SapB. Le peptide tensioactif SapB mature de 21 résidus est ensuite exporté par le transport ABC codé par les gènes *ramA* et *ramB*. Une fois sécrété, SapB abaisse la tension superficielle de l'environnement aqueux pour permettre aux hyphes de se développer dans l'air. Chez une autre espèce de *Streptomyces*, *S. tendae*, SapB n'est pas présent mais SapT est produit par la souche pour effectuer la même fonction que SapB. Cela suggère que cette molécule est nécessaire à la croissance aérienne des Actinomycetes (Kodani et al., 2005).

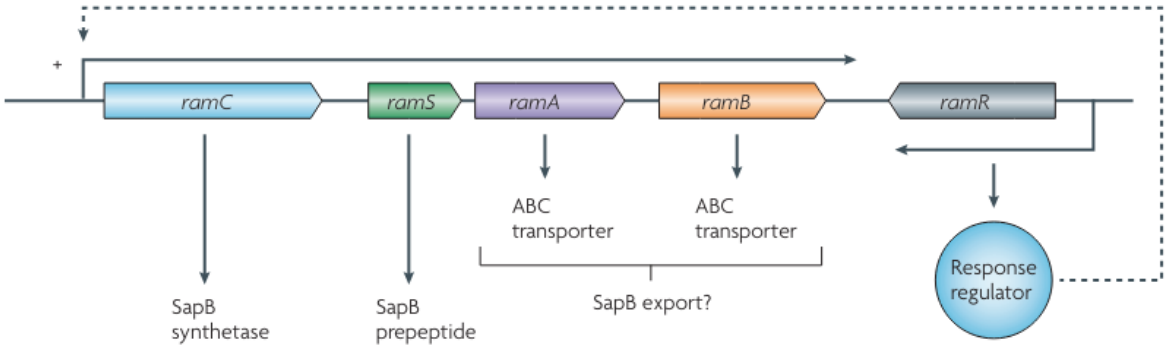


Figure 32 : Opéron ramCSAB de S.coelicolor permettant la biosynthèse de SapB.
SapB est produit par le cluster ram. ramR code un régulateur de réponse qui contrôle l'activation de l'opéron ramCSAB transcrit de manière convergente. Le gène ramS code le prépeptide SapB de 42 acides aminés, qui subit une modification post-traductionnelle importante, catalysée par la synthetase SapB, RamC (Flärdh and Buttner, 2009).

Néanmoins, SapB n'est pas produit sur un milieu minimal alors que les bactéries forment des hyphes aériens dans ces conditions. Ce qui suggère qu'il existe une voie de formation de mycélium aérien ne dépendant pas de SapB. Cette voie est orchestrée par les protéines de la gaine hydrophobe : les *chaplins* et les *rodlins*.

Les *chaplins* appartiennent à une famille de petites protéines hydrophobes produites par les *Streptomyces*. Elles jouent un rôle essentiel dans la formation des hyphes aériens et des spores, ainsi que dans la régulation de la morphogenèse et de la communication cellulaire au sein des colonies de *Streptomyces*. Elles confèrent un pouvoir hydrophobe aux hyphes aériens.

Cette classe se compose de huit protéines sécrétées, ChpA à ChpH, présentes dans les parois cellulaires des hyphes. Elles partagent un domaine hydrophobe conservé d'environ 50 acides aminés, appelé le domaine Chaplin. Ces protéines peuvent être présentes sous deux formes, courtes ou longues. Chez *S. coelicolor*, les cinq *chaplins* courtes (ChpD-H, environ 63 acides aminés) possèdent un peptide signal (sec) suivi d'un domaine Chaplin. Les trois *chaplins* dits longues (ChpA-C, environ 225 acides aminés) possèdent deux domaines chaplin suivis d'une étendue d'acides aminés hydrophiles (région flexible) et d'un domaine d'ancrage à la paroi cellulaire des hyphes aériens par des enzymes sortase. Les *chaplins* s'auto-assemblent en filaments de type amyloïde aux interfaces air-eau *in vitro*, et il est probable que les *chaplins* courtes soient ancrées à la surface des hyphes aériens *in vivo* par hétéropolymerisation avec les *chaplins* longues ancrées dans la paroi cellulaire pour former des filaments chaplin hydrophobes et rigides aussi appelés fibrilles (Figure 33) (El Othmany et al., 2021; Flärdh and Buttner, 2009).

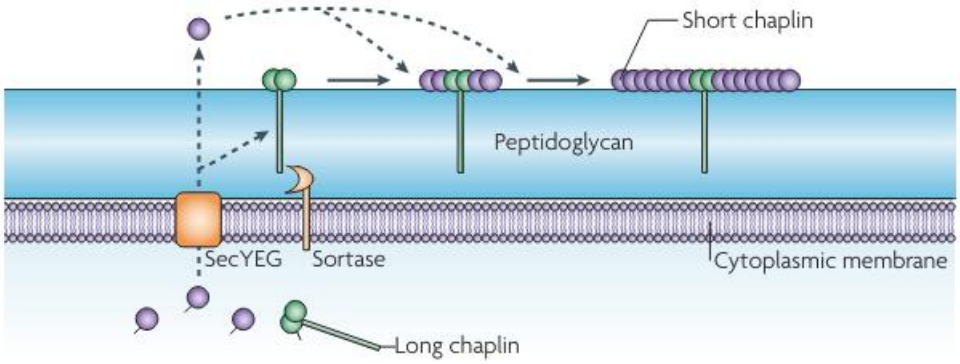


Figure 33 : Modèle d'intégration des chaplins au sein de la paroi de S. coelicolor.
Les chaplins longues (ChpA, ChpB et ChpC) sont exportées via le système Sec et s'attachent de manière covalente à la paroi cellulaire des hyphes aériens par une enzyme sortase via un signal carboxy-terminal. Le domaine central des chaplins longues s'étend sur la couche de peptidoglycane et les domaines chaplin hydrophobes tandem C-terminaux se trouvent à la surface de la paroi cellulaire. Les chaplins courtes (ChpD – H ; également exportés via le système Sec) sont constituées d'un seul domaine de chaplin et sont proposés pour s'hétéropolymériser avec les chaplins longues pour former des filaments de chaplin hydrophobes étendus à la surface de la cellule, et les filaments sont par conséquent ancrés à la paroi (Flärdh and Buttner, 2009).

Des expériences ont montré que l'expression des gènes *chp* était activée avant la formation du mycélium aérien sur des milieux riches et minimum. De plus, une souche délétée des huit gènes *chaplins* ne produit pas d'hyphes sur milieu minimum et en possède moins en milieu riche. Lorsque les cellules ne produisent ni les protéines *chaplins* ni SapB, elles sont qualifiées de chauves. Ces observations suggèrent que ces deux molécules jouent un rôle important dans la formation des hyphes aériens chez *S. coelicolor*. En effet, une quantification *in vitro* de SapB et des *chaplins* ont mis en évidence une puissante activité tensioactive aux interfaces air-eau. Cette capacité de modification de la tension de surface est vraisemblablement centrale dans la fonction des *chaplins* et de SapB, permettant aux hyphes aériens reproducteurs de s'échapper de l'environnement aqueux du mycélium végétatif et de se développer dans l'air (Capstick et al., 2007; Claessen et al., 2003; Flärdh and Buttner, 2009).

Enfin, les autres composants de la gaine hydrophobe sont les protéines *rodlins*, ce sont des protéines de 131 et 133 acides aminés (Yang et al., 2017). RdlA et RdlB sont nécessaires à la formation de la couche de bâtonnets. Elles sont sécrétées dans la paroi cellulaire des hyphes aériens où elles forment une couche superficielle insoluble stable. Elles ne jouent pas un rôle dans la réduction de la tension de surface. Des souches délétées à la fois de *rdlA* et de *rdlB* ont toujours la capacité de former une gaine hydrophobe et un mycélium aérien. En revanche, des images de microscopie électronique à balayage ont montré que la souche sauvage présente une couche de bâtonnets, décrite comme une feuille de bâtonnets ordonné selon un motif en mosaïque (Figure 34A). Dans les souches mutantes la surface des spores et des hyphes apparait

plus lisse sans structure fibreuse (Figure 34B). Le phénotype sauvage est restauré lorsque le gène *rdlB* est introduit dans le mutant *ΔrdlB* (Figure 34C). La souche présentant le double mutant est dépourvue de motif de bâtonnets (Figure 34D) et l'apport des deux gènes permet de complémenter le phénotype mutant et de restaurer le phénotype sauvage (Figure 34E) (Claessen et al., 2002; Flärdh and Buttner, 2009; Yang et al., 2017).

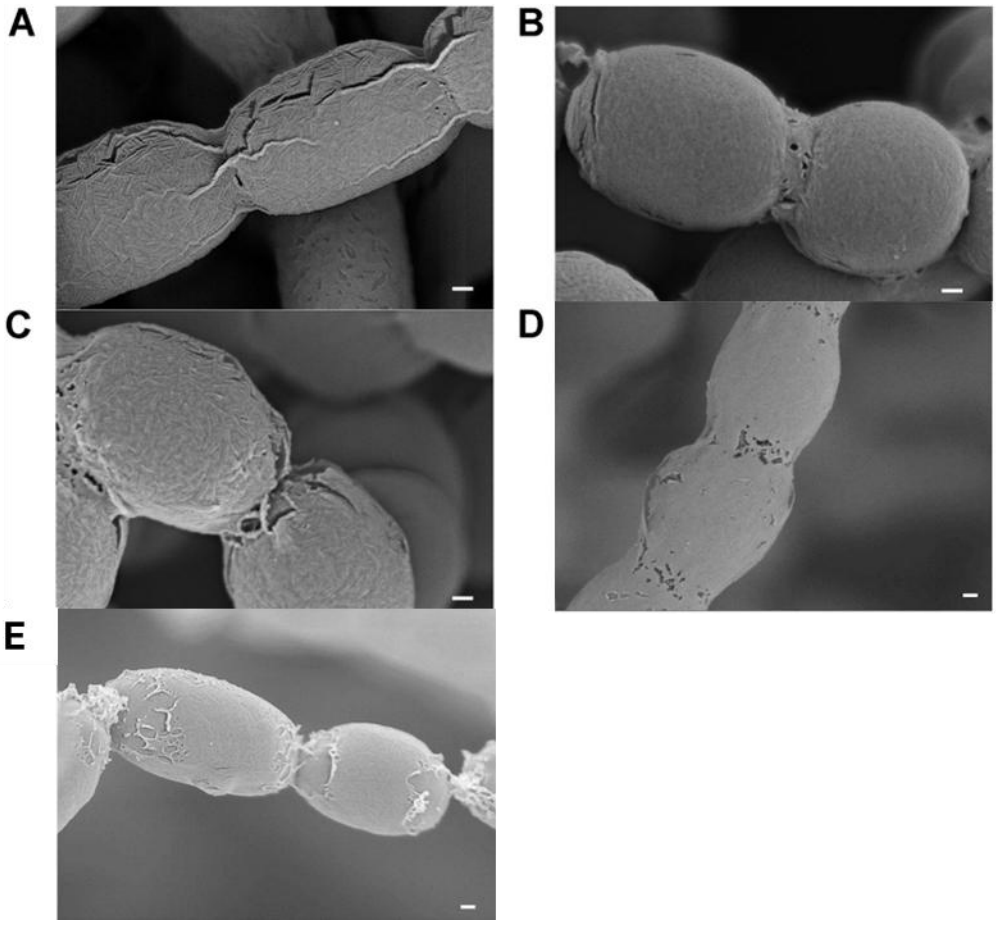


Figure 34 : Images de microscopie électronique à balayage de spores de S. coelicolor.
(A) Spore d'un souche sauvage (B) spore d'un mutant ΔrdlB (C) souche ΔrdlB dans laquelle rdlB est exprimé en trans (D) souche double mutants ΔrdlAB (E) souche ΔrdlAB dans laquelle rdlAB est exprimé en trans (Adapté de (Yang et al., 2017)).

Les deux familles de protéines, *chaplins* et *rodlins* sont essentielles à la formation et au développement des hyphes aériens. La formation des couches de bâtonnets résulte de l'interaction entre ces deux types de protéines (Figure 35). En absence de *rodlins*, les *chaplins* s'assemblent en fibrilles non organisées sur la surface externe des hyphes aériens et des spores. Et en présence de *rodlins*, ces fibrilles s'organisent en structures de rodlets et donnent cet aspect aux hyphes et spores (Petrus and Claessen, 2014).

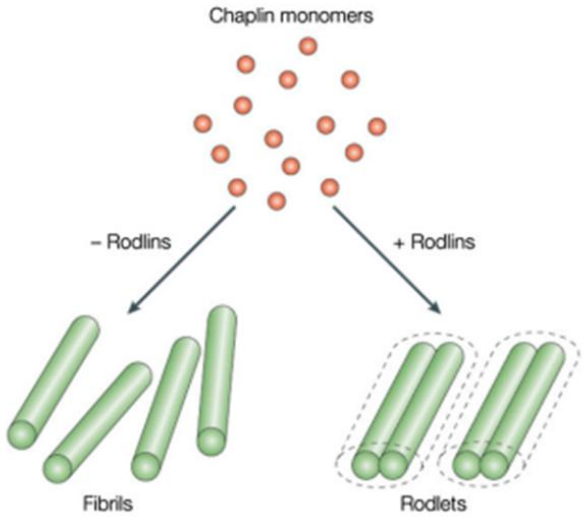


Figure 35 : La formation des bâtonnets chez S. coelicolor.
La formation des rodlets résulte de l'interaction entre les rodlins et les chaplins. Sans les rodlins, les chaplins s'assemblent en fibrilles qui se déposent de manière aléatoire à la surface externe des hyphes aériens et des spores (Petrus and Claessen, 2014).

La couche de bâtonnets formée par l'interaction entre les *rodlins* et les *chaplins* est de nature amphipatique : le coté hydrophile fait face à la paroi cellulaire, tandis que le côté hydrophobe est exposé à l'air.

Pour résumer, le développement aérien des bactéries filamenteuses *Streptomyces* met en jeu plusieurs molécules afin de permettre le développement aérien des hyphes. La première protéine impliquée est SapB, sécrétée pendant la phase végétative. Elle est essentielle à la production d'hyphes aériens dans certaines conditions et jouerait un rôle dans la diminution de l'activité tensioactive du milieu de culture en recouvrant à la fois les hyphes aériens naissants et les interfaces air-eau permettant aux hyphes d'émerger dans l'atmosphère. Pendant ce temps, les protéines *chaplins* et *rodlins* sont produites, sécrètes et polymérisées pour former la gaine hydrophobe autour des hyphes aériens. Cette gaine, composée d'une mosaïque de fibrilles parallèles, permet de faciliter davantage la sortie des hyphes en les rendant hydrophobes et rigides (Figure 36 et Figure 37).

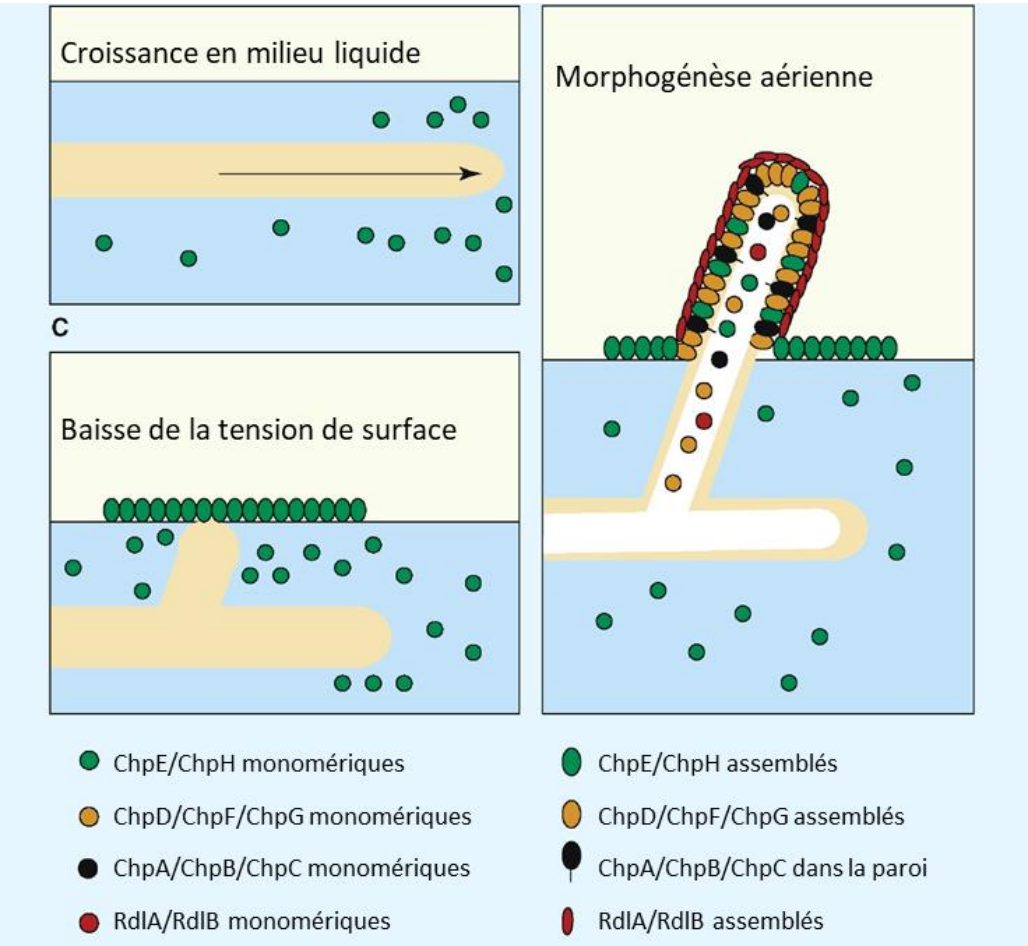


Figure 36 : Modèles d'action des protéines tensioactives dans le développement aérien des champignons et bactéries filamenteux.

Chez la bactérie filamenteuse S. coelicolor, les filaments immergés sécrètent ChpE et ChpH qui réduisent la tension superficielle comme illustré dans (C) Ceci peut être facilité dans certaines conditions par la protéine tensioactive SapB (non représentée). (D) Les filaments aériens produisent du ChpA – H qui se lie à la paroi cellulaire de manière covalente (ChpA – C), ou par association avec la surface cellulaire et d'autres chaplins. Les chaplins forment des fibrilles de type amyloïde. Les rodlins, RdlA et RdlB, sont également sécrétés et forment une couche de bâtonnets qui peut recouvrir les fibrilles de chaplin (Talbot, 2003).

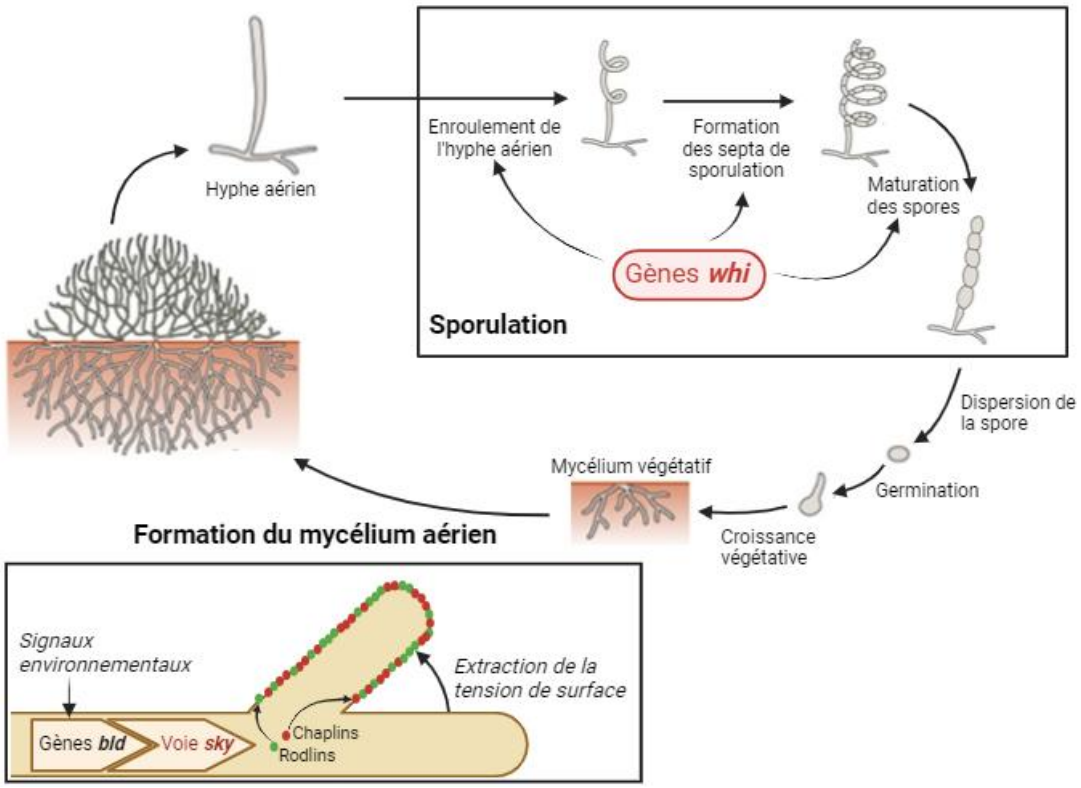


Figure 37 : Cycle de développement des Actinomycetes.

La sporulation en tant que tel est dépendante des gènes whi qui modulent la formation de l'hyphe et la maturation des spores (encadré supérieur droit). Une fois mature, la spore peut se disperser puis germer dans des conditions favorables. A ce moment-là, le mycélium végétatif peut se développer sous l'impulsion des gènes bld puis de la voie sky qui permet la production des chaplins et des rodlins nécessaires pour l'extraction de la tension de surface (encadré inférieur droit) (Inspiré de (Barka et al., 2016)).

Il semblerait qu'aucune étude n'ait porté sur les mécanismes d'extraction des *Actinosynnema* et l'identification des biosurfactants chez ces bactéries. Néanmoins, il est évident que les *Actinosynnema* produisent des tensioactifs pour permettre la formation du mycélium aérien. Étant donné leur appartenance à la même classe et les caractéristiques communes entre *Actinosynnema* et *Streptomyces*, il est facile de s'imaginer qu'elles utilisent les mêmes systèmes pour le développement de leurs biofilms et de leurs structures aériennes.

3.3. Usines de production de métabolites secondaires

Les Actinobacteria présentent une hétérogénéité génomique mettant en avant leur biodiversité (Ventura et al. 2007; Ait Assou et al. 2023; Solecka et al. 2012; Tiwari et Gupta 2013). En effet, elles ont suscité un grand intérêt notamment grâce à la découverte de l'actinomycine (Waksman and Woodruff, 1940) produite par *Streptomyces antibioticus* et de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (Schatz et al., 1944), deux bactéries commensales. Par ailleurs, les Actinomycetes produisent environ deux tiers de tous les

antibiotiques connus, dont la majorité sont produits par les bactéries de l'ordre des Streptomycetales (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021; Clardy et al., 2006). Elles jouent donc un rôle essentiel dans la lutte contre les pathogènes multirésistants qui ne cessent d'émerger (Hopwood et al., 1995; Ilic et al., 2007).

Au sein des Streptomycetales, la souche *Streptomyces coelicolor* est utilisée comme système modèle pour étudier la production d'antibiotiques. Depuis des décennies elle ne cesse d'émerveiller les scientifiques grâce à sa capacité à produire un nombre conséquent de composés antibiotiques différents tels que l'actinorhodine (Act) (Rudd and Hopwood, 1979), l'undécylprodigiosine (Red) (Feitelson et al., 1985), l'antibiotique calcium-dépendant (CDA) (Hopwood and Wright, 1983), la méthylènemycine (Mmy) (Wright and Hopwood, 1976) ou encore la congocidine (Lioy et al., 2021). C'est en 2002, après le séquençage du génome de *S. coelicolor* (Bentley et al., 2002), qu'il est devenu évident que les *Streptomyces* étaient sous estimées et qu'elles sont en réalité des « usines » à métabolites secondaires. Dans le génome de *S. coelicolor*, une vingtaine de groupes de gènes biosynthétiques codant pour des voies de biosynthèses putatives de métabolites secondaires ont été identifiés (Challis and Hopwood, 2003). Depuis, de nombreuses études ont été effectuées sur d'autres *Streptomyces* afin de mettre en avant leurs capacités de productions. Certaines d'entre elles hébergent plus de 50 groupes de gènes codant pour des métabolites différents (Ikeda et al., 2003; Ohnishi et al., 2008; Oliynyk et al., 2007; Udwary et al., 2007). Toutes ces données reflètent le potentiel de ces organismes dans la production de nouveaux médicaments donnant lieu à des recherches plus approfondies (Jones and Elliot, 2017; Bergeijk et al., 2020; Barbuto Ferraiuolo et al., 2021; Lioy et al., 2021; Donald et al., 2022). Ce phylum a donc une grande importance dans le domaine de la biotechnologie, en produisant de nombreux métabolites secondaires bioactifs aux diverses applications dans l'industrie, la médecine et l'agriculture. Les composés bioactifs produits par les Actinomycetes sont principalement retrouvés chez les bactéries de la famille des Streptomycetaceae comme on vient de le voir mais aussi chez les Pseudonocardiaceae, les Nocardiaceae, les Micromonosporacea, les Streptosporangiaceae et les Thermomonosporacea.

La Figure 38 illustre la diversité des molécules pouvant être produites chez les Actinomycetes ainsi que leurs divers modes d'action. Il est indéniable que les antibiotiques ont une place centrale dans les molécules produites par les Actinomycetes mais ces bactéries peuvent produire des molécules avec des actions anticancéreuses comme les anthracyclines, la bléomycine, les mitosanes et les enediynes. (Demain and Sanchez, 2009). Elles peuvent aussi

jouer un rôle immunosuppresseurs comme la rapamycine et le tacrolimus. Enfin, les Actinomycetes produisent des molécules antiparasitaires et insecticides comme les avermectines, les milbémycines ou les spinosynes ou encore des molécules herbicides comme le bialaphos et le glufosinnate (Barka et al., 2016; de Lima Júnior et al., 2023; Demain and Sanchez, 2009; Jagannathan et al., 2021; Jose et al., 2021; Selim et al., 2021).

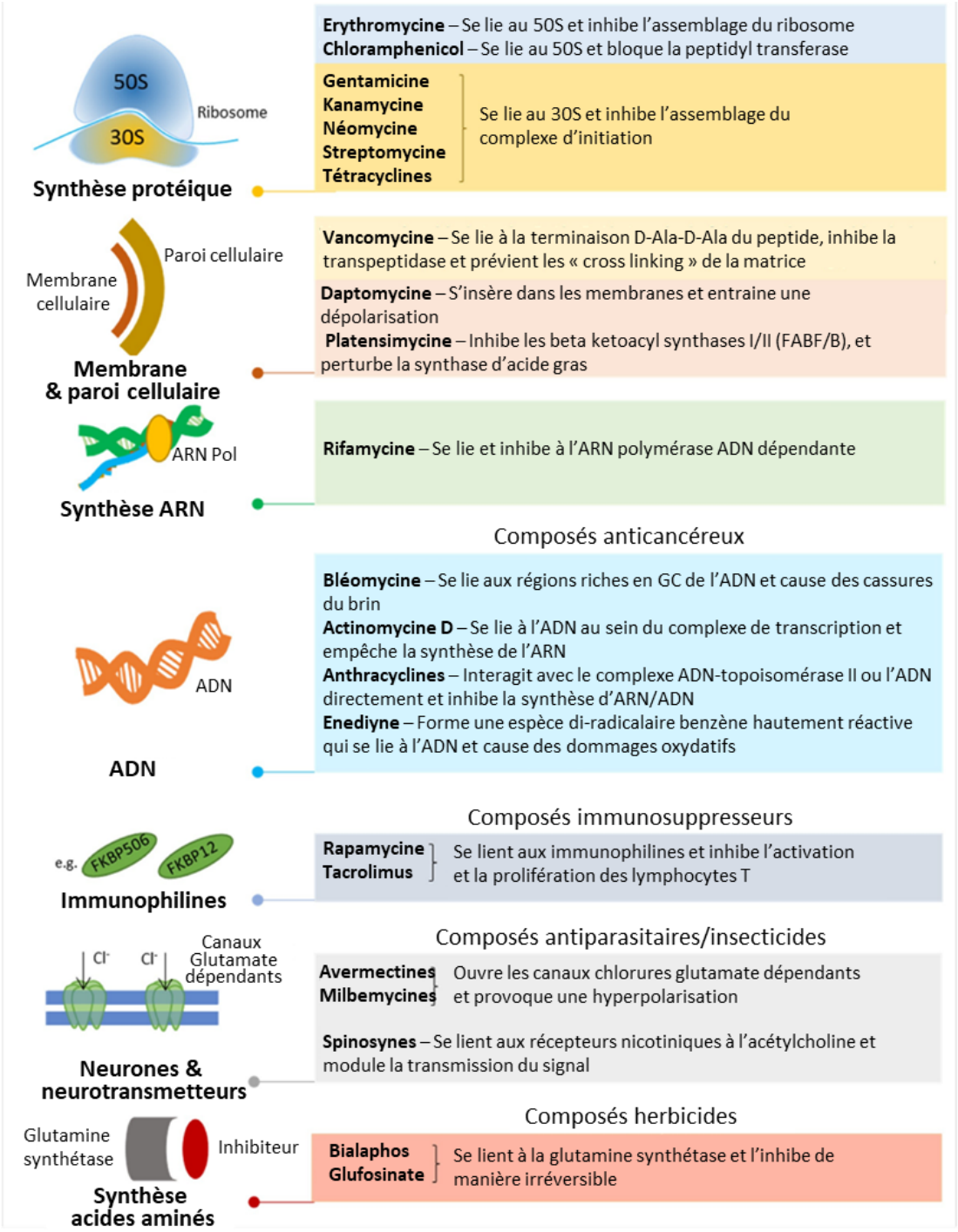


Figure 38 : Liste des composés notables dérivés des Actinobacteria et leur principal mode d'action.
(Jose et al., 2021)

Il existe donc énormément de voies de synthèse de métabolites secondaires révélées par l'analyse des génomes de ces bactéries. En revanche, il y a assez peu de métabolites qui sont réellement détectés, purifiés et caractérisés. Une hypothèse proposée par bon nombre de scientifique serait que ces métabolites ne seraient pas synthétisés dans les conditions de culture utilisées en laboratoire. Plusieurs pistes de recherche consistent donc à essayer d'activer ces voies de biosynthèses cryptiques, par exemple en utilisant des molécules activatrices ou bien en étudiant des co-cultures (Kaeberlein, Lewis, et Epstein 2002; Onaka 2017). D'autres pistes consistent à étudier les conséquences de l'expression hétérologue de ces voies de biosynthèse (Wright and Hopwood, 1976) ou encore en étudiant le phénotype des mutants visant à perturber la régulation, la transcription ou la traduction de ces gènes (Ochi and Hosaka, 2013).

3.3.1. En interaction avec les Actinomycetes

Du fait de leur adaptation à de nombreux écosystèmes, les bactéries appartenant à la classe des Actinomycetes entrent en interaction avec différentes espèces comme les invertébrés, les vertébrés ou les plantes. Ces interactions peuvent prendre plusieurs formes et comprennent le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme (Leung and Poulin, 2008).

Les symbioses entre insectes et bactéries sont largement répandues dans l'environnement d'autant plus lorsque ces dernières apportent un avantage pour la protection de l'hôte et de ses ressources. Des interactions de ce genre ont ainsi été observées avec des fourmis, des coléoptères ou encore des protozoaires. Par exemple, les fourmis Attine utilisent les métabolites secondaires des bactéries comme désherbants pour éliminer tout organisme autres que les champignons dont elles se nourrissent (Schultz and Brady, 2008).

Les Actinomycetes sont en interaction avec les vertébrés. En effet, elles sont retrouvées dans le microbiote intestinal humain et animal (Binda et al., 2018). Plus précisément, elles sont fortement retrouvées dans le microbiote buccal où elles participent au maintien d'une flore bactérienne saine et équilibrée. A une échelle moins importante, ces bactéries sont aussi retrouvées dans les voies gastro-intestinales et génitales inférieures et sont associées à une flore intestinale saine (Deo et Deshmukh 2019; Rinninella et al. 2019). A l'inverse, elles peuvent aussi interagir de façons néfastes avec les vertébrés et provoquer des maladies graves comme c'est le cas pour certaines Actinomycetes qui sont des agents pathogènes potentiels inhabituels (McNeil and Brown, 1994). C'est le cas des bactéries du genre *Norcadia* qui peuvent provoquer des pneumonies, des infections cutanées ou du système nerveux central ou encore quelques

Streptomycetales. De manière générale, les Actinomycetes pathogènes provoquent des pneumonies ou des abcès et infectent des patients souvent atteints de maladies immunosuppressives (Dunne et al., 1998). Dans la liste des bactéries pathogènes du phylum des Actinobacteria, on retrouve également des bactéries du genre *Mycobacterium.* Parmi elles, on distingue les espèces pathogènes tuberculeuses et les espèces pathogènes non tuberculeuses. Plusieurs bactéries peuvent provoquer la tuberculose, une maladie dont le taux de mortalité est très haut (Kanabalan et al., 2021). En 2022, elle était la deuxième cause mondiale de décès dû à un seul agent infectieux après la maladie à coronavirus (COVID-19) et elle a causé près de deux fois plus de décès que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Global Tuberculosis Report 2023). Les bactéries non tuberculeuses sont nombreuses et engendrent différents symptômes comme des maladies pulmonaires, des lymphadénites cervico-faciales, des atteintes de la peau, des tissus mous, des os ou des articulations ou encore des maladies disséminées (Sharma and Upadhyay, 2020).

Enfin, les Actinomycetes interagissent avec les plantes. En effet, elles sont beaucoup retrouvées dans les sols, il est donc évident qu'elles jouent des rôles dans les communautés microbiennes associées aux plantes. Bien que les Actinomycetes jouent un rôle mineur dans les maladies des plantes, elles représentent des pathogènes majeurs de certaines cultures, dans des zones et conditions particulières affectant la qualité et la quantité des produits agricoles. Elles attaquent notamment les pommes de terre et d'autres plantes-racines (Bignell et al., 2010; Li et al., 2019), d'autres infectent des plants de tomates, de maïs, de blé (Nandi et al., 2018), des érables et des sapins (Sutherland et al., 1979).

Malgré l'existence d'Actinomycetes phytopathogènes, qui sont un réel problème au niveau mondial pour l'agriculture, il existe des Actinomycetes bénéfiques pour les plantes. En effet, elles peuvent affecter la croissance des plantes de façon directe ou indirecte. Indirecte, c'est lorsque les bactéries vont prévenir les effets nocifs d'un ou plusieurs micro-organismes néfastes pour la plante. Par exemple, la colonisation d'agents pathogènes peut être empêchée grâce à la production de métabolites secondaires par les Actinomycetes (Bhatti et al., 2017). Directe, c'est lorsque qu'un composé est synthétisé par la bactérie et facilite l'absorption par la plante de nutriments du sol, comme la fixation de l'azote, la synthèse des sidérophores, de phytohormones et la solubilisation des minéraux pour les rendre plus disponibles pour les plantes (Figure 39) (Jiao et al., 2021; Saeed et al., 2021).

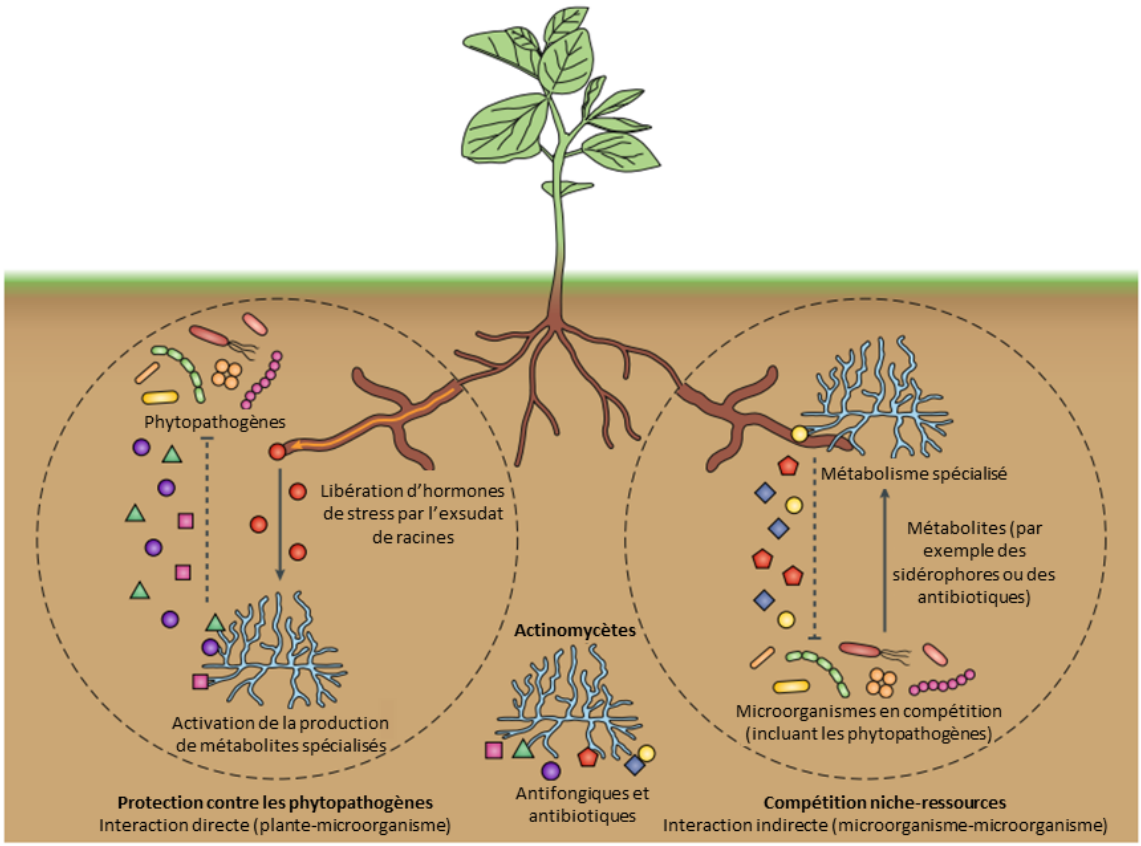


Figure 39 : Rôle des Actinomycetes dans le métabolisme des plantes.
De manière directe, les Actinomycetes libèrent plusieurs métabolites actifs capables de moduler voire inhiber l'activité de phytopathogènes au niveau des sols. De manière indirecte, les Actinomycetes agissent en compétition avec d'autres microorganismes présents dans les sols et sont ainsi capables de moduler l'activité des phytopathogènes présents dans la niche (Adapté de (Bergeijk et al., 2020)).

3.4. Les *Actinosynnema*

3.4.1. Histoire

Les bactéries du genre *Actinosynnema* font parties du phylum des Actinobacteria, de l'ordre de Pseudonocardiales et de la classe Actinomycetia (Actinomycetes) (Ludwig et al., 2012). A ce jour deux souches du genre *Actinosynnema* ont été isolées : *Actinosynnema mirum* et *Actinosynnema pretiosum* dont plusieurs sous espèces pour *A. pretiosum* (Figure 40).

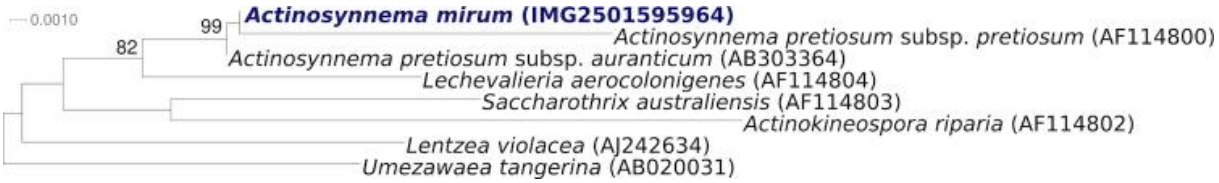


Figure 40 : Arbre phylogénétique des bactéries du genre Actinosynnema.
(Land et al., 2009)

A. mirum a été isolée la première fois en 1976 à partir d'un brin d'herbe de Carex collectée dans la rivière Raritan, dans le New Jersey (Hasegawa et al., 1978). *A. pretiosum* et ses sous espèces ont été isolées en 1975 à partir de feuilles de Carex à la Préfecture de Shiga au Japon (Hasegawa et al., 1983). *Actinosynnem*a, du latin *actis, actinos* qui signifie « rayon » ; *syn* qui signifie « ensemble » et *nema, nematos* qui signifie « fil ». Aussi, en latin, *mirum* signifie « merveilleux » et *pretiosum* signifie « précieux », ce qui est plutôt sympathique. Ce sont également des bactéries à Gram positif comme toutes les bactéries de ce phylum avec un GC% relativement élevé.

Il y a peu de données sur la morphologie de ces bactéries et hormis les deux articles d'Hasegawa, personne n'a continué à s'intéresser au développement aérien de ces souches. Néanmoins, ces articles décrivent ces deux espèces et permettent d'avoir un aperçu de leur morphologie. Elles sont décrites comme des organismes aérobies non-acido-résistants formant des hyphes ramifiés. Ces hyphes d'environ 0.5 µm de diamètre forment un mycélium différencié en deux. Un mycélium végétatif qui se développe et pénètre dans la gélose, et un mycélium aérien qui provient de ce premier mycélium qui forme des structures aériennes aussi appelées synnemata (ou corémies) (Figure 41A), des corps en forme de dôme ou des colonies plates. Au sommet de ces hyphes aériens (Figure 41B) se forment des chaines de spores pouvant être dotées de flagelles en milieu aqueux (Figure 41C).

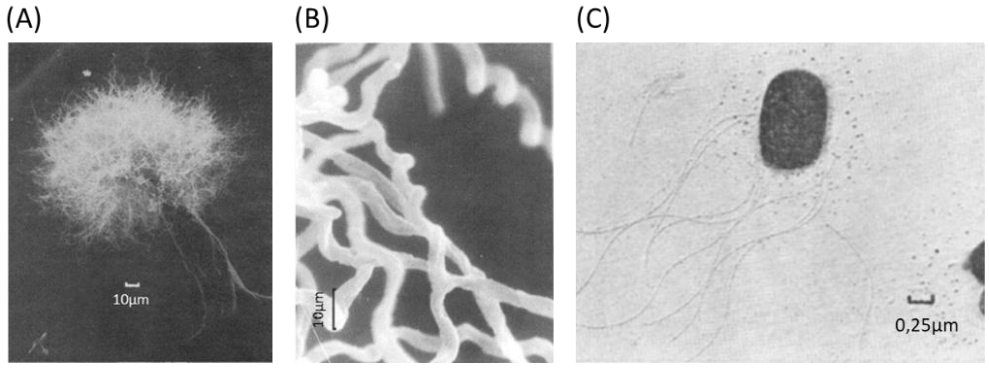


Figure 41 : Images en microscopie électronique à balayage des synnemata et leurs spores.
(A) Un synnemata d'A. mirum (B) Un hyphe aérien du sommet d'un synnemata d'A. mirum. (C) Un spore d'A. mirum (Hasegawa et al., 1978).

D'un point de vue génétique, les deux souches de référence sont relativement proches. Le génome d'*A. pretiosum* fait 8 131 572 paires de bases (pb) avec un GC% de 73,91. 7 016 gènes sont prédits et parmi eux 6 693 possèdent des séquences codantes, 15 gènes d'ARNr, 58 gènes d'ARNt et 3 d'ARNnc ont été identifiés et 247 pseudogènes. Pour *A. mirum,* son génome fait

8 248 144 pb avec un GC% de 73,72%. 7 160 gènes ont été prédits et 6 868 possèdent des séquences codantes, 14 gènes d'ARNr, 59 gènes d'ARNt et 3 gènes d'ARNnc ont été identifiés ainsi que 216 pseudogènes (Figure 42) (Zhong et al., 2019). Les propriétés générales de ces deux souches sont très similaires et la classification COG des gènes conservés indique une certaine similitude. Néanmoins, il existe des gènes spécifiques à chaque souche (Figure 42). Les nombreuses variations génomiques illustrent une hétérogénéité génétique entre les deux souches, suggérant des différences dans leurs schémas métaboliques.

Feature	*A. pretiosum* X47	*A. mirum* 101^T
Genome size	8,131,572 bp	8,248,144 bp
DNA G+C	73.91%	73.72%
Chromosome	1	1
Total genes	7,016	7,160
Protein coding genes	6,693	6,868
rRNA genes	15	14
tRNA genes	58	59
ncRNA genes	3	3
Pseudogenes	247	216
Genbank Accession number	CP023445	CP001630

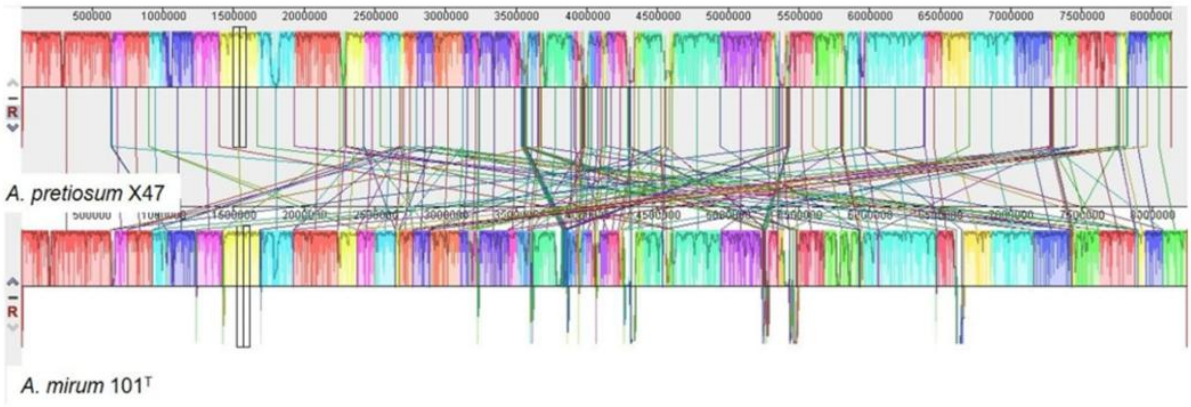


Figure 42 : Caractéristiques génomiques de A. pretiosum X47 et A. mirum 101^T.
(Zhong et al., 2019)

3.4.2. Intérêts industriels

Dans les années 1980, un groupe de scientifique japonais a mis en évidence la production d'antibiotiques monocycliques β-lactam, des nocardicines, chez *A.mirum* (Watanabe et al., 1983). Ces antibiotiques sont également produits par des bactéries du genre *Nocardia.*

C'est à partir des années 2000 que l'intérêt industriel des bactéries du genre *Actinosynemma* a pris un nouvel essor avec la découverte de l'ansamitocine P-3 (AP-3), un

puissant agent antitumoral (Goh et al., 2007). Produite par *A. pretiosum*, elle a dans un premier temps été isolée à partir de bouillon de fermentation de *Nocardia sp* (Higashide et al., 1977). Appartenant au groupe des maytansinoïdes, cette molécule est capable de bloquer l'assemblage des microtubules au sein des cellules cancéreuses (Kashyap et al., 2019; Martin et al., 2014). Depuis, des équipes tentent d'améliorer l'expression et la production d'AP-3 chez *A. pretiosum* afin d'obtenir des rendements de production intéressants pour répondre aux demandes industrielles (Chung et Byng 2004; Bandi et al. 2006). Par exemple, en activant la production d'UDP-glucose, par l'intermédiaire de la voie Embden-Meyerhof-Parnas (glycolyse), et en diminuant l'activité de voie de synthèse alternatives telles que la voie des pentose-phosphate, il est possible d'augmenter de manière significative la production de l'ansamitocine (Fan et al., 2016a, 2016b; Liu et al., 2020). Une autre étude a démontré que la production d'AP-3 pouvait être améliorée en augmentant l'activité d'un gène codant une méthyltransférase, *asm10*, et en supplémentant le milieu en divers acides aminés tels que la L-valine ou la L-méthionine (Ning et al., 2017). Une trentaine de groupe de gènes biosynthétiques de métabolites secondaires putatifs sont identifiés chez *A. pretiosum X47* et parmi eux, un groupe de 52 gènes serait responsable de la biosynthèse de l'AP-3 (Figure 43) (Zhong et al., 2019).

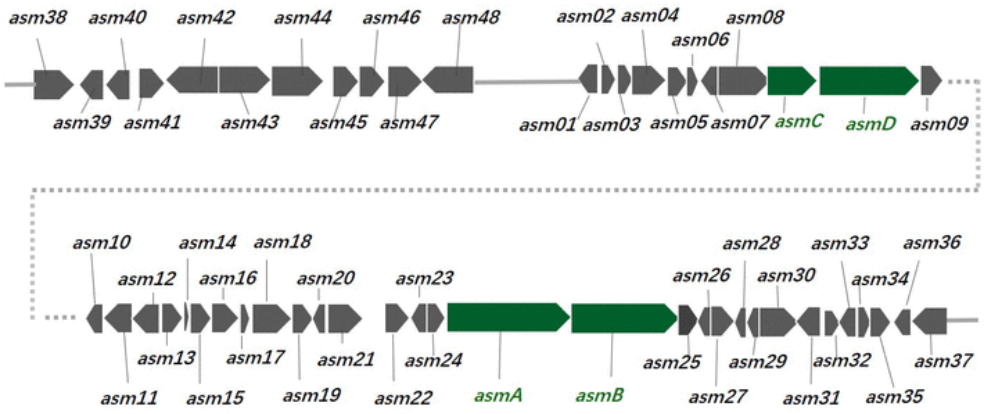


Figure 43 : Groupe de gènes biosynthétiques de l'ansamitocine chez A. pretiosum X47.
Les 52 gènes qui sont prédits pour produire l'AP-3 (Zhong et al., 2019).

De nombreuses études tentent de comprendre les mécanismes de production de cet antitumoral, d'identifier les sous espèces les plus pertinentes et les conditions les plus efficaces. Le mode de culture privilégié en milieu industriel est la culture en milieu liquide qui permet une meilleure isolation des protéines d'intérêt (Manteca et al., 2008). Pour autant ce type de culture doit être optimisé. Trop diluées, les cellules ne produiront suffisamment de métabolites qu'après une longue incubation. Trop concentrées (ce qui est le cas le plus fréquent), les

bactéries entrent dans une phase de fermentation ce qui diminue le rendement. Une étude récente a ainsi montré qu'en bloquant l'expression des gènes impliqués dans le processus de fragmentation du mycélium, consécutif à la phase de fermentation, il était possible de restaurer des niveaux satisfaisants d'AP-3 (Wu et al., 2020). *A. pretiosum* est en effet très dépendante de son état morphologique pour produire ses métabolites secondaires. AdpA, qui contrôle le phénomène de sporulation et la formation du mycélium aérien, est ainsi positivement corrélé à la production de l'AP-3 (Guo et al., 2022).

4. Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse était de répondre à différentes questions concernant le développement et le système de partage des métaux chez les synnemata d'*Actinosynnema*. Notamment, est-ce que les métaux sont retrouvés jusqu'aux sommets des synnemata et si oui, quelle est leur répartition au sein de ces structures aériennes ? Il est assez probable que les métaux soient présents tout au long des synnemata, ce qui soulève une deuxième question : quels sont les mécanismes mis en place par les bactéries pour acquérir ces métaux ? Ces structures aériennes semblables aux structures de *Streptomyces* soulèvent également la question du mécanisme mis en place pour faire face à la tension de surface exercée par le substrat lors de la formation des synnemata. Plusieurs techniques ont été nécessaires pour répondre au mieux à ces différentes questions.

Dans un premier temps, à l'aide de collaborations et de l'utilisation d'appareils plus résolutifs, nous avons voulu remettre à jour les images de microscopie des synnemata et des cellules qui les composent. Nous avons pu obtenir des images en microscopie électronique à balayage et à transmission. Ensuite, grâce à l'analyse d'images de fluorescence à rayon X, nous avons pu étudier et observer la distribution des métaux au sein des synnemata et des filaments qui les composent. Ces différentes techniques d'analyses et d'imagerie microscopiques nous ont permis de faire le point sur ces structures et mieux appréhender la répartition des métaux dans ces dernières.

Parallèlement, grâce à des outils bio-informatiques, des gènes codant pour des protéines putatives de l'import ou export de fer et de zinc ont été identifiés permettant ainsi des études *in vitro*. En effet, nous avons mis en place des approches plus ciblées, dans le but d'étudier l'expression d'une protéine fluorescente sous le contrôle de promoteurs répondant à la carence en fer et/ou en zinc, comme le promoteur de l'opéron *cnt*, ou les promoteurs de gènes putatifs codant pour des transports ABC du zinc, *znu*. Nous avons d'abord dû tester la faisabilité des étapes de transformations, de recombinaison homologue ainsi que la fonctionnalité de la protéine fluorescente chez *A. mirum* et *A. pretiosum*. Puis nous avons étudié le niveau d'expression des fusions transcriptionnelles dans différentes conditions de culture.
Des analyses protéomiques ont été initiées à partir de différentes conditions de culture dans le but d'identifier les protéines potentiellement impliquées dans l'acquisition des métaux chez les synnemata mais également dans des colonies. Plus largement nous voulions comparer le

protéome de chaque condition de culture (milieu riche et milieu pauvre en liquide ou solide) afin d'essayer de mieux comprendre ce qui permet aux synnemata d'établir les structures aériennes.

Enfin, à la vue des résultats obtenus avec les fusions transcriptionnelles et l'analyse protéomique, nous avons voulu valider nos observations en rajoutant des analyses de RT-qPCR afin d'étudier le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans l'import et l'export de fer et de zinc sur *A. pretiosum* cultivée dans différentes conditions.

Matériels et méthodes

1. Cultures bactériennes

Au cours de cette thèse, quatre souches bactériennes différentes ont été cultivées : *Escherichia coli pET12567 pUZ8002*, *Escherichia coli dam- (dam–/dcm– Competent E. coli*), *Actinosynnema mirum* (DSM 43827), *Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum* (DSM 44131). *E. coli pET12567 pUZ8002* a servi pour la conjugaison bactérienne afin de transférer les vecteurs chez *Actinosynnema*.

E. coli dam- a servi pour la construction du vecteur pIB139ermEpmNG possédant des sites de restriction accessibles uniquement quand ces derniers sont non méthylés. En effet, le clivage par enzyme de restriction est bloqué lorsque la séquence de reconnaissance est méthylée par la méthylase apparentée. La plupart des souches de laboratoire d' *E. coli* contiennent trois méthylases d'ADN spécifiques de site. La méthylase codée par le gène *dam* (méthylase Dam) transfère un groupe méthyle de la S-adénosylméthionine (SAM) à la position N6 des résidus d'adénine dans la séquence GATC.

Les souches *Actinosynnema mirum* (DSM 43827) et *Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum* (DSM 44131) sont donc nos bactéries modèles qui vont produire des synnemata. Les souches bactériennes nécessitent des conditions de culture qui leur sont spécifiques, tant au niveau de la composition du milieu que des conditions physico-chimiques.

1.1. Conditions de culture

Les différentes souches d'*E. coli* (pET12567 pUZ8002 et dam-) ont été cultivées à 37°C sous agitation a 130 rotations par minute (rpm) dans du milieu Lysogeny Broth (LB) supplémenté quand nécessaire avec de la kanamycine à 50 µg.mL^{-1}.

Les différentes souches d'*Actinosynnema* sont des bactéries anaérobies qui peuvent être cultivées dans différents milieux de culture simples, solides ou liquides, riches ou pauvres (Tableau 1). En liquide comme en solide, il y a deux milieux riches, LB et YMG (yeast extract, malt extract and glucose) et deux milieux pauvres, TSB$^{1/50ème}$ (Tryptic Soy Broth) et TSB$^{1/100ème}$. En culture solide, les milieux sont additionnés d'agar (15 g.L^{-1}). Un dernier « milieu » constitué d'eau et d'agar (15 g.L^{-1}) a pu être utilisé. En liquide, les cultures peuvent être sous agitation (110 rpm) ou statiques à 30°C. En solide, les cultures sont placées à l'étuve à 30°C. Il faut

compter environ 3 jours de culture pour obtenir des bactéries pour les milieux riches et 4 à 5 jours pour les milieux pauvres.

	Culture en milieu solide		Culture en milieu liquide	
	Riche	*Pauvre*	*Riche*	*Pauvre*
Type de milieu	LB ou YMG	$TSB^{1/50}$, $TSB^{1/100}$ ou Eau/agar	LB ou YMG	$TSB^{1/50}$ou $TSB^{1/100}$
	Agar (15 g/L)		Sans agar	
Température	30°C		30°C	
Agitation	Avec ou sans		Sans	
Temps de culture	3 jours	4-5 jours	3 jours	4-5 jours

Tableau 1 : Synthèse des différentes conditions de culture mises en place

1.2. Vecteurs

Les différents plasmides utilisés et construits sont répertoriés dans le Tableau 2. Plusieurs plasmides ont été utilisés : le pIB139, le pTMW018, le pTMN002 et le TopoTA.

Le vecteur pIB139 est utilisé pour la transformation des *Actinosynnema*, il permet l'insertion des gènes au sein de la bactérie en s'intégrant à des sites spécifique, appelés site φC31. Il contient un promoteur constitutif, le promoteur du gène codant la résistance à l'érythromycine (ermp)(Annexe 5), entouré de sites de restriction permettant son remplacement (NdeI et BamHI) et un gène codant la résistance à l'apramycine (Apm) qui permet de sélectionner les transformants.

Les vecteurs pTMW018, pTMN002 sont des vecteurs utilisés pour l'intégration chromosomique dans des régions choisies au sein des *Actinosynnema.* Ils nous ont été donnés par Taifo Mahmud.

Le vecteur TopoTA a servi de vecteur navette afin de modifier le promoteur d'origine par les promoteurs d'intérêt au sein du vecteur pIB139.

Plasmides	Taille (pb)	Résistance	Caractéristiques principales	Origines
pIB139	5924	ApmR	Vecteur permettant l'expression de gènes chez *Actinosynnema* sous le contrôle du promoteur constitutif de l'érythromycine	Fan et al., 2016b
pIB139 *ermEpmNG*	6622	ApmR	Dérive du pIB139 avec une neongreen (GFP) sous le contrôle du promoteur constitutif	Cette étude
pIB139 *cntpmNG*	7288	ApmR	Dérive du pIB139 avec une neongreen (GFP) sous le contrôle du promoteur de l'opéron cnt	Cette étude (Genewiz)
pIB139 znu1pmNG	6828	ApmR	Dérive du pIB139 avec une neongreen (GFP) sous le contrôle du promoteur de l'opéron *znuABC1*	Cette étude (Genewiz)
pIB139 *znu3pmNG*	6942	ApmR	Dérive du pIB139 avec une neongreen (GFP) sous le contrôle du promoteur de l'opéron *znuABC3*	Cette étude (Genewiz)
pTMW018	12363	ApmR, KnR	Vecteur permettant l'intégration chromosomique chez *Actinosynnema*	Ito et al., 2009
pMDV01	14094	ApmR, KnR	Dérivé du pTMW018 contenant la mNeonGreen sous le contrôle du promoteur de l'érythromycine et des régions homologues au chromosome d'*Actinosynnema* pour une intégration chromosomique	Cette étude (Genewiz)
pTMN002	12370	ApmR, KnR	Vecteur permettant l'intégration chromosomique chez *Actinosynnema*	Asamizu et al., 2013

Tableau 2 : Les différents vecteurs et dérivés utilisés.

1.3. Microscopie

Pour les images de microscopie, nous avons travaillé avec la plateforme de microscopie de notre institut « Zoom » et en collaboration avec la plateforme de microscopie électronique de l'Institut de microbiologie de la méditerranée (IMM) à Marseille.

1.4. Microscope Axio Zoom et confocal

Le microscope stéréo Axio Zoom a été utilisé afin de repérer et observer la croissance des bactéries. En effet, ce dernier permet une observation complète de nos cultures. Les géloses en culture à différents jours étaient observées à différents grossissements pour observer l'aspect des colonies mais aussi le développement des synnemata sur milieu pauvre. Des cultures liquides ont aussi été observées à l'aide de ce microscope.

Le microscope confocal Zeiss LSM780 a été utilisé pour la détection de la mNeonGreen dans les cellules d'*Actinosynnema*. Les longueurs d'ondes utilisées étaient 504 nm pour l'excitation et 517 nm pour l'émission. Le logiciel ZEN Blue a servi pour la mise en forme des résultats. Les bactéries transformées mises en culture ont été observées au microscope confocal. Pour les cultures liquides (riches ou pauvres), un volume de 10 à 20 µL a été prélevé et déposé

entre lame et lamelle. Pour les cultures en milieu solide riche, un morceau de colonie a été prélevé et dissout dans de l'eau. Un volume a été prélevé et déposé entre lame et lamelle. Et pour les cultures solides pauvres, un synnemata a été prélevé et déposé entre lame et lamelle avec 10 à 20 µL d'eau. Tous les échantillons ont été observés avec un grossissement x60.

1.5. Microscopie électronique à balayage

Pour la microscopie électronique à balayage (MEB), le Tescan VEGA3 SBU, Low-Vacuum a été utilisé avec une tension appliquée de 5 kV. Des cultures de 4 à 5 jours en milieu solide pauvre ont été réalisées et des morceaux de gélose présentant des synnemata ont été découpés puis dessiqués pendant 24h pour ensuite être montés et collés sur des membranes de silicium ou des plots en aluminium puis recouverts d'une couche de carbone à l'aide du revêtement au carbone Cressington 208.

1.6. Microscopie électronique à transmission

Pour la microscopie électronique à transmission (MET), des synnemata ont été plongés dans une solution fixatrice tamponnée (2 % de glutaraldéhyde dans un tampon Hepes 200 mM, pH 7,2). Les bactéries ont ensuite été lavées dans le tampon Hepes et post-fixées dans de l'osmium tetroxyde à 1 % (EMS 19150) pendant 1 heure à 4 °C. Les échantillons ont de nouveau été lavés à l'eau distillée et traités avec de l'acétate d'uranyle à 1 % (EMS 22400) pendant la nuit à 4 °C dans l'obscurité. Les échantillons fixés ont été déshydratés dans une série graduée d'acétone et inclus dans de la résine Epon (EMS). Des coupes ultrafines (60–90 nm) ont été réalisées, colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, puis analysées à l'aide d'un microscope électronique Tecnai 200KV (FEI).

2. Analyse des métaux par fluorescence à rayon X (XRF)

La technique d'imagerie XRF est une technique d'analyse élémentaire qui permet d'examiner de très petites surfaces d'échantillon. Elle utilise l'excitation directe des rayons X pour induire une émission caractéristique de fluorescence X à partir de l'échantillon pour l'analyse de différents éléments. Chaque élément a une répartition électronique unique qui crée une signature d'émission unique. Nous avons travaillé avec Daniel Chevrier, chercheur dans l'équipe, qui a pu analyser une première fois des synnemata sur la ligne de faisceau de nanosondes à rayons X sur ID16B en 2021 (ESRF, Grenoble) (https://www.esrf.fr/UsersAndScience/Experiments/XNP/ID16B). Pour pouvoir analyser les

échantillons et obtenir ces résultats, il a fallu dessiquer les synnemata.

Les mesures de microscopie à fluorescence à rayons X à balayage (SXFM) ont été effectuées à température ambiante en utilisant une énergie photonique incidente de 16,5 keV avec 10 détecteurs Si-drift pour mesurer la fluorescence des rayons X (XRF). Le faisceau de rayons X focalisé a été mesuré pour avoir un diamètre de ~ 55 nm (FWHM) avant la cartographie XRF. Un pas de balayage de 100 nm a été utilisé avec un temps d'arrêt de 50 ms pour collecter des cartes XRF à haute résolution. Les spectres XRF ont été calibrés, soustraits de l'arrière-plan et ajustés avec les lignes d'émission Kα des éléments périodiques de deuxième et troisième rangs (par exemple, P, S, Ca, Fe, Cu, Zn). Des cartes spécifiques aux éléments ont été générées en traçant le changement d'intensité XRF de chaque ligne d'émission Kα ajustée sur la région cartographiée (Figure 44).

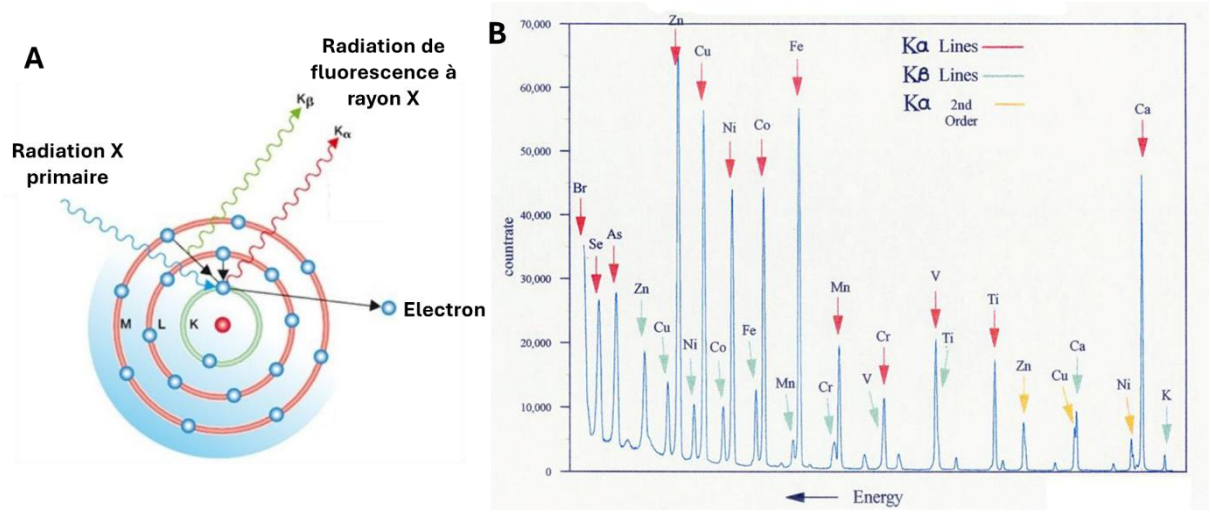


Figure 44 : Illustrations du mécanisme de fluorescence des éléments.

(A) Modèle atomique pour la méthode d'analyse par fluorescence à rayon X. Les électrons des premières couches sont excités et expulsés de l'atome, ce qui entraîne le remplissage de cette couche vacante par des électrons de niveau supérieur et est accompagné par l'émission d'un photon. Ce sont ces photons que nous détectons pour chaque élément. (B) Spectre typique de fluorescence X à dispersion d'énergie.

Pour la préparation des échantillons, les deux *Actinosynnema* ont été mises en culture sur milieux pauvres solides à 30°C pendant 4 à 5 jours.

Dans un premier temps, des morceaux de géloses sur lesquels se trouvaient des synnemata ont été découpés puis placés 24h dans une cloche en présence de cristaux de silice afin de dessiquer les synnemata. Une fois dessiqué, un morceau plus petit présentant un synnemata bien conservé a été découpé puis collé sur une raquette de cristallographie afin de

pouvoir le transporter mais aussi pouvoir jouer sur l'orientation grâce à la partie métallique de la raquette. Des bandes de gélose séchées ont aussi été découpées et collées de manière à former un pont sur des supports en aluminium afin de faciliter l'accès aux synnemata isolés (Figure 45).

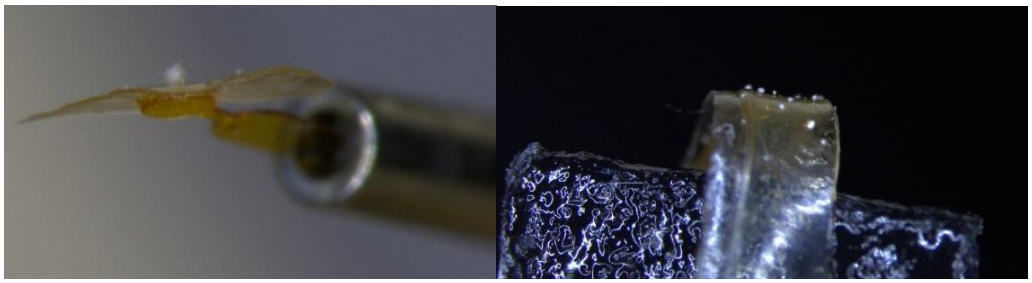


Figure 45 : Photographies illustrant les différents montages utilisés pour l'imagerie XRF.
(A gauche) Carré de gélose déshydratée collée sur petite boucle de mylar. (A droite) Bandelette de gélose déshydratée fixée en arc de cercle sur un support en aluminium.

Afin d'affiner notre analyse nous avons ensuite utilisé des membranes en nitrure de silicium (Si_3N_4), de 200 nm d'épaisseur, en guise de support pour les cellules. Pour se faire, nous avons amené sur place, au synchrotron, des cultures liquides et solides de deux souches. Des synnemata ont été prélevés à l'aide de cônes de pipette et déposés délicatement sur les membranes. Ces dernières ont été immédiatement plongées dans l'azote liquide puis lyophilisées pendant 8h pour ensuite être analysées en XRF.

L'analyse des cartographies s'est faite via PyMca sur les cartographies préalablement sélectionnées. Les données de chaque cartographie ont été traitées afin d'attribuer à chaque pic l'élément qui lui correspond et ainsi obtenir les images de chacun des éléments détectés. Ensuite, par le biais d'ImageJ, chacune des images obtenues a été traitée de manière à convertir les valeurs d'intensité de fluorescence en logarithme et une table de recherche d'image pseudocolore (LUT) a été sélectionnée pour permettre une meilleure visualisation des cartographies.

ImageJ a également permis d'obtenir des profils d'intensité qui permettent d'avoir une observation plus rapide de la répartition des métaux au sein d'une région sélectionnée. Il a également été possible de calculer des rapports métal/soufre qui permettent de comparer la répartition des métaux.

3. Bio-informatique

L'identification des gènes a été faite grâce à différents outils bio-informatiques, le site « Microscope » (https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php), le site JGI-Genome portal (https://genome.jgi.doe.gov/portal/) et le site Blast NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, États-Unis) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Le génome d'*A. mirum* est disponible sur Microscope permettant ainsi via des mots clés et de noms de gènes déjà connus de rechercher la présence de gènes putatifs impliqués dans l'import et l'export du fer et du zinc dans le génome de notre souche. Les gènes identifiés ont ensuite été recherchés dans le génome d'*A. pretiosum* grâce à des alignements de séquences sur NCBI. En plus des recherches via Microscope, JGI-Genome a été utilisé pour identifier d'autres gènes. Le génome disponible est celui d'*A. pretiosum X47*. La recherche s'est faite grâce à la fonction « explore » puis « chromosome map », donnant accès au génome annoté de la souche. Il est ensuite possible de sélectionner des « COG code » mettant en surbrillance les gènes de la catégorie COG sélectionnée. A partir de là, chaque gène en surbrillance a été analysé pour vérifier s'il était potentiellement impliqué dans le transport du fer ou du zinc.

4. Génétique

4.1. Techniques usuelles de biologie moléculaire

Les préparations d'ADN plasmidiques ont été réalisées à partir de 5 mL de culture sur la nuit d'*E.coli* recombinante à l'aide du kit « GeneJET Plasmid Miniprep » (Thermofisher). Quand nécessaire, les amplicons et plasmides ont été digérés avec des enzymes de restriction High Fidelity de chez BioLabs pendant 30 min à 5h à 37°C. Les produits de digestion ont été ensuite purifiés avec le kit « MinElute Reaction Cleanup » (Qiagen). Les concentrations des plasmides extraits, et des fragments d'ADN préparés, ont été estimées par spectrophotométrie en utilisant un Nanoview : cela a permis également de vérifier leur pureté. Les étapes d'amplification et certaines étapes de digestion ont été vérifiées après ajout de tampon de charge (Bio-labs) grâce à des électrophorèses en gel d'agarose à 1 % dans du TAE 0,75x contenant du bromure d'éthydium (BET) en utilisant le marqueur de taille « Gene Ruler 1kb Plus DNA ladder » (Thermofisher) et exposition aux rayons ultraviolets (UV). Avant l'étape de ligation des inserts à cloner dans les vecteurs, les extrémités 5' phosphate des vecteurs digérés ont été déphosphorylées pour éviter que les vecteurs puissent se refermer sur eux-mêmes en cas de

digestion incomplète ou réintégrer le fragment qui leur a été retiré grâce à une enzyme Calf-intestinal alkalyne phosphatase (CIP) (BioLabs). Les réactions de ligation ont été réalisées grâce au kit « T4 DNA Ligation » (BioLabs) en suivant les recommandations du fournisseur. Pour la transformation d'*E. coli*, 50 ou 100 µL d'une suspension de cellules compétentes ont été mis en contact avec 10 µL de mélange de ligation ou 100-200 ng d'ADN plasmidique puis transformées par choc thermique ou choc électrique. Les transformants ont été sélectionnés sur des boites de milieu LB gélosé sélectif. Des PCR sur colonies ont été effectuées pour vérifier les clonages dans les souches. Ces dernières ont été réalisées avec l'ADN polymérase « GoTap » (BioLabs) dans un volume final de 10 µL sur 1 µL d'une suspension bactérienne réalisée avec 1 colonie dans 20 µL d'eau. Les amorces utilisées (0,1 µM en concentration finale) s'apparient de part et d'autre du site de clonage ou sur les extrémités du fragment cloné. Le séquençage des régions promotrices et des inserts clonés dans les constructions plasmidiques réalisées a été fait chez Eurofins Sequencing. Pour réaliser les électrophorèses en gels dénaturants, les gels utilisés étaient des gels pré-coulés (NuPAGE^{TM} 10% Bis-Tris Gel). Les migrations ont été effectuées dans du tampon de migration (MES SDS 1X). L'échelle de poids moléculaire utilisée était le « PageRulerTM Plus Prestrained protein ladder » (ThermoFisher). Des Western-Blot ont été effectués pour estimer la quantité de synnemata nécessaire pour l'analyse protéomique.

4.2. Construction des plasmides

Des amorces ont été commandées afin de caractériser les vecteurs pTMW018 et pTMN002, vérifier le MCS et la présence du gène codant la résistance à l'apramycine (Annexe 6).

Le vecteur pMDV01 a été synthétisé par Genewiz. Nous leur avons demandés d'optimiser la séquence du gène de la mNeonGreen afin de pouvoir l'exprimer chez *Actinosynnema*. Pour réaliser une intégration chromosomique chez *Actinosynnema,* il est nécessaire d'avoir en amont et en aval du gène cible des régions homologues à l'ADN afin qu'il y ait recombinaison. Le gène codant mNeonGreen a donc été entouré de 300 pb (ayant une homologie avec une région stratégiquement choisie de l'ADN d'*Actinosynnema,* Amir_5192/Amir_5193 (reverse) et présent sur le contig 11 (position 56 645 à 57 997 et 58 519 à 59 751) du génome d'*A. pretiosum subsp. auranticum)* (Annexe 5) en amont et en aval et de la séquence d'un promoteur constitutif fonctionnel chez *Actinosynnema,* le promoteur ermEp (Figure 46). Cette séquence a été clonée dans le pTMW018. La séquence complète est bordée de sites BamHI aux deux extrémités, de part et d'autre du promoteur ermEp il y a un site XbaI

et un site NdeI, et la séquence codant mNeonGreen est entourée de sites NdeI et XbaI. Ces sites de restriction nous permettent de pouvoir récupérer la séquence codant mNeonGreen mais aussi de pouvoir modifier le promoteur en amont de cette dernière.

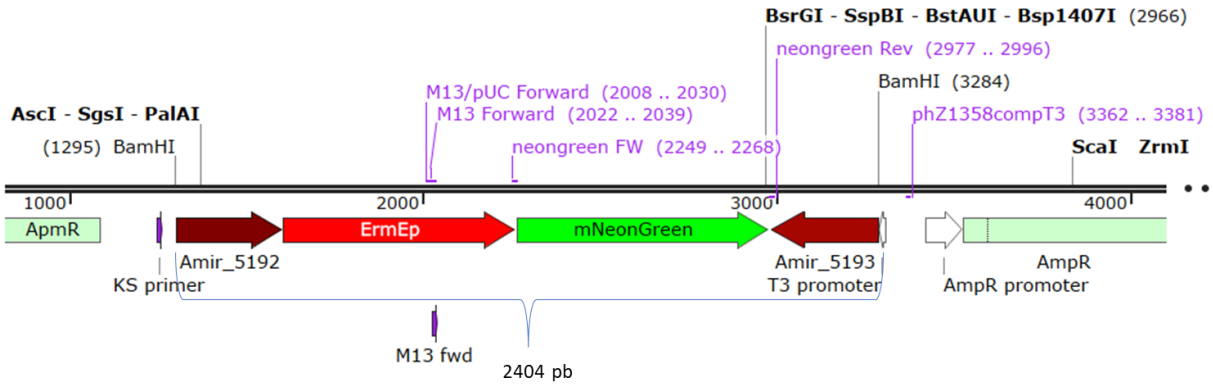


Figure 46 : Schéma illustrant la séquence ADN intrégrée dans l'ADN chromosomique d'A. mirum et A. pretiosum.

L'obtention de ce vecteur pMDV01 nous a permis d'obtenir le gène codant mNeonGreen optimisée qui a été récupéré par digestion NdeI et XbaI puis cloné dans le pIB139 lui-même digéré par les mêmes enzymes. Cela a conduit à la construction du pIB139ErmEpmNG. Par le biais des amorces M13 Foward et M13 reverse, nous avons vérifié l'intégration du gène codant la mNeonGreen dans le plasmide pIB139 puis nous avons envoyé à séquencer les vecteurs transformer pour vérifier la conformité de l'intégration grâce aux amorces M13univ-21 et M13rev-49 (Annexe 6).

Enfin, un autre vecteur a été synthétisé par Genewiz, le pIB139cntPmNG. Dans ce vecteur, dérivé du vecteur pIB139, le promoteur ermP a été remplacé par le promoteur de l'opéron *cnt* qui va ainsi contrôler l'expression du gène codant mNeonGreen.

4.3. Transformation par conjugaison et recombinaison homologue

La transformation des souches d'*Actinosynnema* est faite par conjugaison bactérienne. Elle fait intervenir deux parents, la souche d'*Actinosynnema* (receveur) et *E. coli pET12567/pUZ8002* (donneur) préalablement transformée avec le vecteur d'intérêt. Etant donné l'aspect des cultures d'*Actinosynnema*, il est difficile de déterminer la densité optique, mais nous nous sommes rendu compte que les transformations fonctionnaient sur des cultures de 15 à 20 jours à 30°C sur milieu YMG agar. Le receveur est aussi inoculé pour une durée de 20h à 30°C à 110 rpm dans 10 mL de milieu TSBY avec quelques billes de verre à partir de

colonies sur boite. Le donneur est inoculé au 1/100ème d'une pré-culture saturée et incubé 20h à 37°C sous agitation. Après les 20h, la culture d'*E. coli* et d'*Actinosynnema* sont centrifugées et lavées 2 fois avec du LB et repris dans un volume de LB. Les culots d*'Actinosynnema* ne sont pas stables, il faut le manipuler délicatement pour perdre le moins de cellules possible. Les deux souches sont ensuite mélangées avec différents ratio 1:1 (0,5 mL *E. coli* + 0,5 mL *Actinosynnema*) ou 1:0,5 (0,5 mL *E. coli* + 0,25 mL d'*Actinosynnema*). Le mix de chaque condition est déposé sur milieu YMG + MgCl2 10 mM et laissé sécher avant d'incuber à 37°C pendant 20h. Ensuite, 1 mL d'eau contenant Apm à 1 $mg.mL^{-1}$ et de l'acide nalidixique à 1,75 $mg.mL^{-1}$ est étalé et dispersé sur les boites. L'acide nalidixique permet d'éliminer les cellules donneuses. Une fois les boites sèches, elles sont remises à l'étuve 14h à 37°C et 3 à 4 jours à 30°C. Les colonies sont raclées et étalées sur LB ou YMG contenant Apm (50 $\mu g.mL^{-1}$) et l'acide nalidixique (25 $\mu g.mL^{-1}$) puis les boites sont incubées à 30°C. Au bout de 3 jours, les colonies isolées sont repiquées et mises à 30°C pendant 3 jours minimum. Les colonies présentes au bout de cette incubation sont des conjugants dont la culture en milieu liquide en LB ou YMG en présence d'Apm (50 $\mu g.mL^{-1}$) et d'acide nalidixique (25 $\mu g.mL^{-1}$) va permettre la mise en collection les souches. En raison de la présence de fluorescence nos bactéries, nous avons conclu à l'intégration des plasmides dans ces dernières.

4.4. Extraction ARN

L'expression des gènes d'*A. pretiosum* cultivés dans différentes conditions de culture a été mesurée par RT-qPCR. Pour cela, les bactéries ont été cultivées pendant 7 jours dans 20 mL de milieu contenant des billes dans des erlenmeyers de 200 mL ou sur milieu agar. Elles ont été cultivées en milieu riche et pauvre. Pour le traitement des cellules en milieu liquide, les cultures sont centrifugées et une petite quantité de culot cellulaire est prélevée et reprise dans 450 µL de solution d'homogénéisation contenant du thioglycérol à 20 ou 25 $\mu L.mL^{-1}$. Le tout est stocké dans la glace. Pour les cultures présentant des synnemata, environ 2 mL de solution d'homogénéisation sont répartis sur la boite de pétri et les synnemata sont mis en suspension à l'aide d'un râteau. La suspension est ensuite prélevée puis centrifugée pour retirer le maximum de liquide. Le culot est repris dans 450 µL de solution d'homogénéisation contenant du thioglycérol à 20 ou 25 $\mu L.mL^{-1}$ auxquels sont ajoutés 200 mg de billes.. Les cellules sont cassées par au broyage Fastprep-24™ de MP Biomedicals™ avec 3 runs de 45 secondes à 6,5g avec des pauses de 2 minutes (min) dans la glace. Les cellules sont concentrées par centrifugation rapide puis 450µL de tampon de lyse et 35 µL de protéinase K (Sigma) sont ajoutés et les échantillons sont agités 10 min à 1600 rpm. L'extraction des ARN totaux est faite

avec le kit Maxwell®. Ce kit permettre l'extraction d'ARN bactérien *via* un système automatisé conçu pour isoler rapidement et efficacement l'ARN total à partir d'échantillons bactériens. Il utilise une technologie basée sur des billes magnétiques pour capturer l'ARN, garantissant une pureté élevée et une récupération optimale tout en minimisant la dégradation de l'acide nucléique. Il comprend une série de réactifs spécialement formulés pour optimiser l'isolation de l'ARN tout en protégeant son intégrité. Voici les principaux réactifs utilisés : (1) Tampons de lyse qui contient des détergents et des agents chaotropiques pour dégrader les parois cellulaires bactériennes, libérant ainsi l'ARN tout en inactivant les ribonucléases (RNases) qui pourraient le dégrader ; (2) Billes magnétiques enrobées de silice qui permetent la liaison spécifique de l'ARN en présence de tampons de liaison ; (3) Tampons de lavage qui va éliminer les contaminants tels que les protéines, l'ADN et les composés inhibiteurs (sels, lipides, etc.) tout en maintenant l'ARN lié aux billes magnétiques ; (4) Un tampon d'élution non dénaturant est utilisé pour libérer l'ARN purifié des billes magnétiques ; (5) une DNase pour éliminer l'ADN génomique résiduel. Cette étape est essentielle pour garantir que l'ARN extrait est exempt de contamination par l'ADN.

L'ADN génomique potentiellement résiduel est éliminé avec la DNase Turbo™ (Invitrogen™). 50 µL d'ARN sont incubés pendant 30 min à 37 °C avec 4,5 µL de tampon et 1 µL de DNAse I. Puis 5 µL d'inactivateur de DNAse sont ajoutés et incubés 10 min à 1600 rpm à température ambiante. Après 5 min de centrifugation à 10 000 rpm, les ARNs sont récoltés et quantifiés au Nanodrop.

L'intégrité des ARNs est ensuite testée grâce au kit « RNA ScreenTape Analysis » (Agilent), 1 µL d'ARN est mélangé à 5 µL de tampon « RNA ScreenTape Sample » 1 min à 2000 rpm. Après des incubations de 3 min à 72°C, puis 2 min dans la glace, les échantillons sont placés dans la TapeStation pour l'analyse. Ils sont ensuite conservés au froid et aliquotés.

Les ARNs sont rétro-transcrits en ADNc avec le kit « GoScript™ Reverse transcriptase » (Promega). 100 ng d'ARN sont mélangés à 1 µL de « Random Primers » et le volume est complété à 10 µL avec de l'eau puis incubé 5 min à 72°C et placé dans la glace. Après une centrifugation rapide, 10 µL de mélange de réaction sont ajoutés. Un programme au thermocycleur soumet les échantillons à 25°C pendant 5 min, 45°C pendant 1h et 70°C pendant 15 min pour inactiver la reverse transcriptase. Les ADNc sont conservés à -20°C. Les couples d'amorces de chaque gène cible (Tableau 3) sont testés par PCR sur l'ADN génomique d'A.

pretiosum avec la polymérase Gotaq (Promega) selon le protocole du fournisseur afin de vérifier leur spécificité.

4.5. qPCR

Pour les qPCR, une gamme d'ADNg est réalisée avec 5 points de dilution (5 µg.µL^{-1} ; 500 ng.µL^{-1} ; 50 ng.µL^{-1} ; 5 ng.µL^{-1} ; 0,5 ng.µL^{-1}) en duplicats pour vérifier l'efficacité des qPCR. Les échantillons étudiés après rétro-transcription, 6 µL d'ADNc à 75 ng.µL^{-1} sont mélangés à 120 µL d'eau. Chaque réaction comprendra 13 µL de mix de PCR (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 2X (BioRad), un couple d'oligonucléotides et de l'eau) et 2 µL d'ADNc ou ADNg pour une quantité finale de 10 ng d'ADN par puits.

Fonction	Région	Séquences		Température (°C)
Transporteur ABC	FDV56_RS15615	Sens	TCCAGCTTGGTGATCTTGCC	59.4
		Reverse	ATCATGGTCTACAGCGCCTC	59.4
Transporteur ABC	FDV56_RS15790	Sens	GATCTTCCAGGCCATCTCCC	61.4
		Reverse	CAGGACGATGACCAGCACC	61.0
Transporteur ABC (*znu1*)	FDV56_RS15890	Sens	CAAGAAGGACGCCTTCACCA	59.4
		Reverse	ACCTTGGTGGGCTTGATCTG	59.4
Opéron mirubactine	FDV56_RS07610	Sens	CGACCGGAAGAAGTACGAGG	61.4
		Reverse	CCGATCACGATCAGGTCCG	61.0
Opéron *cnt*	FDV56_RS01360	Sens	GGTGTTGTTGTAGAGCCGGA	59.4
		Reverse	CTGGTCCGTCTTCGTGATCC	61.4
	FDV56_RS01345	Sens	CGGGGATGAGCTTGTAGACG	61.4
		Reverse	GCCGAGACCAGGAACATCTC	61.4
Transporteur ABC (*znu3*)	FDV56_RS05380	Sens	TACACGTTCAACGACGAGGG	59.4
		Reverse	CTTGTTGGGCACCTCGATCA	59.4
Transporteur ABC	FDV56_RS05940	Sens	CCTTCTCGGAGGAGATCACG	61.4
		Reverse	GATCACCGAGTACGACGAGC	61.4
Transporteur ABC	FDV56_RS06610	Sens	TTCCAGAAGCGGAAGGACTG	59.4
		Reverse	TCCTCTACGCCTACACCTCC	61.4
CDF	FDV56_RS14255	Sens	GTGACGAACCCGCTGATGA	58.8
		Reverse	AAGGAGAGCATCAACGTCCG	59.4
ATPase de type-P	FDV56_RS03100	Sens	GGACCTGCTGATGGTGGTC	61.0
		Reverse	GAGGTGGCGAAGATGACGAT	59.4
Transporteur ABC	FDV56_RS03155	Sens	CCCGACATCATCGGGATCAG	61.4
		Reverse	GACTTGAACGCCAGCAGGTA	59.4
ATPase de type-P	FDV56_RS07405	Sens	CGTCGTACCCGGCCTTG	60.0
		Reverse	GCAAGCTGAACAAGCTGGAC	59.4
ATPase de type-P	FDV56_RS22415	Sens	TTTCCCTTGATGGTCCGCAG	59.4
		Reverse	GATGATCGGTGACGGGGTG	61.0
Transporteur ABC	FDV56_RS30590	Sens	GTGGTGTCGGTCAGGATCAC	61.4
		Reverse	TCAACGGTCACCAGCTCAAC	59.4
Transporteur ZIP	FDV56_RS25020	Sens	GGGACGTTGCTGATGAACAC	59.4
		Reverse	GTGCCGGAGTCGATCGTG	60.6
CDF	FDV56_RS14255	Sens	GTGACGAACCCGCTGATGA	60.1
		Reverse	AAGGAGAGCATCAACGTCCG	60.1
Transporteur ABC (*efe*	FDV56_RS03120	Sens	GTTCTACCTGTACGCCGAGG	59.9
		Reverse	CTGCACGAGGTCTGGTACG	60.2
Transporteur ABC	FDV56_RS05460	Sens	ATCTGGTAGGGCGTCAGGT	61.0
		Reverse	CACTACCAAAAGAGCGGGGA	59.7
Transporteur d'ions	FDV56_RS09080	Sens	TCATCGTGGTCATCGTCGTC	60
		Reverse	AAGTCGAAGCAGTTCCACGG	60.6
CDF	CNX65_RS31110	Sens	GCCACCACGAACGAGTAGAA	60.0
		Reverse	TTCGTCGGCTTCCTCATCAC	60.1
Méthyltransférase	FDV56_RS01320	Sens	CAGGTCGAGCACCACGAG	60.13
		Reverse	CGCGTGTACGAGGTGATGTT	60.73
Transporteur ABC (contrôle)	FDV56_RS17820	Sens	ACAAGACGATCACCACGACC	60
		Reverse	AGCCCTTGGTGAAGAACTCG	60
ARN 16S	FDV56_RS35095	Sens	CGTCCCTGCTGAAAGAGGTT	59.4
		Reverse	CCACACTGGGACTGAGACAC	61.4

Tableau 3 : Liste des gènes ciblés ainsi que les amorces utilisées pour les qPCR.

5. Protéomique

Pour cette étude, les conditions ont été choisies pour comparer au mieux les différents modes de vie des *Actinosynnema*, y compris lors de la formation des synnemata (obtenus sur un milieu pauvre et en culture solide). Les échantillons ont été préparés sur site à Cadarache. Les cultures liquides ont été ensemencées avec une colonie d'*Actinosynnema* dans 20 mL de milieu (LB ou TSB$^{1/50ème}$) dans des erlenmeyers de 100 mL et laissées 7 jours à 30°C et 110 rpm en présence de billes de verre. Les cellules ont été récoltées grâce à des unités de filtration qui ont permis d'éliminer le milieu et grâce à un râteau stérile la biomasse a été prélevée, pesée puis directement congelée dans de l'azote liquide. Pour les colonies sur milieu solide, les bactéries ont été récoltées après 5 jours d'incubation. Pour les conditions milieu liquide riche, les colonies ont été récoltées avec une oese, pesées et congelées rapidement. Les synnemata quant à eux ont été prélevés sous loupe binoculaire grâce à de petites boucle en mylar (utilisées habituellement en cristallographie). Une dizaine de synnemata a été récoltée et congelée immédiatement. Le Tableau 4 rassemble les quantités envoyées pour chaque condition pour les analyses protéomique.

Culture liquide		**Culture solide**	
LB	**TSB$^{1/50ème}$**	**LB**	**TSB$^{1/100ème}$**
60,7	8,3	31,3	5 x 10 synnemata
43,1	7,8	28,7	
19,3	15	20,5	
24,3	15,6	19,3	
30	33,1	26,1	

Tableau 4 : Biomasses (en mg) d'échantillons obtenues pour les analyses protéomiques d'A. pretiosum.

Les échantillons ont été cultivés x jours à 30°C sur milieu LB, TSB$^{1/50ème}$, TSB$^{1/100ème}$ ou eau/agar en liquide et/ou solide.

Les étapes de traitement des échantillons, les analyses sur spectromètre de masse ainsi que les traitements bio-informatiques (logiciels Mascot, IRMa et PatternLab) détaillées ci-après ont été réalisés en collaboration avec Jean Armengaud du Li2D. Cette stratégie expérimentale permet l'identification sans a priori de protéines solubles et membranaires avec des abondances significativement différentes entre les différentes conditions de culture.

5.1. Préparation des échantillons de protéome et protéolyse trypsique en gel

La préparation des échantillons de protéomique et la protéolyse trypsique ont été effectuées comme suit. Brièvement, des culots cellulaires ont été resuspendus dans un volume donné (100 µL pour 1,7 mg de culot bactérien) de tampon 1X NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Invitrogen) complété avec 2% β-mercaptoethanol. Les échantillons ont été soniqués pendant 5 minutes dans un sonicator transonique 780H et soumis à une incubation de 5 min à 99°C. Les échantillons ont ensuite été soumis à une courte migration de 3 min en conditions dénaturantes à 200 V, comme décrit précédemment dans Hartmann et al. (Hartmann et al., 2014). Les échantillons ont été déposés sur un gel à gradient 4-12% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen) de 10 puits avec le tampon NuPAGE MES (Invitrogen) comme éluant. Les gels ont été colorés avec le réactif Simply Blue Safe Stain (Invitrogen). Ensuite, la bande de gel polyacrylamide de chaque échantillon qui contient à la fois les protéines solubles et les protéines membranaires a été excisée en un seul morceau. Les 40 bandes de polyacrylamide obtenues ont été lavées à l'eau MilliQ et déshydratées avec un mélange acétonytrile et bicarbonate d'ammonium (CH_3CN:NH_4HCO_3) 50 mM (1:1 v:v) avant addition de CH_3CN 100%. Les morceaux de gel ont été séchés sous vide pendant 5 min. Les morceaux de gel sec ont été réhydratés avec 100 mM de NH_4HCO_3 contenant 25 mM de dithiothreitol (DTT) et incubés pendant 10 min à 56°C. Après élimination de la solution, les morceaux de gel ont été traités avec 100 mM de NH_4HCO_3 contenant 55 mM d'iodoacétamide à température ambiante et séchés sous vide comme auparavant. Les bandes de gel ont ensuite été traitées pour la protéolyse trypsique en gel en présence de 0,01% de ProteaseMax (Promega) comme décrit précédemment (Clair et al., 2010).

5.2. Analyse NanoLC-MS/MS

Les expériences NanoLC-MS/MS pour les 40 mélanges de peptides ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse Q-Exactive HF (ThermoFisher) couplé à un système UltiMate 3000 LC (DionexLC Packings) dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Klein et al. 2016). Des mélanges de peptides (10 µL) ont été chargés et dessalés sur une pré colonne en phase inverse (Acclaim PepMap 100 C18, taille des billes 5 µm, taille des pores 100 Å, 5 mm×300 µm id) de LC Packings. Les peptides ont ensuite été séparés sur une colonne Acclaim PepMap 100 C18 en phase inverse (3 µm, 100 Å, 500 mm×75 µm id) à un débit de 0,3 $\mu L.min^{-1}$ avec un gradient linéaire de 180 min de CH_3CN/0,1% d'acide formique et injectés dans le spectromètre de masse Q-Exactive HF. L'instrument Q-Exactive HF a été utilisé selon une méthode d'acquisition Top20 comme décrit précédemment (Klein et al., 2016). Brièvement,

un cycle a été amorcé par un balayage complet des ions peptidiques dans l'analyseur Orbitrap à champ ultra-élevé, suivi de la sélection d'un seul précurseur et de sa dissociation en mode collisionnel à haute énergie, et par un balayage MS/MS sur les 20 ions précurseurs les plus abondants. Des spectres de masse ont été acquis avec un contrôle automatique du gain fixé à 3×106 ions et une résolution de 60 000 de 350 à 1800 m/z. Le balayage MS/MS a été lancé à une résolution de 15 000 lorsque la cible du contrôle automatique du gain a atteint 1×105 ions avec une intensité seuil de 83 000 et des états de charge potentiels de +2 et +3. Les ions précurseurs ont été sélectionnés avec une exclusion dynamique de 10 secondes pour augmenter la fiabilité des mesures de comptage spectral. Les spectres MS/MS enregistrés pour les 96 échantillons ont été regroupés après avoir été recherchés dans la base de données ORFeome maison. Tout d'abord, les listes de pics ont été générées avec le logiciel MASCOT DAEMON (version 2.3.2) de Matrix Science en utilisant le filtre d'importation de données extract_msn.exe du package Xcalibur FT (version 2.0.7) proposé par ThermoFisher. Les options de filtre d'importation de données ont été réglées comme décrit précédemment (Christie-Oleza et al., 2012) à masse minimale 400, masse maximale 5000, tolérance de regroupement 0, balayage intermédiaire 0 et seuil 1000. Les spectres MS/MS ont été recherchés avec MASCOT dans la base de données ORFeome ou proteome avec les paramètres suivants : peptides tryptiques avec un maximum de 2 clivages manqués pendant la digestion protéolytique, une tolérance de masse de 5 ppm sur l'ion parent et 0,02 Da sur le spectre MS/MS, modification fixe pour la Cys carbamidométhylé (+57,0215) et modification variable pour la Met oxydée (+15,9949). Tous les peptides ayant un score de peptide supérieur au seuil de requête fixé à p-value $\leq 0,05$ avec la base de données ORFeome ou protéome et le rang 1 ont été analysés avec le logiciel IRMa 1.31.1c (Dupierris et al., 2009). Les spectres MS/MS assignés à plusieurs loci ont été systématiquement éliminés. L'erreur moyenne pour la détermination de la masse peptidique est de 0,59 ppm et le score MASCOT moyen est de 50,7. Une protéine était considérée comme validée lorsqu'au moins deux peptides différents étaient détectés. L'identification des faux positifs a été estimée à l'aide d'une base de données dédiée comme étant inférieure à 0,1% avec ces paramètres. Les données de protéomique ont été déposées dans le Consortium ProteomeXchange (http://proteomecentral.proteomexchange.org) via le dépôt partenaire PRIDE (Côté et al., 2012). Le nombre total de spectres MS/MS par protéine a été déterminé pour les quatre réplicats des trois points de prélèvement des deux conditions. L'abondance des protéines a été comparée pour les trois temps de prélèvement entre les deux conditions, avec et sans uranium. Pour chacune de ces comparaisons, la liste des protéines non redondantes détectées parmi les six ensembles de données correspondants a été établie. La variation

statistique de l’abondance des protéines entre les deux conditions d'exposition a été calculée à l'aide du logiciel PatternLab (Carvalho et al., 2008). Ce logiciel permet de normaliser les données de spectres, de calculer les changements de *fold-change* à l'aide de tests statistiques (test t) et d'estimer le taux théorique de faux positifs qui en résulte. Les données MS/MS ont été compilées dans Excel (Microsoft) et converties pour PatternLab avec une macro Excel maison. La normalisation a été effectuée en tenant compte du nombre total de spectres pour chaque échantillon. Une valeur minimale de 1 a été ajoutée systématiquement à toutes les valeurs de spectres comme normalisation standard. Les paramètres de comparaisons sont les suivants : variation minimale du *fold-change* de 1,5, valeur p minimale de 0,05 et taux théorique de faux positifs de 0,15. Le facteur d'abondance spectrale normalisée (NSAF) pour chaque protéine a été calculé à l'aide de la formule : (nombre de spectres / poids moléculaire théorique) × 1000 (Christie-Oleza et al., 2012).

Résultats et discussion

1. Imagerie des souches

Actinosynnema mirum et *A. pretiosum* peuvent être mises en culture sur différents milieux, aussi bien liquide que solide. Selon le milieu sur lequel les bactéries sont cultivées, elles ont des aspects très différents et pour une même culture bactérienne dans les mêmes conditions, il existe une variabilité dans la forme des structures observées. Par ailleurs, ces bactéries sont capables de se développer même dans des conditions de culture très fortement carencées en ressources.

En milieu riche solide (LB), les bactéries vont former des colonies plutôt arrondies et orangées d'aspect rugueux et sec avec des ridules et ondulations (Figure 47A et E). Sur milieu YMG, elles vont également former des colonies orange, cette fois-ci plus lisses, et à partir de 5 jours un mycélium aérien semblable à celui des synnemata se développe autour des colonies (Figure 47B et F). En milieu solide pauvre ($TSB^{1/100ème}$ et eau/agar), les bactéries ne forment plus ces colonies orangées mais forment des synnemata très souvent organisés en cercle concentrique ou « anneau de fée » (Figure 47C, D, G et H). Ces anneaux de fée sont observés lors de la croissance de certains champignons (Choi et al., 2010). A notre connaissance, ce genre de formation n'est pas décrite pour des bactéries bien qu'une croissance concentrique, avec parfois des apparitions de motifs symétriques, soit un phénomène clairement commun (Budrene and Berg, 1995). C'est un phénomène naturel qui est retrouvé chez de nombreuses organismes appartenant à des règnes différents. Chez les plantes cette organisation en anneau de fée est notamment retrouvée dans des zones arides. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer cette organisation particulière mais elles restent néanmoins théoriques. D'un côté, la formation de ces anneaux pourrait être la conséquence d'une compétition pour l'eau. Les plantes d'un groupe forment les anneaux pour faciliter l'infiltration de l'eau et réduisent, en même temps, l'accès à l'eau aux organismes environnants ce qui engendre la formation de plusieurs anneaux dispersés sur le territoire. Une autre hypothèse implique une compétition avec d'autres espèces (fourmis ou termites) dans l'accès aux ressources (Dong, 2023). Dans les deux cas, il semblerait que les mécanismes qui conduisent à la formation de ces structures dépendent de la richesse du milieu et impliquent des stratégies de compétition dans l'accès aux ressources. Chez les champignons, ce phénomène est aussi visible et leur rayon croît tous les ans. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène et une étude récente a démontré que cette organisation était la conséquence de la germination d'une spore qui produit un mycélium qui va ensuite diffuser dans toutes les directions uniformément. Le mycélium va

consommer les ressources de son environnement jusqu'à épuisement. Lorsque les ressources sont épuisées, le mycélium s'étend en formant un anneau de plus grand diamètre. La présence d'ADN des organismes présents à l'intérieur du cercle va inhiber la croissance des champignons dans cette zone ce qui explique l'organisation en anneau (Salvatori et al., 2023). Nous ne savons pas ce qui influence une telle croissance des synnemata chez les *Actinosynnema*, ni si les explications données pour les champignons et les plantes s'appliquent également aux bactéries. Pour autant, il est évident qu'il existe un mécanisme qui induit cette croissance circulaire quasi parfaite. En plus de cet organisation circulaire, on peut observer au centre des anneaux, en milieu solide TSB$^{1/100ème}$, un dôme translucide, contrairement aux synnemata qui apparaissent opaques (Figure 47C, D, G et H). Pour la culture en eau/agar, il est possible d'observer un halo diffus au centre de l'anneau, notamment chez *A. mirum* (Figure 47D). Chez *A. pretiosum*, ce halo est également présent mais n'est visible qu'en jouant sur l'angle d'observation (Figure 47H). A l'instar de l'explication proposée pour les champignons, il est possible que ce halo soit la conséquence de l'épuisement des ressources au sein de la colonie qui aboutit au renouvellement concentrique des bactéries.

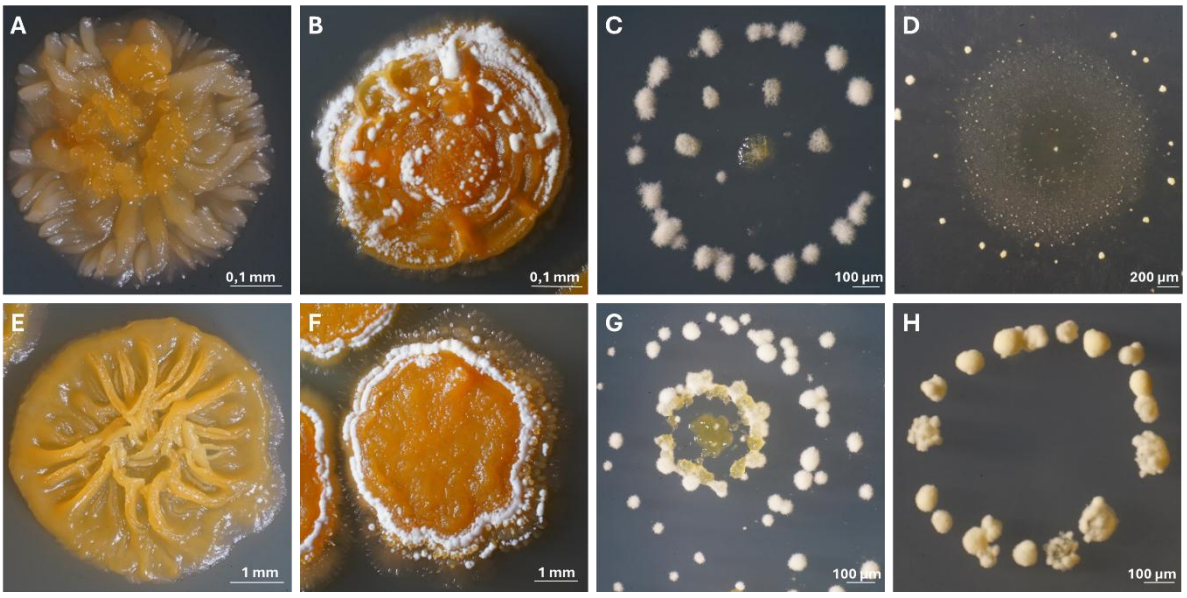


Figure 47 : Images de cultures d'A.mirum et pretiosum après 5 jours en milieux solides.
Les images ont été obtenues au microscope Axiozoom ZEISS 0,5X. Actinosynnema mirum : (A) milieu LB, (B) milieu YMG, (C) milieu TSB$^{1/100ème}$, (D) milieu Eau/agar. Actinosynnema pretiosum : (E) milieu LB, (F) milieu YMG, (G) milieu TSB$^{1/100ème}$, (H) milieu Eau/agar.

En milieu liquide, les bactéries ne se développent pas en cellules isolées mais en *pellets* (ou pelote) de filaments (Figure 48). Plus précisément, ces pelotes sont de taille, de forme et de couleurs différentes en fonction des conditions. Par exemple chez *A. mirum*, en milieu riche

YMG, les pelotes sont soit blanches et sphériques avec un plus gros diamètre (2 mm) soit plus petites (environ 1 mm) avec un aspect hérissé et d'apparence moins dense (Figure 48A). Dans une culture en milieu LB, les pelotes apparaissent toujours blanches, plus homogènes avec une forme sphérique et de diamètre d'environ 2 mm (Figure 48B). En milieu pauvre, les pelotes blanches apparaissent plus petites (moins d'1 mm) moins régulières, moins denses et moins nombreuses avec plusieurs filaments (Figure 48C). Chez *A. pretiosum,* les cultures sont beaucoup plus hétérogènes. En milieu YMG ainsi qu'en milieu LB, les pelotes sont nombreuses, de taille très différentes (de 1 à 4 mm) et de densité très variable. Les plus grosses apparaissent jaune et opaques tandis que la majorité des pelotes sont blanchâtre avec un aspect moins dense et irrégulier (Figure 48D et E).

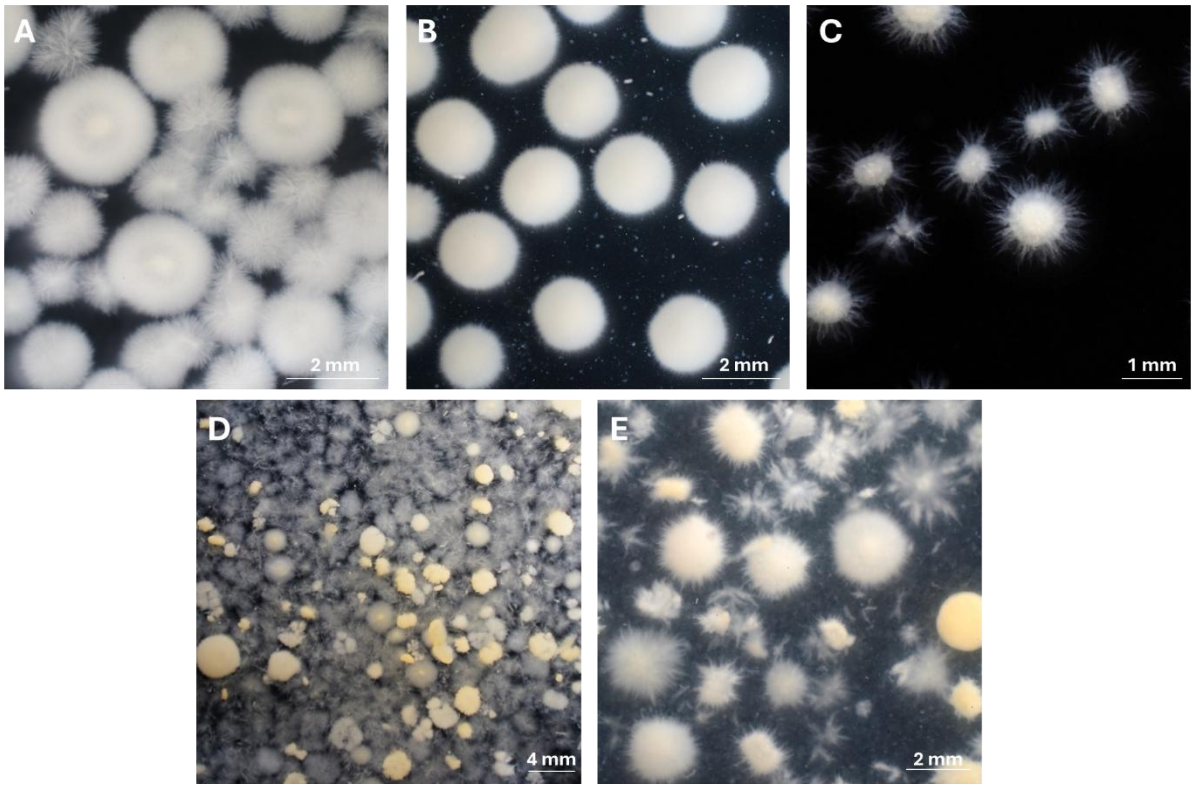


Figure 48 : Images de cultures d'A.mirum et pretiosum après 5 jours en milieux liquides.
Les images ont été obtenues au microscope Axiozoom ZEISS 0,5X. Actinosynnema mirum : (A) milieu YMG, (B) milieu LB, (C) milieu TSB$^{1/50ème}$. Actinosynnema pretiosum : (D) milieu YMG, (E) milieu LB.

Cette organisation en pelotes n'est pas inédite puisque les bactéries du genre *Streptomyces* sont également capables de former ces structures. Comme décrit dans la partie introductive, la formation de ces pelotes dépend de nombreux paramètres comme notamment la concentration en nutriments (Barka et al., 2016). Plus précisément, c'est cette accessibilité aux ressources qui conditionne la forme des pelotes. Les bactéries au centre, n'ayant pas un accès optimal aux

ressources, ont une croissance ralentie contrairement aux bactéries en périphérie qui sont capables de puiser leurs ressources directement dans l'environnement et forment des filaments (Zacchetti et al., 2018). C'est ce que l'on peut observer dans nos images avec un noyau visible au centre de certaines pelotes et une périphérie composée de filaments (Figure 48A, C et D). En milieu pauvre, la faible disponibilité des ressources favorise cette compartimentation des pelotes très rapidement dans leur développement (Figure 48C). En milieu riche, la croissance des bactéries étant favorisée, les pelotes peuvent atteindre un grand diamètre avant de présenter cette compartimentation.

2. Nouvelles données sur l'imagerie des synnemata

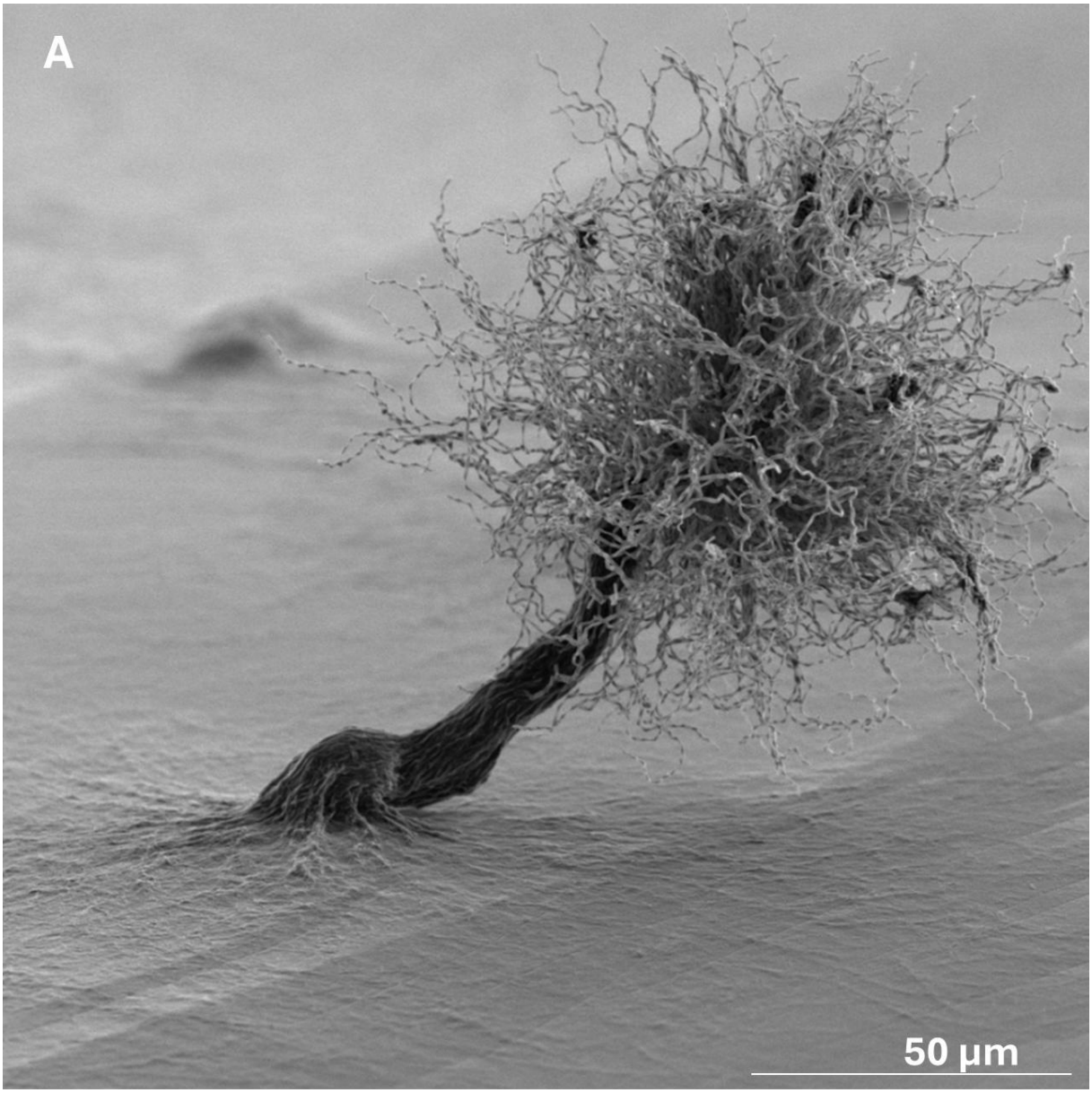
Les microscopes électroniques à transmission et à balayage ont été inventés et développés entre les années 1930 et 1950. Depuis, ils n'ont cessé d'être améliorés et perfectionnés afin de donner des images les plus résolutives possibles. En effet, comme énoncé dans l'introduction, des images MEB et MET ont été faites dans les années 1970 sur les synnemata. Grâce à ces images, les structures ont pu être observées, imagées et les chercheurs ayant découverts ces souches ont pu les décrire et créer un nouveau genre. Durant les années qui ont suivi, personne ne s'est intéressée à ses structures (probablement attirés par la production d'ansamitocine en milieu liquide), et nous avons donc décidé de remettre à jour les images des synnemata avec des microscopes de meilleures résolutions. Pour les images de microscopie, nous avons travaillé en collaboration avec Artemis Kosta et Hugo Le Guenno de la plateforme de microscopie électronique de l'IMM à Marseille mais également avec Daniel Chevrier et le microscope installé récemment au CNRS.

2.1. Microscopie électronique à balayage

Comme nous avons pu le voir précédemment, les deux souches Actinosynnema forment des structures particulières visibles à l'œil nu que nous avons choisi d'analyser avec un outil plus résolutif. Les observations au MEB des cultures des deux souches *d'Actinosynnema* ont été faites après dessiccation des échantillons de manière à conserver les structures des synnemata et des colonies.

Le synnemata d'*A. mirum* présenté ici (Figure 49A) mesure environ 150 µm de haut pour 100 µm de large au niveau de la coiffe (Figure 46B) et 10 µm de large au niveau du corps (Figure 49C). Néanmoins, la taille des synnemata est relativement variable d'une culture à une autre. Le mycélium aérien, l'hyphe érigé et le mycélium végétatif du synnemata sont bien

visibles. Le mycélium végétatif (en contact avec le substrat) précède le mycélium aérien qui présente deux zones distinctes : une première partie plus compacte qui émerge du substrat (hyphe érigé) et une partie plus lâche qui vient habiller l'hyphe érigé. Si on agrandit la zone correspondant au mycélium plus lâche, on peut observer une alternance de zones sombres et plus claires (Figure 49B). En évaluant la taille de ces alternances (2 µm environ), on peut supposer que cela représente différentes cellules fortement connectées les unes aux autres. Ces jonctions semblent définir la limite d'une cellule et montrer que les cellules sont toutes étroitement liées les unes aux autres.



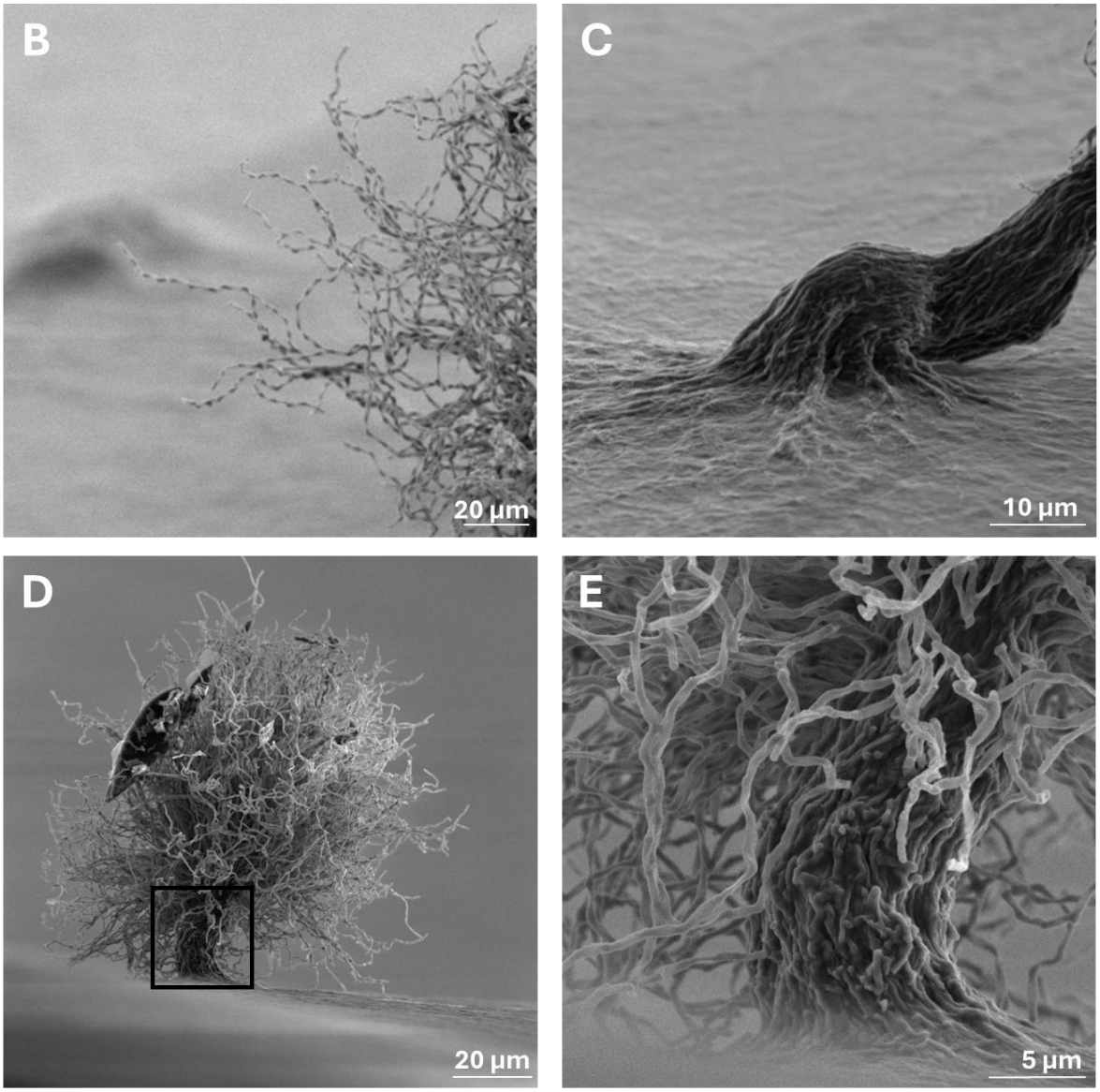
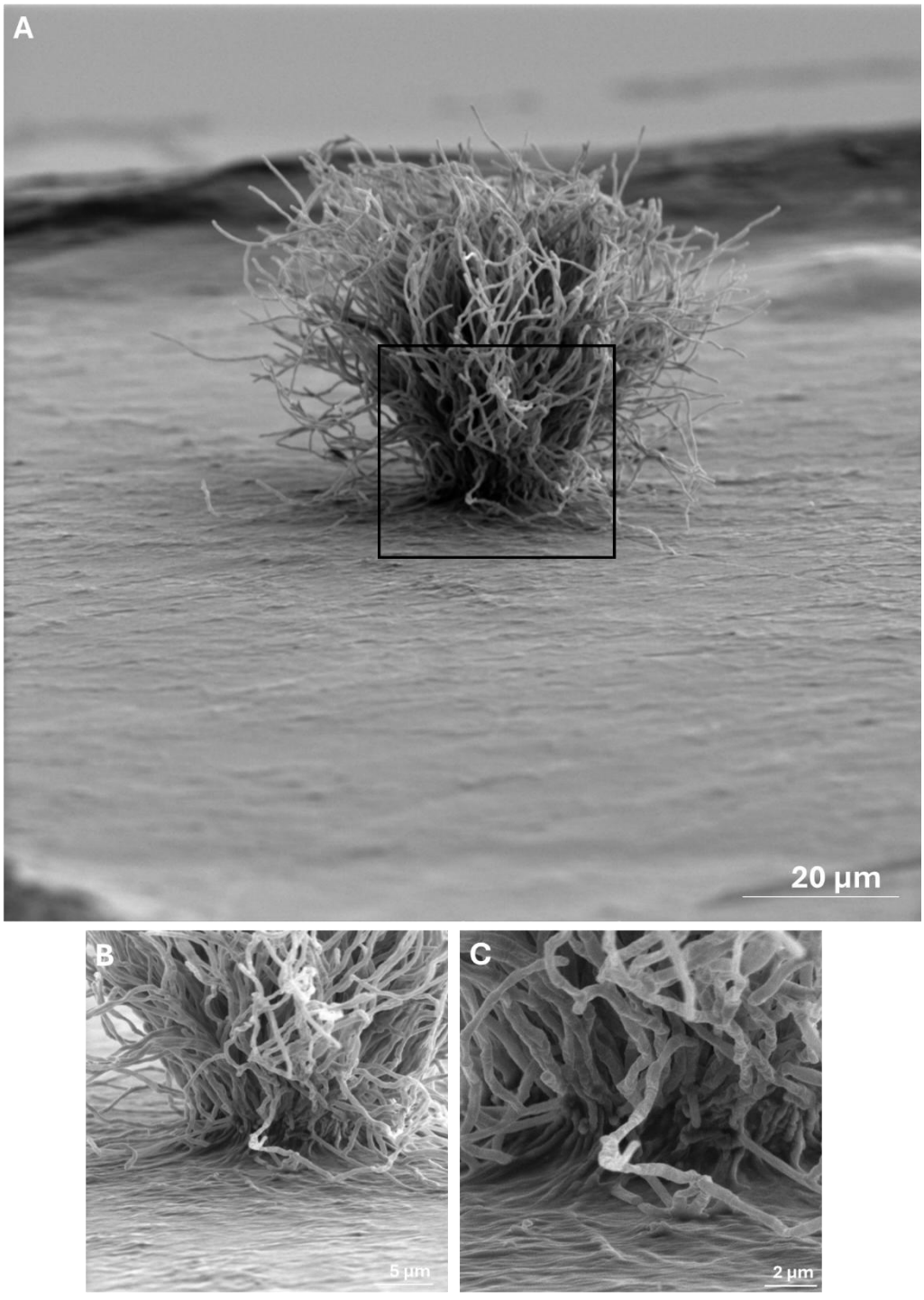


Figure 49 : Images en microscopie électronique à balayage des synnemata d'A. mirum déshydratés après 5 jours de culture sur milieu eau/agar.

(A) vue d'un spécimen entier ; (B) agrandissement du mycélium aérien du synnemata ; (C) agrandissement du bas de l'hyphe érigé et du mycélium végétatif ; (D) autre exemple d'un plus petit spécimen entier ; (E) agrandissement de l'hyphe érigé du deuxième spécimen.

Le synnemata d'*A. pretiosum* présenté ici (Figure 50A) mesure 40 µm de haut pour 40 µm de large au sommet du mycélium aérien (Figure 50B). Ici aussi on peut observer les jonctions entre les cellules (Figure 50F). Lorsqu'on se concentre au niveau de la base de l'hyphe érigé, on peut observer des cellules encore en contact avec le substrat qui n'ont pas le même aspect que celles plus haut dans l'hyphe, mettant ainsi en évidence ce passage d'une structure hydrophile à une structure hydrophobe (Figure 50B et E). Si le synnemata ne présente pas de d'hyphe érigé condensé comme on a pu le voir pour *A. mirum*, ce n'est néanmoins pas une

caractéristique de cette souche. En effet, les synnemata d'*A. pretiosum* ont aussi la capacité de former ces structures. Ces observations au MEB mettent en avant la diversité morphologique des synnemata que ce soit entre les souches (Figure 49 et Figure 50) ou au sein même d'une souche (Figure 50A, D et E). En effet, ces derniers peuvent présenter une structure au niveau du mycélium aérien plus lâche avec des filaments organisés aléatoirement (Figure 50A et E) mais aussi une structure plus condensée et complexe avec un aspect surenroulé des filaments (Figure 50D).



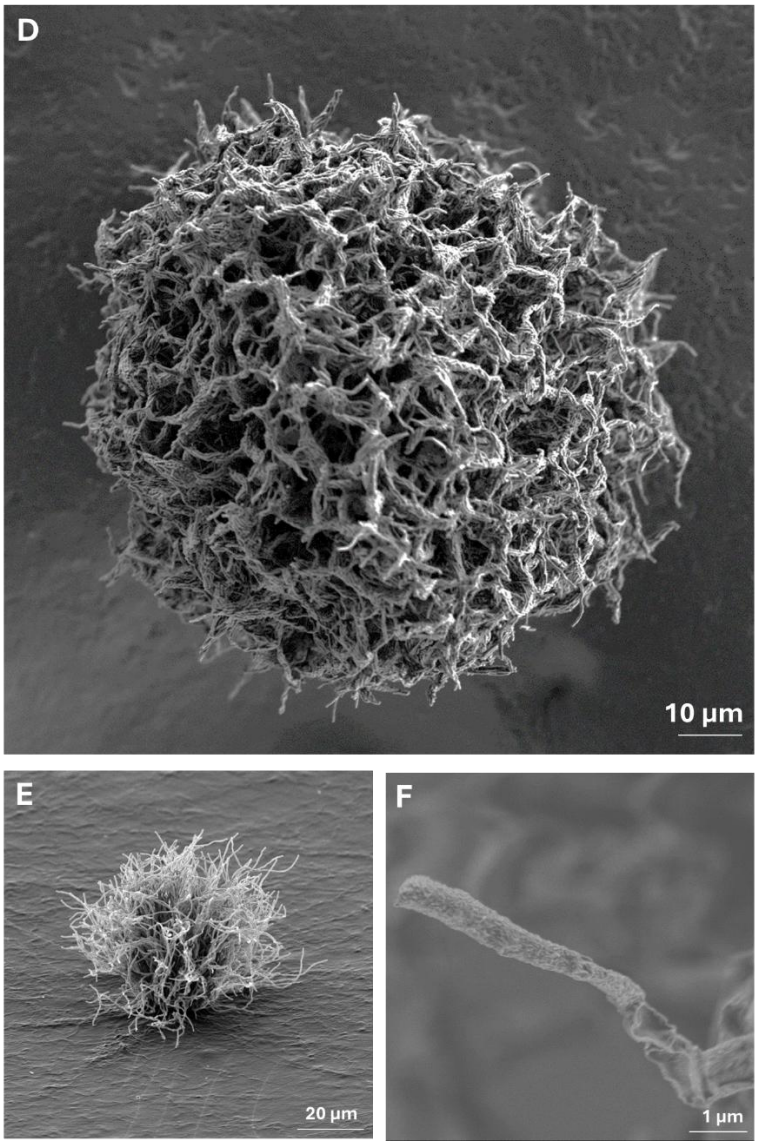


Figure 50 : Images de microscopie électronique à balayage de synnemata d'A. pretiosum déshydratés après 5 jours de culture sur eau/agar.

(A) vue d'un synnemata entier ; (B) agrandissement de la base du spécimen ; (C) agrandissement sur un filament du mycélium aérien ; (D) vue du dessus d'un mycélium aérien plus condensé ; (E) vue d'un petit synnemata et mycélium végétatif ; (F) agrandissement d'une extrémité d'un filament du mycélium aérien.

Observés jusqu'ici de manière isolée et sur milieu très carencé, les synnemata se forment également sur milieu riche YMG. Néanmoins, leur formation n'a lieu qu'à partir d'un stade avancé du développement de la colonie et ne sont présents qu'en périphérie des colonies (Figure 47B et F). Pour mieux comprendre leur structuration, les échantillons des colonies ont également été visualisés au MEB (CEA de Cadarache). On peut observer à la fois des cellules très liées et adhérentes les unes aux autres qui forment la colonie et à la fois des cellules en filaments formant des synnemata. Dans la colonie il est difficile de déterminer la taille des

cellules et de les identifier mais il est possible d'observer des plissements plus ou moins hauts donnant un aspect très texturé à la colonie. Si on fait un agrandissement de la zone texturée, on peut observer des filaments de cellules qui sortent de la colonie (Figure 51). Enfin, sur les pourtours des colonies, on peut observer des synnemata très denses et très rapprochés les uns des autres (Figure 51).

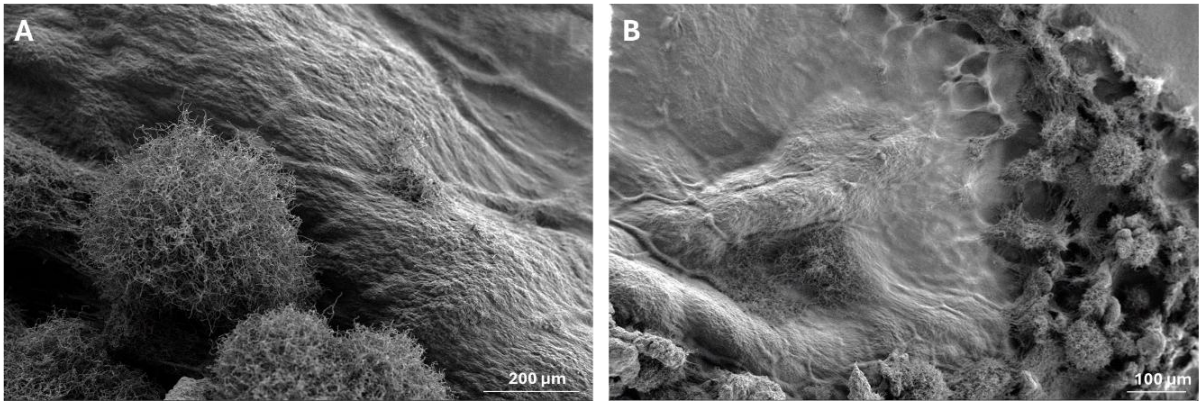


Figure 51 : Images de microscopie à balayage d'une colonie de 6 jours d'A. pretiosum sur milieu YMG.
Les colonies ont été récoltées puis déposées sur un scotch carbone monté sur un support spécial pour MEB.

Même si les synnemata ont conservé leur structure, on peut imaginer que la dessiccation a un impact sur l'apparence initiale d'un synnemata et qu'ici les troncs sont plus fins que sur un synnemata hydraté. Néanmoins, en voyant la distance qui sépare le substrat du mycélium aérien, la question de l'acquisition des ressources se pose surtout pour les cellules localisées à l'extrémité des filaments. Ainsi, il est probable qu'il existe des mécanismes d'acquisition et/ou de partage des nutriments entre les cellules.

2.2. Microscopie électronique à transmission

Des prélèvements de synnemata (obtenus sur un milieu eau/agar) ont été effectués, puis fixés et inclus dans de la résine afin d'observer ces structures par microscopie électronique à transmission. Il s'agit d'un mélange de cellules de synnemata donc nous ne pouvons pas dire si les cellules proviennent uniquement du mycélium aérien ou de l'hyphe érigé. Cependant on retrouve systématiquement ces structures filamentaires sur les coupes obtenues, avec des vues différentes selon l'axe de coupe par rapport à l'axe des filaments. Lorsque la coupe se fait le long d'un filament on peut observer des jonctions qui connectent deux cellules entre elles et ces jonctions semblent très fortes puisqu'elles occupent toute la largeur d'une cellule (Figure 52).

Comme observé avec les images de MEB, une cellule fait environ 2 µm de long et 0,5 µm de large (Figure 52A et B).

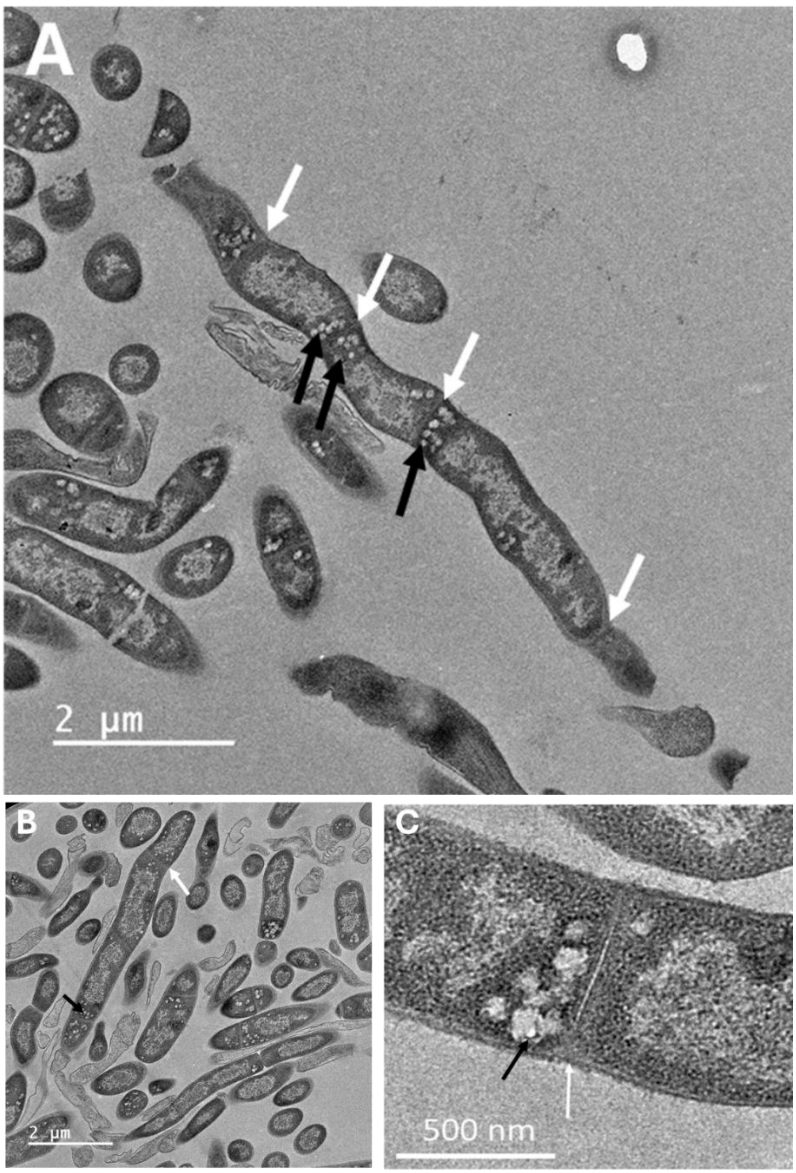


Figure 52 : Images en MET des cellules de synnemata d'A. pretiosum.
(A et B) Image d'une chaine de synnemata. (C) Agrandissement sur une jonction entre deux cellules. Les flèches blanches pointent les jonctions entre les cellules et les flèches noires pointes les vésicules.

Dans le cytoplasme des cellules, on peut remarquer la présence de vésicules blanches (*i.e.* plus transparentes aux électrons). Même si ces images ne nous permettent pas de dire ce qu'elles représentent, il pourrait s'agir de gouttelettes lipidiques, ces structures ayant été récemment décrites chez les Actinomycetes (Chi et al., 2020).

Ces vésicules peuvent varier en termes de taille et de composition, et sont définies comme l'une des deux principales formes d'assemblages lipidiques macromoléculaires associés aux systèmes biologiques (l'autre forme étant les bicouches lipidiques formant la matrice de toutes les membranes cellulaires). Les corps lipidiques sont entourés d'une monocouche de phospholipides amphipathiques, de glycolipides et/ou de stérols qui encerclent un noyau hydrophobe de lipides neutres, tels que les triacylglycérols (TAG), les diacylglycérols (DAG) ou les esters de stérol. Les réserves d'énergie procaryotes les plus courantes sont le glycogène, les polyphosphates et les polyhydroxyalcanoates, bien que quelques genres bactériens Gram-positifs puissent accumuler des lipides neutres tels que le TAG (Murphy, 2001; Chi et al., 2020). Dans le cas d'*A. pretiosum*, on peut observer un enrichissement de ces vésicules au niveau des jonctions cellulaires.

La présence et l'abondance de ces vésicules pourraient être poursuivies par des analyses au microscope confocal en utilisant des marqueurs fluorescents spécifiques (Nile Red ou LipidTOX). Ces structures pourraient, en partie, répondre à la question du partage des ressources entre les cellules du mycélium aérien en stockant des réserves énergétiques mobilisables pour les cellules voisines.

3. Répartition des métaux au sein des synnemata

Les premières observations des synnemata ont montré que les Actinosynnema formaient des structures en filament et que chacune des cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées. Alors, comment essayer de tracer ou bien répertorier la répartition de nutriments dans ces structures complexes ? L'observation de vésicules à proximité des jonctions cellulaires a donné un premier élément de réponse dans la capacité des cellules à pouvoir survivre même éloignées du substrat. Néanmoins, certains des nutriments essentiels dans le développement bactérien sont les métaux et l'homéostasie de ces derniers n'est pas régie par les mêmes mécanismes que les macromolécules tels que les lipides stockables dans des gouttelettes. Si l'on veut essayer d'obtenir des images de la répartition de nutriments essentiels au sein de structures complexes comme les synnemata, les métaux offrent un avantage certains car il existe des méthodes d'observation résolutive et également ils ne sont pas métabolisés par les cellules.

Afin de répondre à la question de la répartition des métaux au sein des synnemata, nous avons eu la possibilité d'effectuer des analyses de fluorescence à rayon X sur nos échantillons à l'ESRF de Grenoble. La ligne utilisée (ID16B) est l'une des plus résolutives, dans le régime

des rayons X à haute énergie, grâce à une taille de faisceau pouvant aller jusqu'à 50 nm. De cette manière, nous avons pu analyser la répartition des métaux au sein de synnemata entier mais aussi au sein de cellules uniques et isolées. Sur cette ligne, les échantillons étudiés sont souvent de petites tailles et fixés sur des membranes de Si_3N_4 et analysés en 2D. Or, nos échantillons sont plus complexes et nous voulions faire des cartographies sur un synnemata entier. Il a donc fallu mettre au point des stratégies afin que nos échantillons soient traversés par le faisceau sans interférer avec le support. Pour limiter les mouvements lors de l'acquisition et afin de limiter la destruction de l'échantillon par les radicaux libres générés par l'interaction avec le rayonnement X, nous avons choisi de faire les analyses sur des échantillons déshydratés montés sur des ponts de gélose ou des morceaux de gélose fixés sur des petites boucles en mylar. La difficulté était ensuite d'orienter l'échantillon de manière à trouver une région présentant un synnemata érigé, entier et isolé afin de ne pas être gêné par un autre spécimen qui se trouverait soit trop proche, soit dans l'axe du faisceau.

3.1. Répartition générale au sein de la structure

3.1.1. Données préliminaires

Les premières données ont été obtenues en 2021 par Daniel Chevrier qui a pu analyser pour la première fois un synnemata d'*A. mirum* déshydraté monté sur une boucle en mylar. Le spécimen était orienté de telle façon que le synnemata était vu « depuis le haut » et les zones dans lesquelles les acquisitions de données seront effectuées correspondent au bord du spécimen (zone encadrée dans la Figure 53A). La cartographie des éléments sur la partie encadrée en rouge de l'image en transmission a pris environ 8h et a été effectuée avec une taille de faisceau de 50 nm. Sur le spectre d'émission global on attribue un à un la position des pics d'émission de chaque élément, en fonction des raies d'émission connues des éléments. Une fois cette étape effectuée, on peut alors obtenir une cartographie de la répartition des éléments (Figure 53B). On constate que la répartition des éléments n'est pas homogène au sein du synnemata. Ils sont plus concentrés au centre de la coiffe et on distingue relativement bien certains filaments du mycélium aérien au sein desquels la concentration est plus faible. Cette variation dans la répartition de tous les éléments peut être expliquée par une densité cellulaire plus importante au centre et donc une accumulation des métaux plus importante. Seul le cuivre (Cu) semble donner lieu à un faible signal ce qui reflèterait une plus faible concentration de cet élément dans les synnemata (Figure 53B). Sur ces images il est possible de distinguer des

filaments uniques sur les extrémités, indiquant la faisabilité de l'expérience et la résolution que l'on peut obtenir.

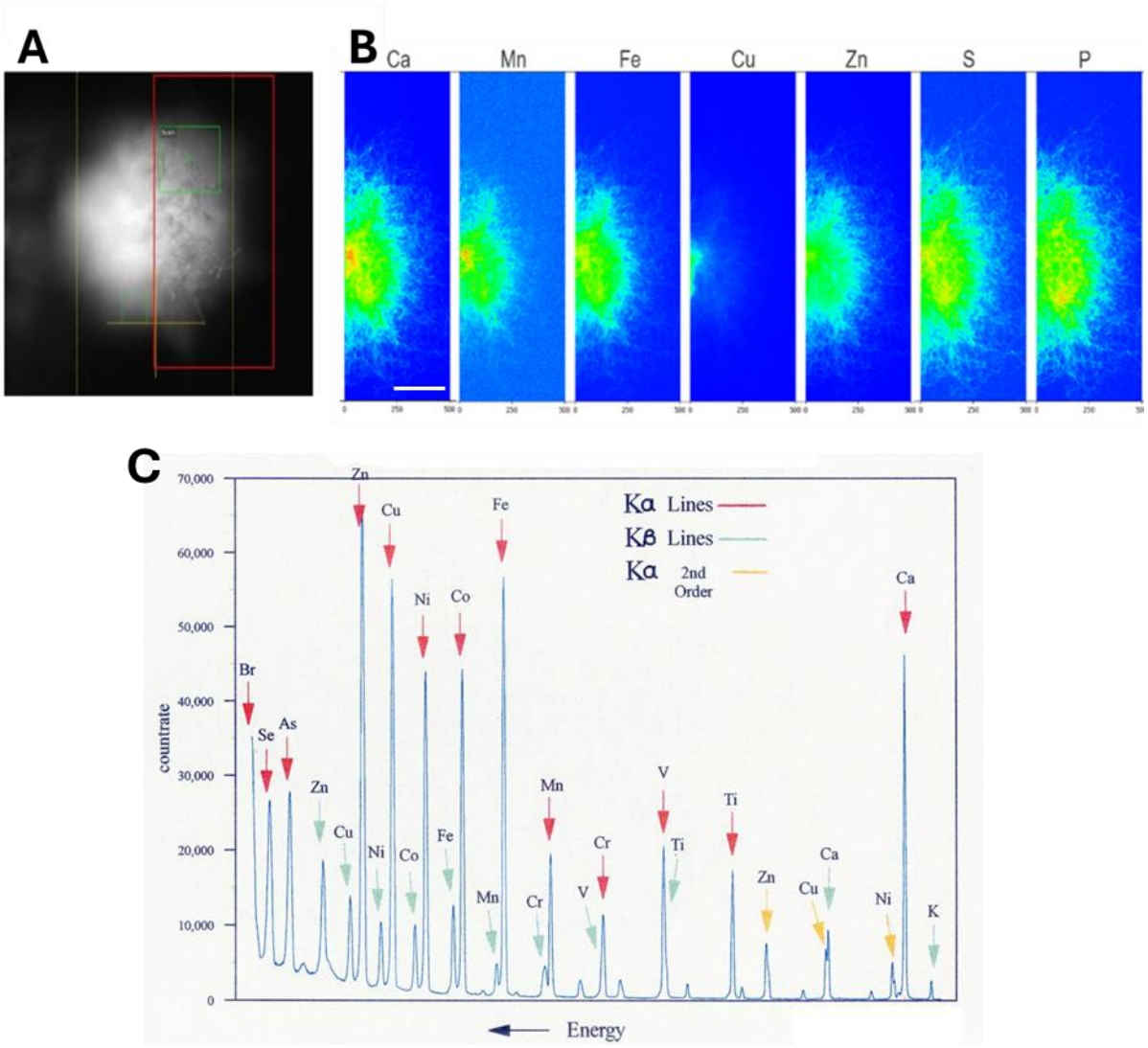


Figure 53 : Images obtenues à la lumière blanche et cartographie de la répartition des éléments.
(A) Image obtenue en lumière blanche d'un mycélium aérien d'un synnemata déshydraté. Encadrée en rouge la région analysée. (B) Répartition des métaux au sein d'une zone du mycélium aérien d'un synnemata déshydraté. Plus les couleurs se rapprochent du bleu moins le métal est présent et plus on se rapproche de la couleur rouge plus il est présent. Echelle = 25 µm. (C) Spectre typique de fluorescence X par dispersion d'énergie.

Afin de parfaire nos observations et d'étudier une éventuelle colocalisation de certains éléments, on peut superposer la distribution de plusieurs éléments, en leur attribuant des couleurs différentes. Si leur répartition est identique on obtient alors le mélange des couleurs attendues (Rouge + Vert + Bleu = Blanc). En revanche, si un élément se retrouve à des concentrations plus élevées en certains endroits, alors sa couleur prend le dessus, ce qui permet de rapidement déceler des différences et se focaliser sur des zones d'intérêt. Par exemple,

lorsque l'on superpose la distribution du calcium (Ca) avec celle du Cu et du zinc (Zn) on s'aperçoit que leur distribution est globalement similaire au centre de la coiffe (*i.e.* une couleur blanche plus ou moins marquée ; Figure 54A). En ce qui concerne le Zn, on constate cependant une hétérogénéité dans sa répartition de telle sorte qu'il est globalement plus concentré au centre qu'aux extrémités, mais il est également possible d'observer des petites zones plus fortement concentrées et donc visibles en vert sur la Figure 54B.

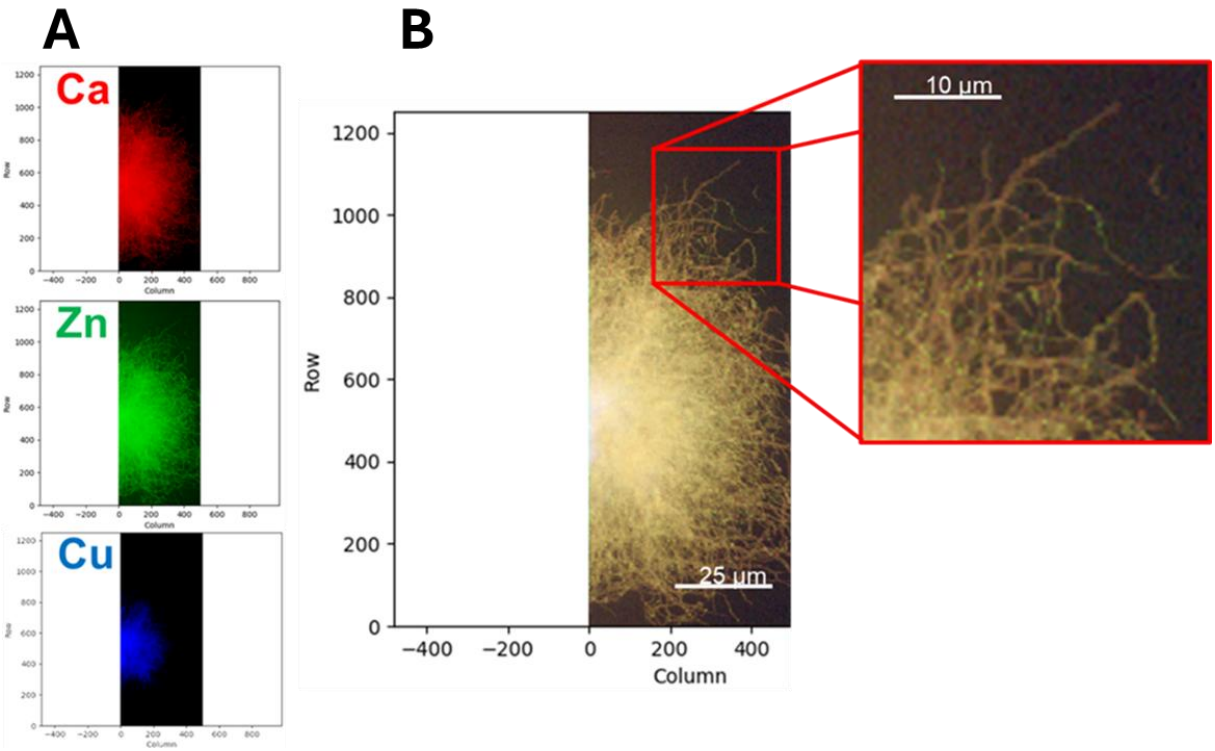


Figure 54 : Superposition de la répartition du calcium, du zinc et du cuivre au sein d'une région du mycélium aérien d'un synnemata déshydraté.

(A) Distribution du Ca, Zn et Cu (B) Superposition de la distribution des trois métaux.

Ces premières observations donnent un aperçu de la répartition des métaux au sein du mycélium aérien. Certains éléments sont colocalisés dans l'intégralité du mycélium aérien avec un gradient du centre vers les extrémités. Des métaux comme le Zn sont présents jusqu'à l'extrémité des filaments et semblent plus fortement concentrés à certains endroits le long du mycélium aérien.

3.1.2. Nouvelles analyses

Ces études préliminaires ont permis de rédiger une demande de temps de faisceau sur différents synchrotrons (ESRF et SOLEIL) et, après un refus initial, un temps de faisceau dédié

à l'observation des synnemata a pu être obtenu en 2023 sur la même ligne ID16B à l'ESRF de Grenoble. Pour l'obtention des synnemata, *A. mirum* et *A. pretiosum* ont été cultivées sur milieu $TSB^{1/100ème}$ et eau/agar pendant 5 à 6 jours puis des bandes de géloses présentant des synnemata ont été découpées puis dessiquées 24h dans une cloche sous vide. Les échantillons montés ont été analysés avec une puissance de faisceau à 13 keV. De même que pour les premières cartographies, les correspondances entre les différents pics de fluorescence obtenus et les éléments auxquels ils appartiennent ont été faits grâce au logiciel PyMca. Ceci a permis de convertir les spectres d'émission en images pour chacun des éléments détectés.

3.1.2.1. Répartition des métaux dans un synnemata entier

Notre premier objectif a été de trouver une méthode pour évaluer la répartition des métaux au sein de synnemata orientés « de profil », et cela en utilisant deux souches différentes et cultivées sur différents milieux. Chez *A. mirum*, en milieu solide $TSB^{1/100ème}$, la structure du synnemata apparait très clairement : le tronc à la base et le mycélium aérien au sommet du tronc. Les métaux sont présents à des intensités variable (elles-mêmes proportionnelles à la concentration) au sein du synnemata. Le potassium (K), le phosphore (P), le Zn et le fer (Fe) semblent être répartis de manière uniforme entre le tronc et le mycélium aérien au sein duquel ils sont présents jusqu'aux extrémités des filaments. Le Ca et le soufre (S) sont quant à eux majoritairement retrouvés dans le tronc et leur présence au sein du mycélium aérien semble s'atténuer. Enfin le manganèse (Mn) est retrouvé dans le tronc et semble moins concentré dans le mycélium (Figure 55).

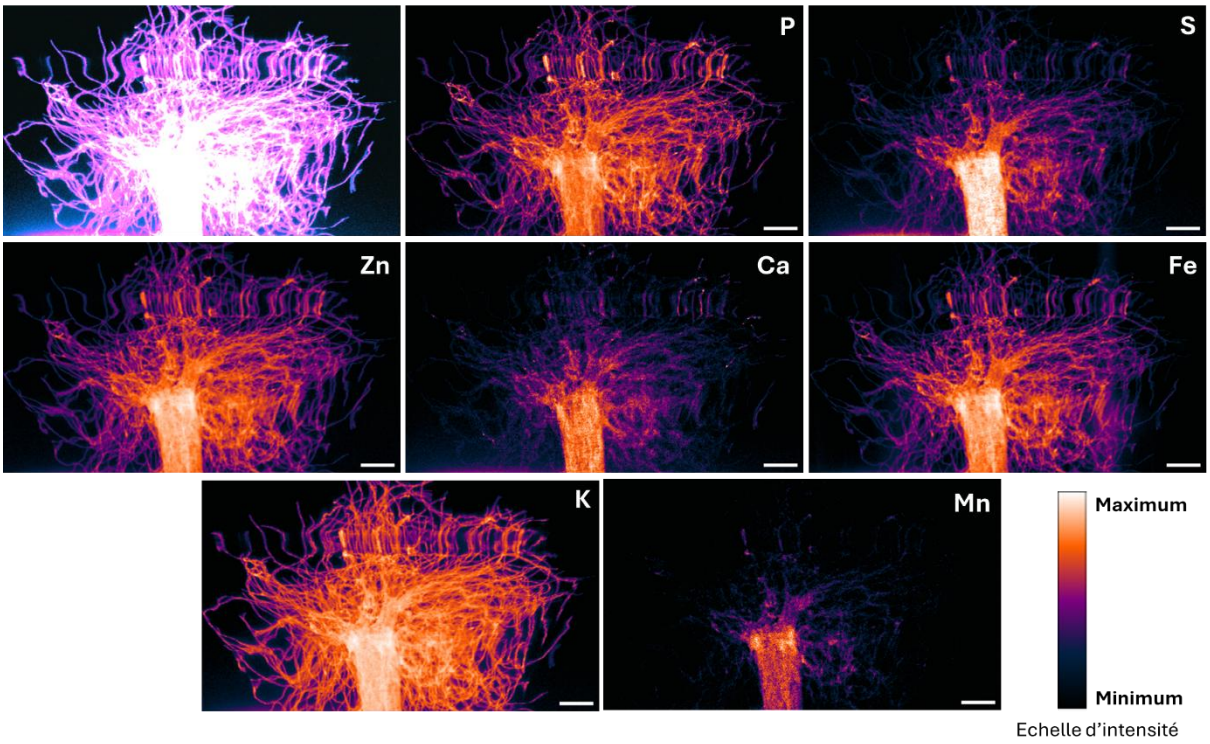


Figure 55 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. mirum (TSB$^{1/100ème}$).

La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 20 µm.

En milieu Eau/agar, les différents éléments semblent être retrouvés tout au long du synnemata avec quelques variations. Le K, P, Zn et S sont présents tout au long du synnemata, alors que le Mn et le Ca ne semblent pas présents jusqu'aux extrémités des filaments. Le Fe semble être plus abondant au niveau du mycélium aérien (Figure 56).

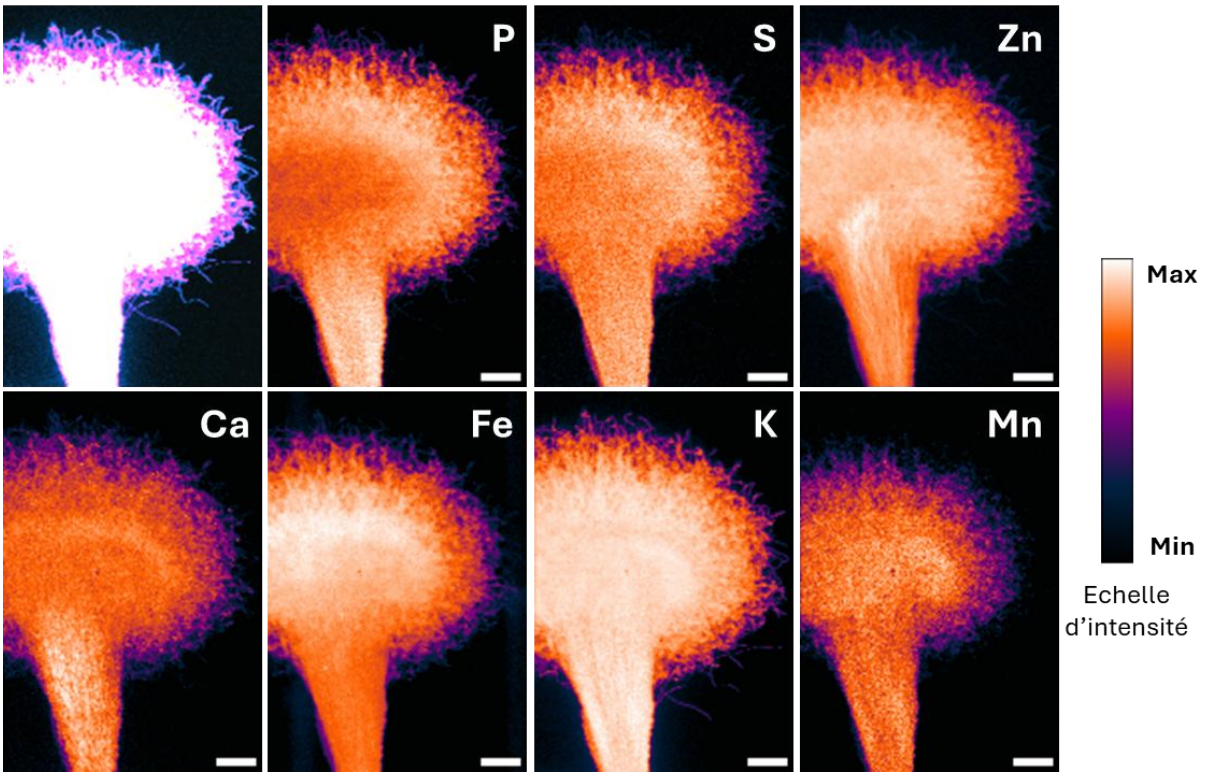


Figure 56 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. mirum (Eau/agar).

La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 10 µm.

Chez *A. pretiosum*, en milieu solide TSB$^{1/100ème}$, la répartition des métaux est également hétérogène. Le P est retrouvé de manière homogène de la base du tronc aux extrémités des filaments du mycélium aérien. Le Fe et K sont retrouvés également tout au long du synnemata mais il semblerait que la concentration de ces deux éléments soient moins importante dans le mycélium aérien que dans le tronc. Le Zn, Ca et S sont majoritairement retrouvés dans le tronc et ne semblent pas être présents jusqu'aux extrémités des filaments. Enfin le Mn n'est retrouvé que dans le tronc du synnemata (Figure 57).

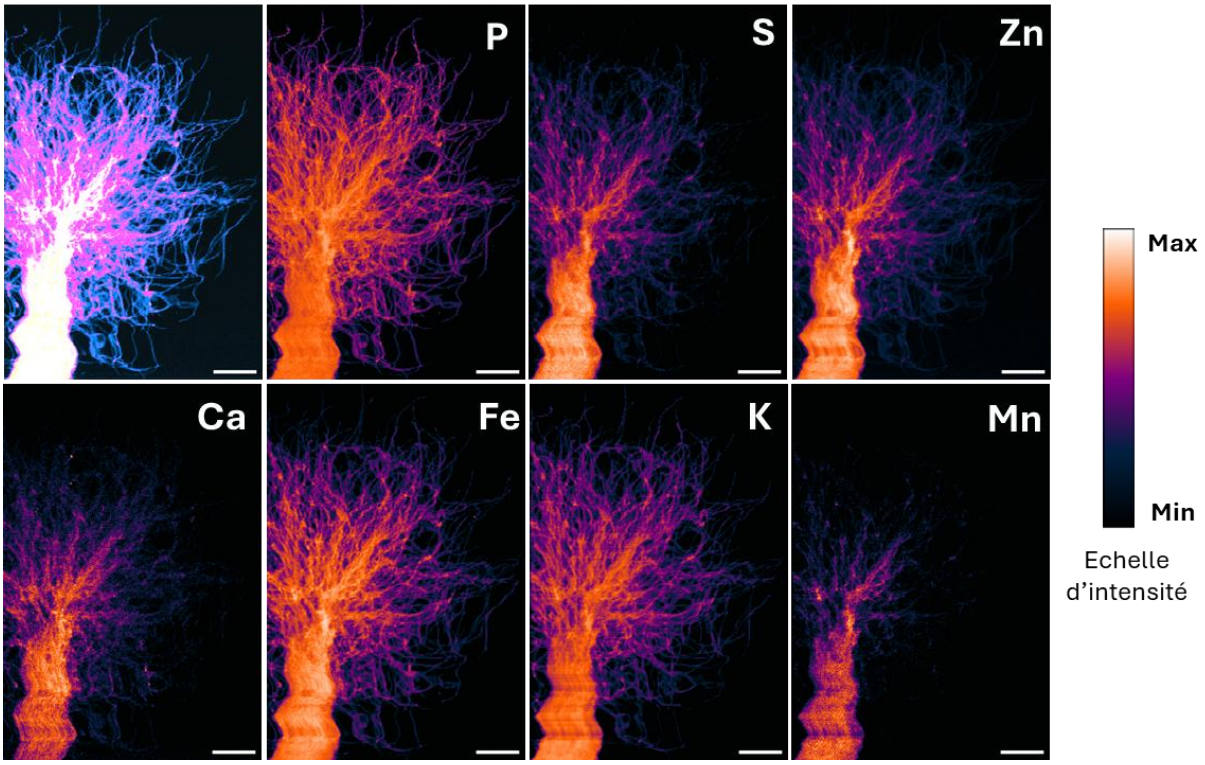


Figure 57 : Images XRF de la répartition des métaux au sein d'un synnemata d'A. pretiosum (TSB$^{1/100ème}$).

La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 10 µm.

Sur la base des images analysées, aussi bien chez *A. mirum* que *A. pretiosum*, la répartition des métaux ne semble pas homogène au sein des synnemata. Certains métaux comme le P ou le K sont retrouvés dans l'ensemble du synnemata tandis que d'autres comme le Mn semble moins concentré au bord du mycélium aérien que dans le tronc. Néanmoins, les images présentées sont le résultat d'un traitement informatique pour visualiser la répartition des éléments. Par ailleurs, nous avons utilisé une représentation en échelle logarithmique pour faciliter l'observation préliminaire de la concentration relative des métaux. Par conséquent, des analyses plus quantitatives ont été faites à partir des intensités de fluorescence obtenues par XRF afin d'étudier plus précisément la répartition des éléments dans les synnemata. En effet le signal est tel que l'on a des intensités de signal pour chaque élément qui varient d'un maximum (I_{max}) à un minimum (I_{min}), et un traitement vise à étaler cette différence entre des valeur allant de 0 à 100. On peut alors effectuer des comparaisons et éventuellement des rapports de concentration.

En utilisant cette approche, la répartition des métaux apparait beaucoup plus homogène quel que soit la souche ou le milieu considéré. En effet, pour les deux synnemata observés en

milieu TSB$^{1/100ème}$, les métaux sont présents majoritairement dans le tronc et une décroissance de leur abondance est observable à partir du début du mycélium aérien. Pour le synnemata observé en eau/agar, les métaux sont abondants tout au long du synnemata (Figure 58). Cette même analyse globale montre que pour la plupart des éléments il semble y avoir une certaine covariation dans leur concentration le long du synnemata suggérant que la variation de concentration des éléments est corrélée.

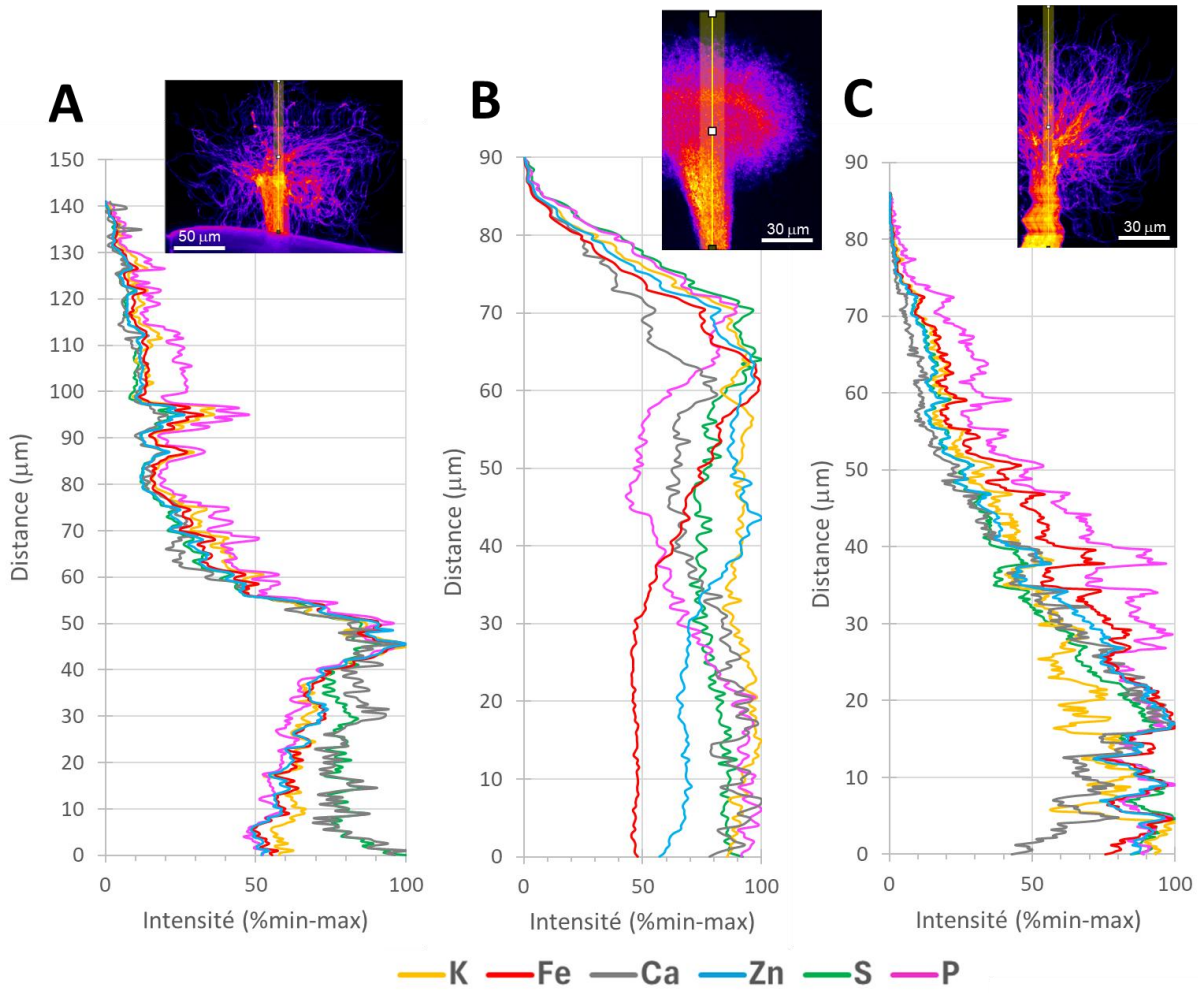


Figure 58 : Profils d'intensité de fluorescence (%) des éléments obtenues en XRF chez A. mirum et A. pretiosum.

(A) Profils d'intensité d'A. mirum cultivée sur milieu solide TSB$^{1/100ème}$ (B) Profils d'intensité d'A. mirum cultivée sur milieu solide Eau/agar (C) Profils d'intensité d'A. pretiosum cultivée sur milieu solide TSB$^{1/100ème}$.

Toujours dans le cadre d'une analyse globale, on peut voir que sur la Figure 58A (*A. mirum* cultivé en milieu TSB$^{1/100ème}$) la concentration maximale pour l'ensemble des éléments est atteinte à une hauteur d'environ 50 µm. Cela semble être également le cas pour A. pretiosum cultivé dans les mêmes conditions (Figure 58C) alors que cela semble différent pour *A. mirum*

cultivé en eau/agar, pour lequel il semble y avoir deux maxima (à la base du synnemata puis vers 60-70 µm de haut), à l'exception du Fe (pour lequel on observe un seul pic de concentration vers 60 µm) et du Zn (un large maximum qui s'étend de 40 à 70 µm de haut). Pour cet échantillon on remarque également que la covariation de la concentration des éléments le long du synnemata est moins évidente.

Ces différences d'observation peuvent être expliquées par différentes hypothèses. Tout d'abord par la différence de souches utilisées et de milieux sur lesquels les cellules ont été cultivés. La morphologie des synnemata pourrait induire une variabilité d'abondances détectée en XRF. En effet, les synnemata étudiés ici en $TSB^{1/100ème}$ ont un mycélium aérien beaucoup plus diffus que celui du synnemata étudié en eau/agar. Par conséquent, la densité plus importante du mycélium de ce dernier pourrait augmenter l'abondance détectée en raison d'une biomasse plus importante. Également, bien que les cultures soient toutes du même âge, il est possible que les synnemata étudiés soient plus ou moins anciens ce qui pourraient induire une variabilité dans les métaux retrouvés dans leurs filaments. Aussi, les synnemata présentent une structure tridimensionnelle qui rend leur analyse plus complexe. En effet, lors des acquisitions, certains synnemata ont bougé sous l'effet des rayons (particulièrement visible sur l'échantillon représenté sur la Figure 57). L'idéal aurait également été de faire ces analyses sur des échantillons cryogénisés pour les stabiliser. Néanmoins, la cryogénisation des synnemata (nécessairement dans l'air) n'est pas encore maitrisée et, d'autre part, la ligne ID16B ne permet pas l'observation d'échantillons cryogénisés. Pour finir, la forte intensité des métaux détectée dans le tronc, où la biomasse est élevée, peut écraser l'intensité de métaux présents dans le mycélium. Pour s'affranchir de l'effet de la biomasse, nous avons choisi de rapporter les intensités obtenues par rapport aux intensités du soufre. Cet élément rentre en effet dans la composition des protéines à travers les acides aminés cystéine et méthionine et il représente donc une bonne approximation de la concentration en protéine et, de fait, de la biomasse bactérienne. D'autre part, dans toutes les analyses que nous avons pu faire, notamment celles décrites plus bas sur des filaments de mycélium relativement isolés, nous avons constaté que le signal du soufre était stable le long de ces filaments. En utilisant cette approche de proportionnalité du signal Me(Métal)/S, la répartition des métaux apparait relativement homogène le long d'un synnemata (Figure 59). Pour simplifier la description nous nous focaliserons sur les signaux du Zn et du Fe ainsi que le Ca. Chez *A. mirum*, en milieu solide $TSB^{1/100ème}$, la répartition du Ca est stable sur l'ensemble du synnemata, avec un signal Ca/S évoluant autour de 1 (Figure 59A). Pour les rapports Fe/S et Zn/S ces signaux augmentent

jusqu'à une valeur de 2 qui est atteinte à une hauteur de 50 µm puis restent relativement stable. Dans l'ensemble cela indique qu'il n'y a pas moins de Fe, Zn ou Ca aux extrémités du mycélium aérien que dans le tronc du synnemata ou bien à la base de ce tronc. En milieu solide eau/agar, les trois métaux suivis sont relativement stable sur toute la hauteur du synnemata et les rapports Me/S évoluent autour d'une valeur de 1 jusqu'à la fin du synnemata (Figure 59B). Chez *A. pretiosum*, la répartition est identique à ce que l'on retrouve pour *A. mirum* en milieu eau/agar puisque les signaux relatifs des trois métaux sont retrouvés de manière homogène sur l'ensemble du tronc (avec un ratio d'environ 1 ; Figure 59C).

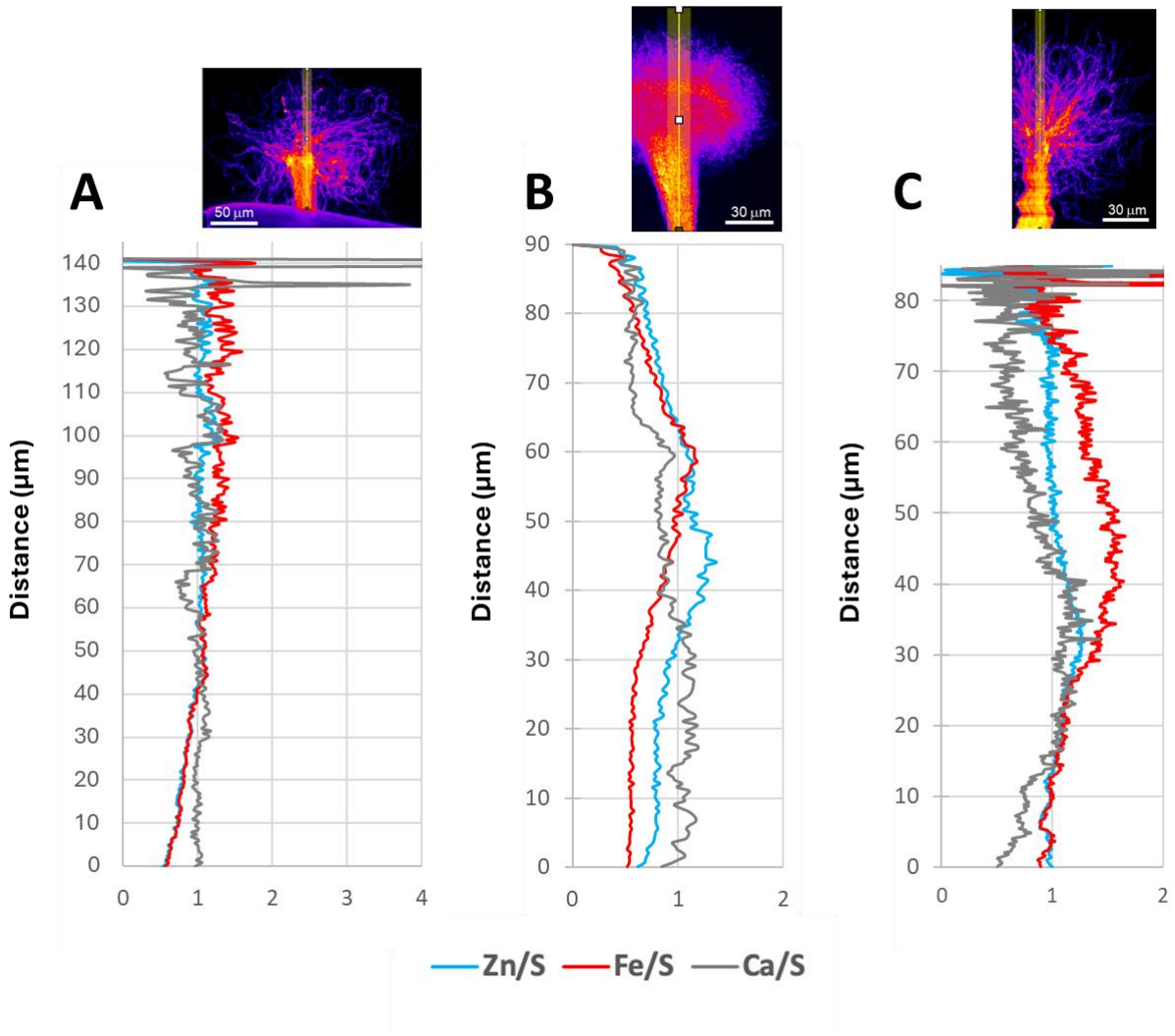


Figure 59 : Profils d'intensité de fluorescence rapportés au soufre des éléments obtenues en XRF chez A. mirum et A. pretiosum

(A) Profils d'intensité d'A. mirum cultivée sur milieu solide TSB$^{1/100ème}$ (B) Profils d'intensité d'A. mirum cultivée sur milieu solide Eau/agar (C) Profils d'intensité d'A. pretiosum cultivée sur milieu solide TSB$^{1/100ème}$.

Globalement, si on prend en compte la densité cellulaire (signal S) au niveau du tronc et dans le mycélium aérien et que l'on compare les concentrations en Ca, Fe et Zn, il semblerait

que notre première observation se confirme : il n'y a pas moins de ces éléments aux extrémités du mycélium aérien qu'à la base du synnemata ou bien dans le tronc. Dans l'ensemble, notre étude indique que le rapport Me/S évolue autour d'une même valeur (environ 1) avec parfois une légère hétérogénéité, soit dans le tronc soit dans le mycélium aérien. Nous concluons de ces observations qu'il y a des mécanismes efficaces qui permettent de maintenir une concentration relativement stable de métaux (en rapport à la biomasse) tout au long d'un synnemata, sur des hauteurs pouvant aller jusqu'à 130-140 µm. Par la suite, nous avons voulu tirer avantage des capacités résolutives de la ligne ID16B en utilisant une taille de faisceaux la plus petite possible (100-200 nm) tout en focalisant sur des parties du mycélium aérien pour lesquelles nous pouvions déceler des filaments isolés, afin d'étudier la répartition des éléments avec une résolution éventuellement subcellulaire.

3.1.2.2. Répartition des métaux à l'extrémité du mycélium aérien

Probablement l'un des plus beaux échantillons que l'on ait pu collecter correspond à une partie haute d'un synnemata d'*A. pretiosum*, dans lequel on peut discerner à la fois le cœur de l'hyphe érigé ainsi que des filaments isolés (Figure 60). De manière frappante, la répartition des métaux apparait alors assez hétérogène au sein du mycélium aérien. A la base du mycélium, les filaments sont rapprochés ce qui rend leur distinction impossible et l'intensité du signal pour chaque élément est moyenné. Cette décroissance globale du signal lorsque l'on se déplace vers des filaments isolés se combine donc avec une hétérogénéité qui est clairement visible pour le Ca et le P, alors que cette hétérogénéité semble moins visible pour le Zn, Fe et K, par exemple.

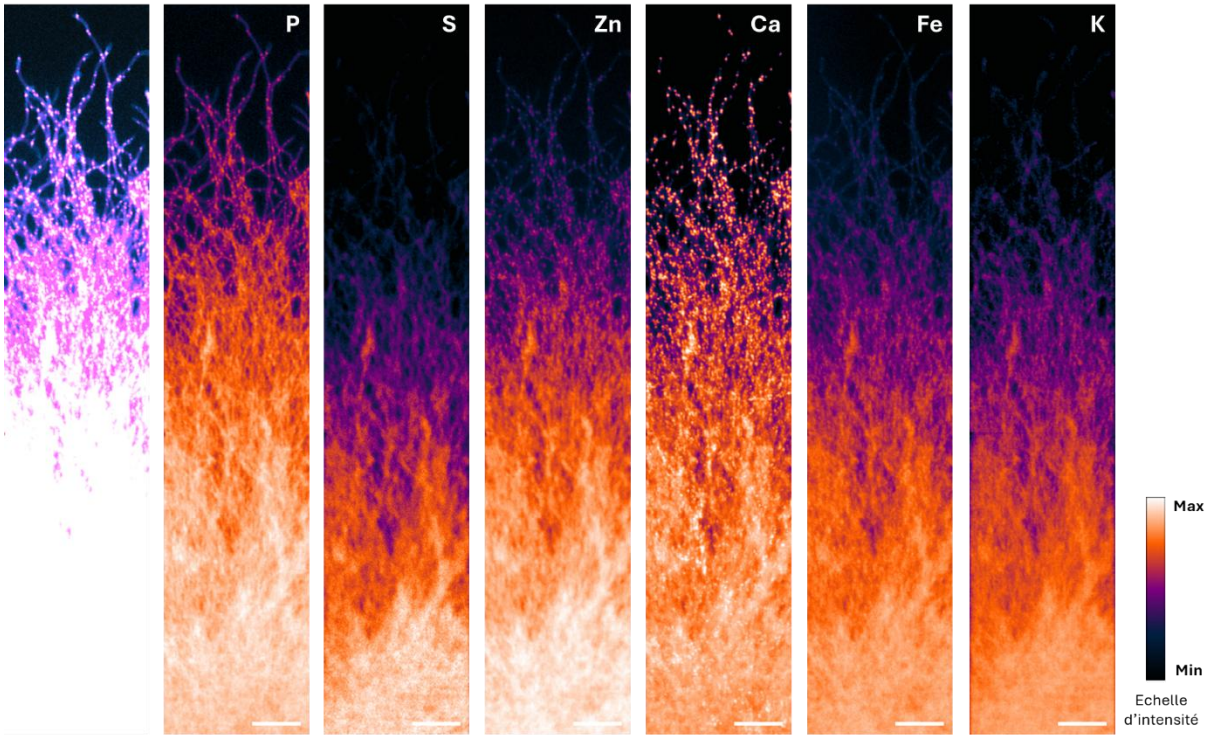


Figure 60 : Images XRF de la répartition des métaux au sommet du mycélium aérien d'un synnemata d'A. pretiosum (Eau/agar).
La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 5 µm.

Cette hétérogénéité dans la répartition des signaux correspondant à certains éléments semble indiquer une localisation subcellulaire préférentielle le long d'un filament de mycélium aérien, et nous avons donc voulu essayer d'analyser cette localisation plus précisément.

3.1.2.3. Répartition des métaux au sein de bactéries/filaments

❖ ***Chez A. pretiosum***

Ici, nous nous concentrons sur l'extrémité du mycélium aérien à partir d'un zoom des images précédentes (Figure 60A) afin de s'affranchir de la forte intensité de la base du mycélium. Les intensités du S et du K semblent être homogènes le long des filaments à l'exception des points de croisement de ces derniers. Effectivement, lorsque des filaments se croisent, l'intensité de l'élément considéré apparait légèrement plus importante que dans un filament isolé (Figure 61). Pour les autres éléments (P, Zn, Ca et Fe), la répartition semble non seulement s'étendre jusqu'aux extrémités des filaments mais également se combiner avec une répartition ponctuée et régulière, avec souvent deux maxima rapprochés séparés d'une zone plus longue et moins concentré.

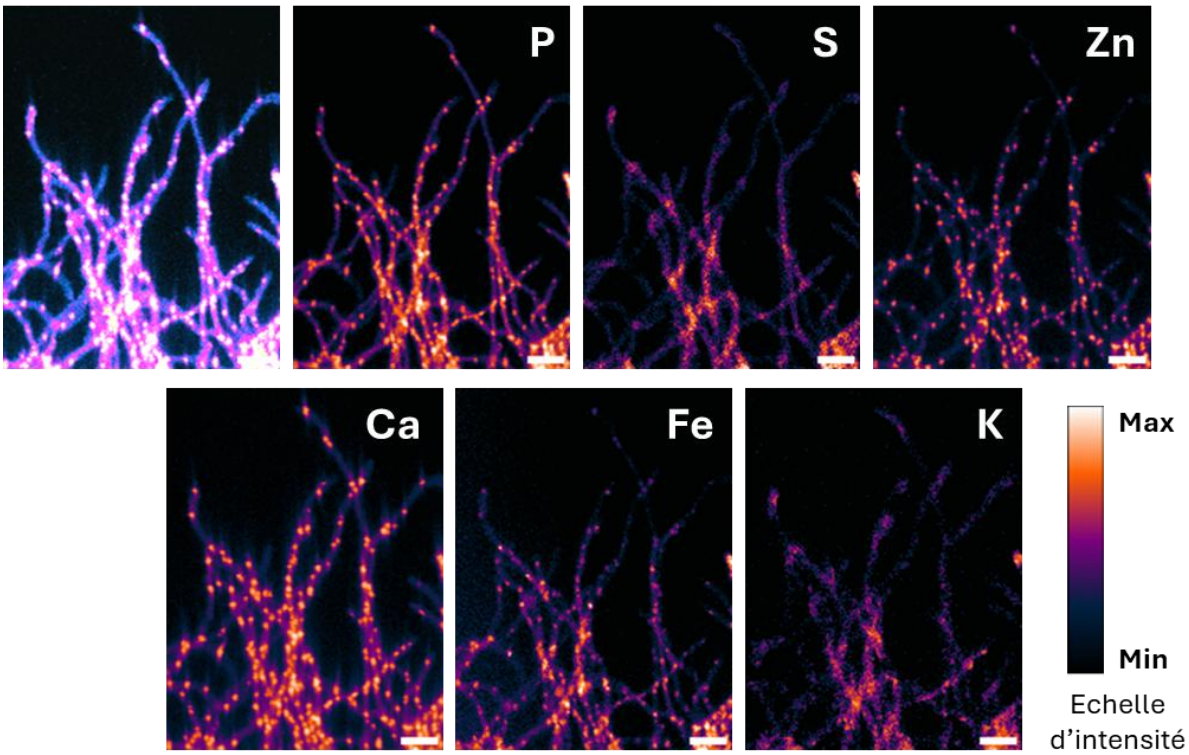


Figure 61 : Images XRF de la répartition des métaux dans les filaments à l'extrémité d'un synnemata d'A. pretiosum (Eau/agar).

La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 2 µm.

De manière à quantifier le profil d'intensité des éléments le long de filaments isolés, nous avons utilisé la fonction « Plot profile » d'ImageJ le long d'une ligne ou bien d'une ligne segmentée. Deux zones ont été sélectionnées et pour lesquelles des filaments apparaissent de manière relativement isolée (lignes B et C ; Figure 62A). La répartition des différents métaux le long de ces lignes semble indiquer des pics de concentration à des intervalles relativement réguliers (Figure 62A). Certains éléments montrent des maxima retrouvés selon un intervalle correspondant à une distance assez élevée (1,3-2 µm) et parfois assez court (0,4 µm). Dans les deux cas, à l'exception du S qui semble être distribué de manière homogène, tous les autres éléments montrent des maxima qui se superposent indiquant que ces éléments sont colocalisés (Figure 62B et C). A mesure que l'on explore des zones dans lesquels les filaments du mycélium se densifient, cette analyse devient plus compliquée du fait de la superposition des signaux.

La présence de maxima pour certains éléments s'explique par une plus forte densité de ces éléments. La colocalisation d'un grand nombre d'élément indique quant à elle la présence d'une phase particulière qui rassemble ces éléments. Le fait que le phosphate puisse interagir avec de nombreux métaux divalents suggère éventuellement la présence de complexe

phosphate-métaux ou bien polyphosphate-métaux. Pour ce qui est de la distance entre deux maxima, celle-ci peut s'expliquer de plusieurs manières. En effet, cette distance est réelle si le filament bactérien est orienté perpendiculairement au faisceau d'analyse (la projection est en deux dimensions), mais si le filament bactérien s'oriente dans l'axe du faisceau, alors il peut y avoir un biais de projection. Si l'on fait l'approximation d'un filament orienté de manière perpendiculaire au faisceau, le fait que des maxima semblent alterner entre des distances courtes (0,4 µm) et longues (environ 2 µm) sur la Figure 62C pourrait refléter des concentrations de métaux plus élevés aux pôles des cellules.

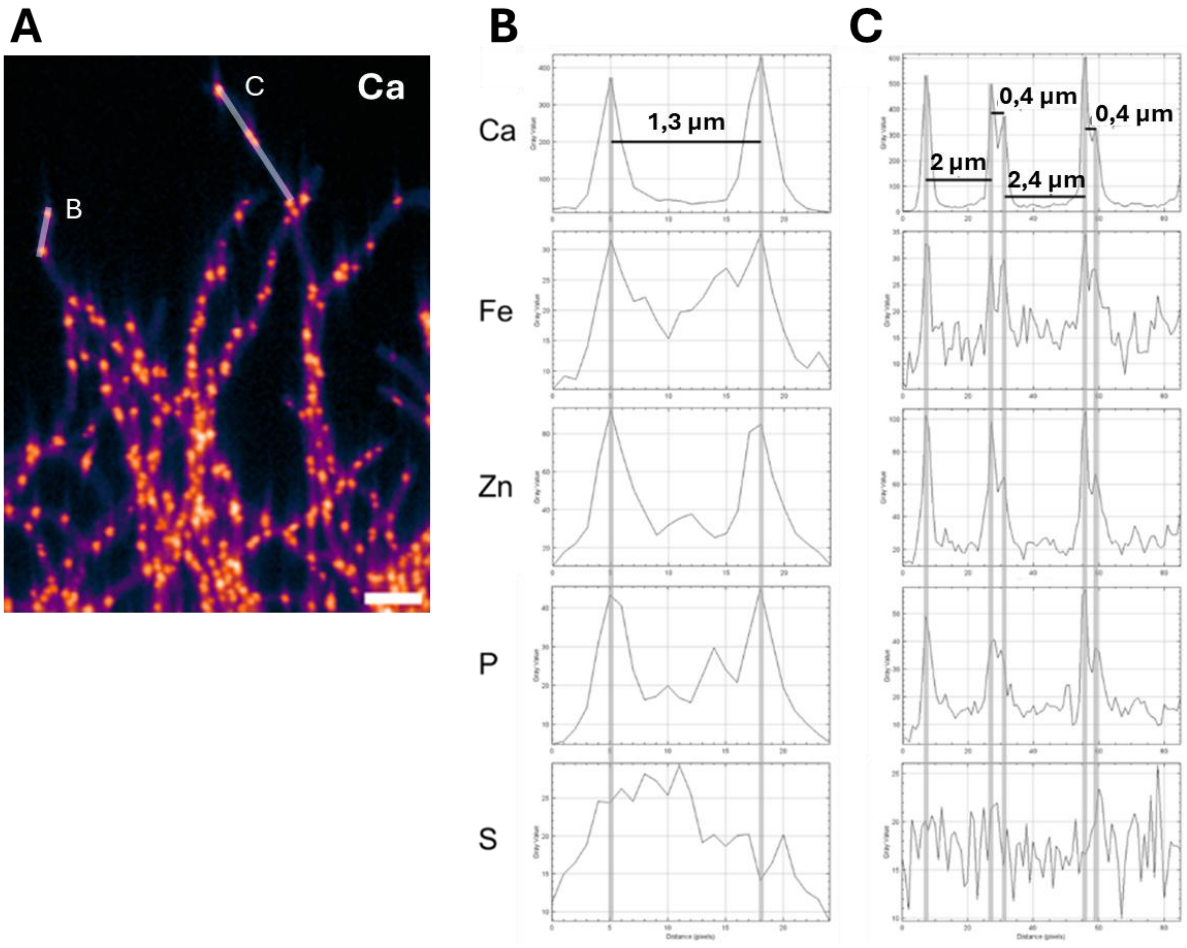


Figure 62 : Profils d'intensité des différents éléments au sein de filaments à l'extrémité d'un synnemata (Eau/agar).

(A) Illustration des filaments analysés. (B et C) Profils d'intensité des différents éléments sur les deux filaments choisis.

Dans un autre échantillon d'*A. pretiosum*, le même pattern de répartition est observable dans le filament : la plupart des métaux sont retrouvés colocalisés sur ce dernier (Figure 63A).

Là encore, le S apparait diffus tout au long du filament tandis que certains métaux comme le Zn, le Ca ou le Fe sont retrouvés plus concentrés dans des zones précises.

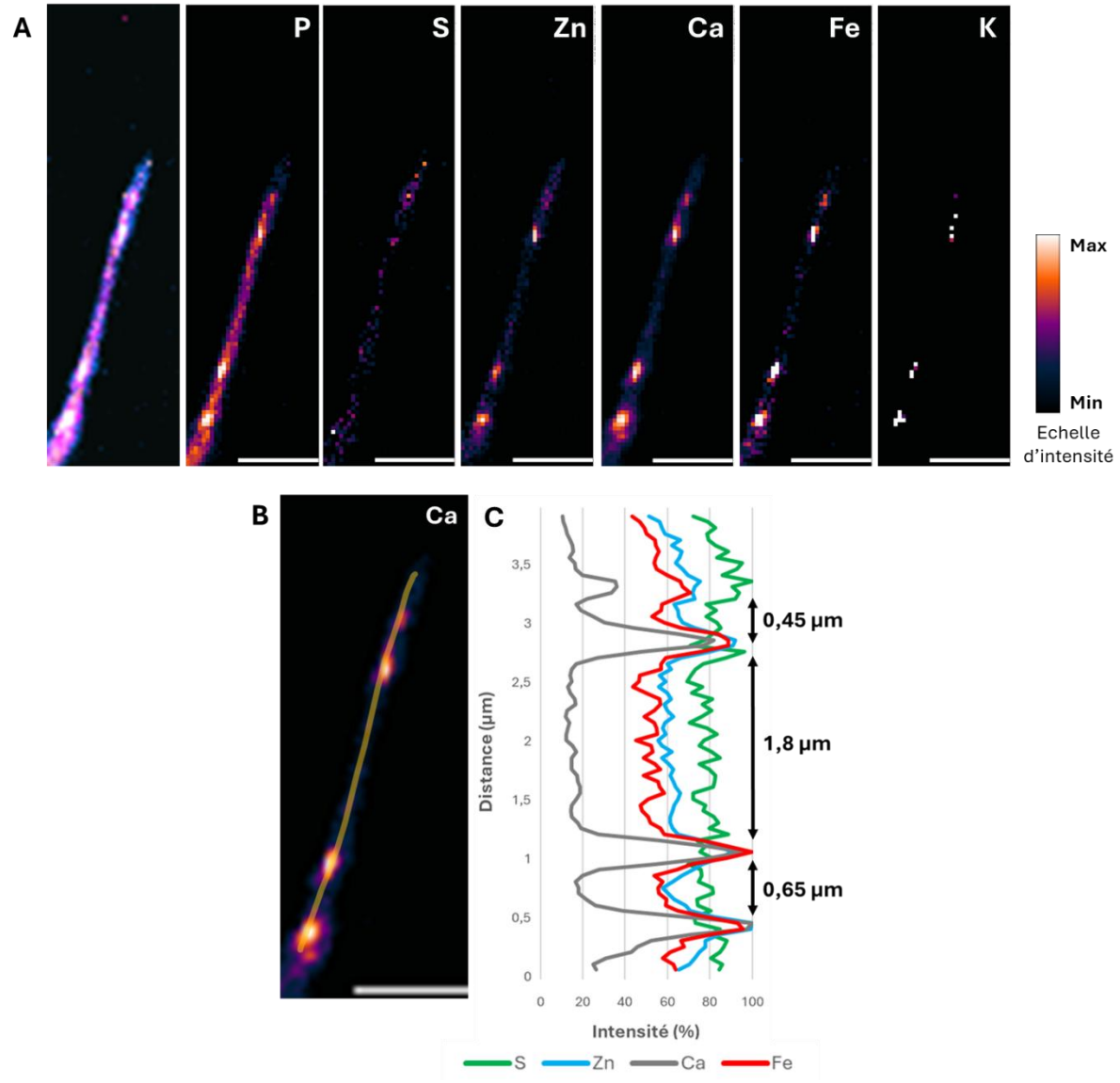


Figure 63 : Images XRF de la répartition des métaux dans un filament d'un synnemata d'A. pretiosum et profils d'intensité des différents éléments (Eau/agar).

(A) La première image correspond à la fusion des autres images. Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 1 µm. (B) Illustration du filament analysé. (C) Profils d'intensité des différents éléments sur le filament choisi.

L'analyse des profils d'intensité démontre effectivement la colocalisation des métaux sur le filament. Plus précisément, en s'intéressant à la distance qui sépare les différents pics d'intensité, ces derniers semblent suivre le même pattern correspondant à la taille des cellules composants le filament (Figure 63B et C).

❖ ***Chez A. mirum***

Chez *A. mirum*, cette répartition régulière est également observable même dans un milieu de culture différent. Une fois encore, le S est homogène sur l'ensemble du filament et les différents métaux sont retrouvés en certains points (Figure 64A).

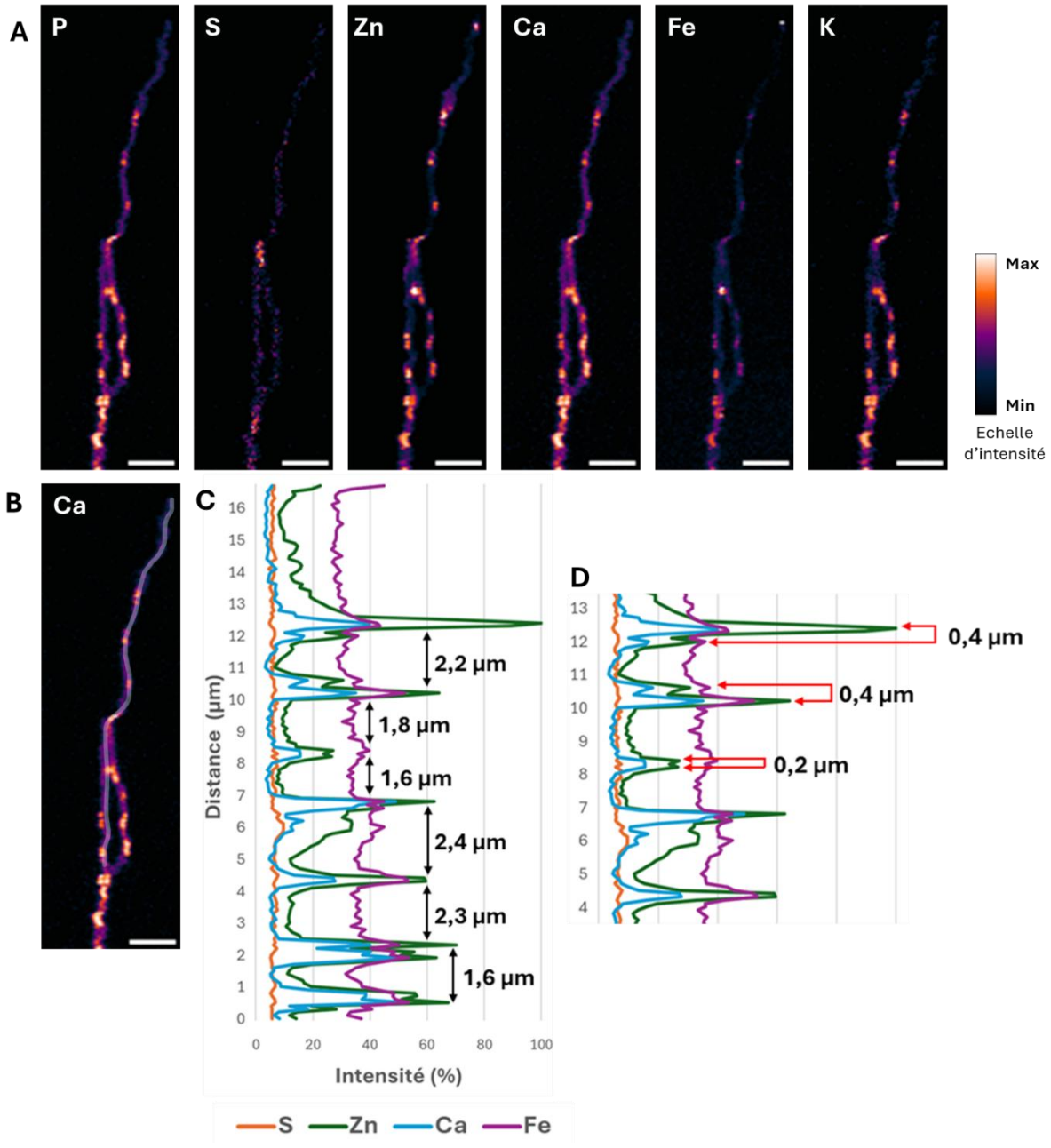


Figure 64 : Images XRF de la répartition des métaux dans un filament d'un synnemata d'A. mirum et profils d'intensité des différents éléments (TSB$^{1/100ème}$).

(A) Les intensités des images sont en échelle logarithmique. Echelle = 2 µm. (B) Illustration du filament analysé. (C et D) Profils d'intensité des différents éléments sur le filament choisi.

L’analyse des profils d’intensité permet également montrer une colocalisation des métaux à intervalle régulier pouvant correspondre à la longueur d’une cellule (Figure 64B et C). Le plus petit intervalle est également retrouvé lui au sein de ce filament avec une variabilité de 0,2 µm (Figure 64D).

Cette variabilité d’intervalle pourrait s’expliquer tout simplement par la variabilité de la taille des cellules. Elle pourrait également être due à la nature tridimensionnelle des synnemata. Les filaments présents au sommet de cette structure peuvent en effet être orientés dans toutes les directions et le faisceau de rayon X peut traverser un filament soit perpendiculairement soit avec un angle variable. Ainsi, l’intervalle entre deux maxima peut apparaitre plus petit alors que la distance réelle entre ces maxima dans deux cellules adjacentes pourrait être régulière. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons déposé des synnemata frais directement sur des membranes compatibles avec des analyses en microscopie électronique. Dans ce cas, les cellules se déposent sur la membrane et la question de l’orientation d’un filament isolé est moins problématique puisque les cellules sont dans l’axe de la membrane (*i.e.* perpendiculaire au faisceau de rayon X). Ces membranes composées de nitrure de silicium (Si_3N_4) sont utilisées en imagerie XRF pour leur transparence aux rayons X, leur faible bruit de fond, leur robustesse et leur adaptabilité à divers environnements expérimentaux. Cela permet d’obtenir des mesures plus précises, surtout dans l'analyse d'échantillons délicats ou de petite taille comme les cellules de bactéries (De Samber et al., 2020).

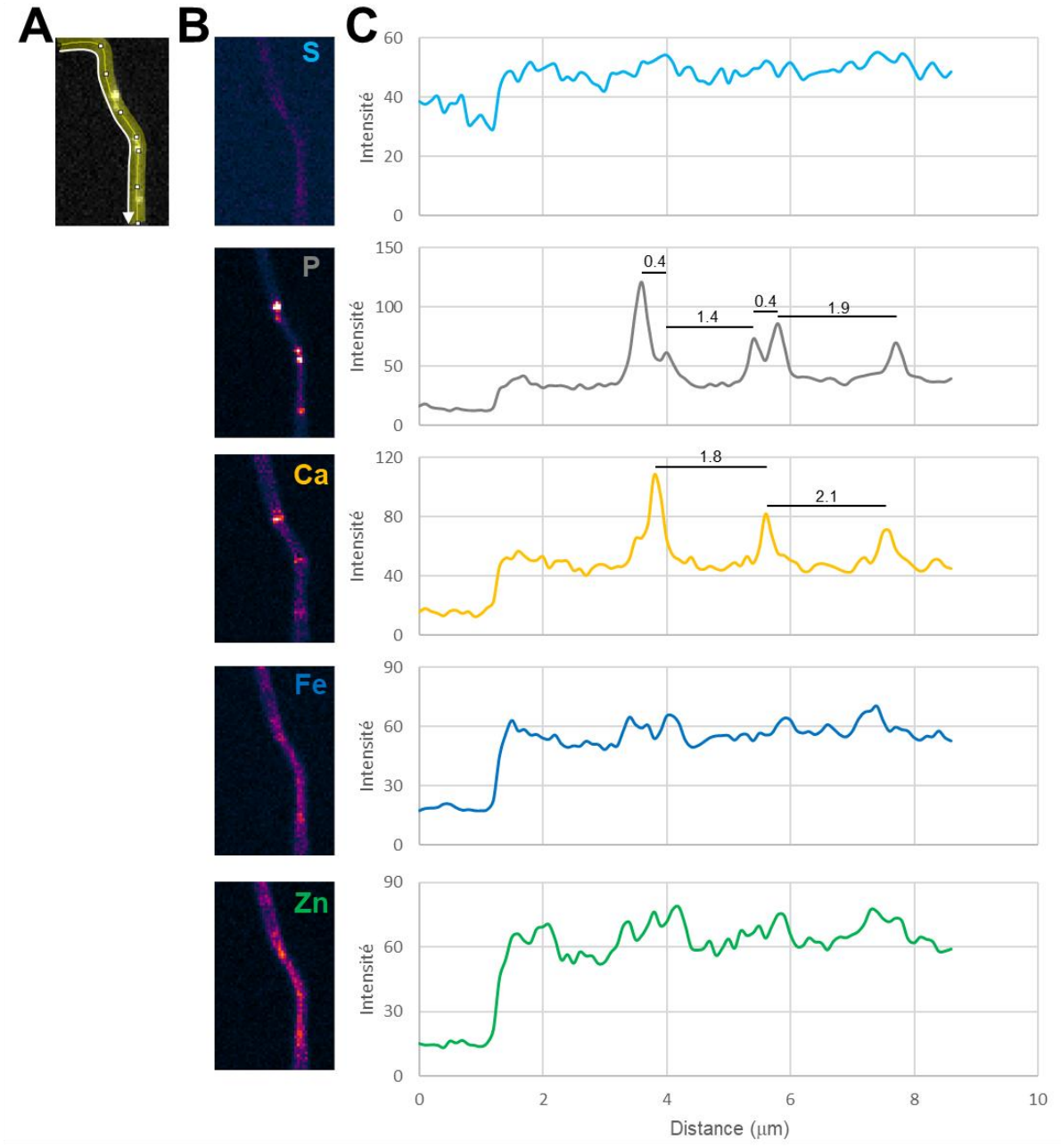


Figure 65 : Filament du mycélium aérien « frais » d'A. mirum (cultivé en eau/agar) déposé sur une membrane, cryogénisé puis lyophilisé et enfin observé par nanoXRF.

(A) Ligne d'analyse de la répartition des éléments. (B) Images correspondant aux éléments indiqués. (C) Profils d'intensité correspondant à la répartition des éléments le long de la ligne d'analyse indiqué en A.

Nous observons alors une répartition des éléments (Figure 65) telle que :

- le signal S semble encore une fois un bon indicateur de la biomasse bactérienne (*i.e.* un signal relativement stable et plus élevé que sur la membrane qui correspond au premier micron le long de la ligne d'analyse),

- le signal P montre clairement une répartition ponctuée avec deux maxima rapprochés (0,4 μm) et séparés par une plus grande distance (1,4 μm),
- le signal Ca suggère la présence de pics séparés d'environ 2 μm, avec éventuellement des épaulement pouvant indiqués la présence de deux maxima rapprochés, bien que pour affirmer cela il aurait fallu une meilleure résolution,
- les signaux correspondant au Fe et Zn sont relativement faibles et difficilement analysables, bien que l'on puisse déceler une augmentation de leur intensité aux endroits où le P et Ca forment des maxima.

L'ensemble de ces observations indique qu'il y a, au moins pour certains éléments comme le P et le Ca, des répartitions qui sont analysées comme des accumulations aux pôles des cellules le long d'un filament unique de mycélium aérien.

Les travaux s'intéressant à la répartition des métaux dans les bactéries sont rares. Une étude a démontré que les métaux se répartissaient de manière plutôt diffuse dans une bactérie comme *E.coli*, avec cependant parfois une accumulation du zinc aux pôles (Victor et al., 2018). Certains travaux effectués sur des bactéries magnétotactiques (Chevrier et al., 2022; Goswami et al., 2022), ou bien les bactéries-câbles (Geerlings et al., 2019) montrent une accumulation de fer le long de lignes bien définies, bien que dans ces cas-là il s'agisse de fer sous forme de magnétite qui s'accumule dans des organelles spécifiques (les magnétosomes des bactéries magnétotactiques) ou bien dans des sortes de câbles le long du périplasmes dans le cas des bactéries-câbles. Néanmoins, il n'existe à notre connaissance aucune étude identifiant la répartition des métaux au sein d'organismes filamenteux. Nos données suggèrent une répartition des métaux au sein d'une bactérie filamenteuse telle qu'ils semblent fortement colocalisés et s'accumulent également aux pôles des cellules du mycélium aérien. Le rôle de cette répartition particulière des métaux chez *A. mirum* ou *A. pretiosum* n'est pas connu et nous en proposerons un après avoir étudié l'expression des gènes impliqués dans le transport des métaux (identification, étude de leur niveau d'expression par protéomique, transcriptomique et fusion transcriptionnelle).

4. Identification de gènes impliqués dans l'acquisition et l'exportation du fer et du zinc

L'analyse de la répartition des métaux par XRF suggère une colocalisation de certains d'entre eux mais elle suggère principalement qu'il y a approximativement autant de métaux au niveau des cellules proches du substrat qu'au sein des cellules présentent aux extrémités du mycélium aérien. Comme décrit dans l'introduction, le fer et le zinc figurent parmi les métaux les plus abondants dans les bactéries. A ce titre, nous nous sommes donc focalisés sur les transporteurs de fer et de zinc, qui pourraient également servir de base de connaissance pour l'étude de la répartition des autres métaux.

Afin de mieux comprendre le partage et le transport de ces éléments depuis le substrat jusqu'aux extrémités des filaments du mycélium aérien, nous avons d'abord entrepris des recherches de gènes sur le génome d'*A. mirum*. Ces recherches ayant été menées en parallèle des conjugaisons bactériennes qui ont fonctionné seulement pour *A. pretiosum*, nous avons dû identifier les homologues de ces gènes chez *A. pretiosum* et vérifier la présence éventuelle d'autres systèmes de transports. Ces recherches ont par ailleurs mis en évidence des divergences entre nos deux souches. Par exemple, seuls deux systèmes ZnuABC seraient présents chez *A. pretiosum* contre trois chez *A. mirum*. De plus, des analyses bio-informatiques nous ont permis de constater que nous possédions une sous-espèce d'*A. pretiosum* (*A. pretiosum subsp. auranticum strain DSM 44131*) dont le génome disponible n'est que partiellement séquencé et annoté, et qui présente des régions non séquencées. En conséquence, il est difficile de prédire avec certitude si l'absence des gènes est due à un séquençage partiel du génome ou tout simplement à leur absence dans le génome de notre souche.

Chez *A. pretiosum*, près de 60 gènes ont été identifiés et codent à la fois des transporteurs d'ions libres et d'ions en complexe avec un métallophore (Tableau 5). Parmi eux, la majorité sont des transporteurs ABC mais on retrouve également des importeurs et des exporteurs métalliques. La plupart des transporteurs présents sont complets, c'est-à-dire qu'ils présentent toute la machinerie nécessaire au bon fonctionnement du mécanisme d'import, avec une SBP, une perméase et une ATPase dans le cas des transporteurs ABC.

En utilisant la base de données NCBI, certains transporteurs présentent des domaines conservés de protéines déjà étudiées chez d'autres espèces. En utilisant cette approche, il est ainsi possible d'avoir une idée sur les fonctions des protéines identifiées dans nos souches sans

pour autant les connaitre avec certitude. Par exemple, pour les transporteurs ABC du fer, trois systèmes sont fréquemment retrouvés : *Ferric Dicitrate Transport System* (Fec), *Ferric Enterobactin Transporter system* (Fep) et *Ferric Hydroxamate Uptake* (Fhu). Les systèmes Fec et Fep sont retrouvés chez les bactéries à Gram-négatif (TonB dépendant) et conservent la machinerie classique des transporteurs ABC (Mahren et al., 2005; Nagy et al., 2013). Le système Fhu quant à lui est retrouvé chez les bactéries à Gram-positif comme *S. aureus* (Speziali et al., 2006). Une étude s'intéressant à l'ATPase FhuC a démontré une forte homologie de séquence avec les ATPases FepC et FecE suggérant la fonction des gènes identifiés dans notre étude sans pour autant affirmer avec certitude le système utilisé par notre souche (Tableau 5 ligne 1, 2, 5, 10, 11 et 16). En revanche, il est probable que notre souche utilise majoritairement des systèmes ABC pour transporter le fer. De plus, le système EfeUOB a été identifié dans le génome d'*A. pretiosum* (Tableau 5 ligne 18) ainsi que le système permettant la synthèse et le transport de la mirubactine, un sidérophore connu chez *Actinosynnema* (Tableau 5 ligne 4) (Giessen et al., 2012). En parallèle, des transporteurs ABC pour le zinc ont aussi été identifiés et présentent une homologie avec le système ZnuABC (Tableau 5 ligne 3 et 9) ainsi l'opéron *cnt* (Tableau 5 ligne 7). Des mécanismes simples d'import/export du zinc ont aussi été identifiés comme un transporteur ZIP, ZupT et un CDF, CzcD. Enfin des ATPases de type-P et un transporteur d'ions sont également identifiés (Tableau 5 ligne 13, 15 et 20). Pour certaines protéines, leur annotation diffère du domaine conservé identifié. Par exemple, les protéines prédites pour être des ATPases de type-P (Tableau 5 ligne 13 et 15) possèdent des domaines conservés de ZntA qui est un CDF. Dans ces cas-là, nous avons décidé de conserver la nomenclature correspondant à la fonction prédite dans les figures suivantes. Pour finir, les différents systèmes identifiés pour le zinc et pour le fer peuvent présenter des affinités pour les deux métaux et permettre leur transport et des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre quels sont les transporteurs majoritairement utilisés par la souche.

	Fonction putatives des opérons	Fonctions putatives des gènes	Domaines conservés	Gènes	Protéines
1	ABC transporteur Fe	Perméase	FhuB	FDV56_RS15610	WP_096491165.1
		SBP	FecB (1)	FDV56_RS15615	WP_096491166.1
		ATPase	FepC (1)	FDV56_RS15620	WP_096491167.1
2	ABC transporteur Fe	Perméase	FepD (1)	FDV56_RS15785	WP_096491193.1
		Perméase	FepG (1)	FDV56_RS15790	WP_232519662.1
		ATPase	FepC (2)	FDV56_RS15795	WP_096491194.1
3	ABC transporteur Zn	SBP	ZnuA (1)/TroA like (1)	FDV56_RS15890	WP_096491211.1
		ATPase	ZnuC (1)	FDV56_RS15895	WP_096491212.1
		Perméase	ZnuB (1)	FDV56_RS15900	WP_096491213.1
4	ABC transporteur Fe	ATPase	FepC (3)	FDV56_RS07625	WP_096493177.1
		Perméase	FepG (2)	FDV56_RS07620	WP_177154382.1
		Perméase	FepD (2)	FDV56_RS07615	WP_096493179.1
		SBP	TroA like (2)	FDV56_RS07610	WP_096493181.1
		Réductase	ViuB	FDV56_RS07605	WP_096493183.1
5	ABC transporteur Fe	SBP	ChuT	FDV56_RS30590	WP_232520162.1
		Perméase	FepD (3)	FDV56_RS36855	WP_232519833.1
		ATPase	/	NO	NO
6	Fe	Transporteur NRAMP	NRAMP	FDV56_RS25285	WP_096493940.1
7	ABC transporteur Zn	Méthyltransferase	CntT	FDV56_RS01320	WP_096495060.1
		ATPase	CntR	FDV56_RS01325	WP_096495061.1
		Perméase	CntQ	FDV56_RS01330	WP_096495062.1
		SBP	CntP	FDV56_RS01335	WP_157767733.1
		MFS transporteur	CntE	FDV56_RS01340	WP_096495064.1
		Staphylopine	CntM	FDV56_RS01345	WP_096495065.1
		NAS-like	CntL	FDV56_RS01350	WP_096495066.1
		Histidine racémase	CntK	FDV56_RS01355	WP_096495067.1
		Protéine hypothétique	/	FDV56_RS01360	WP_096495068.1
8	ABC transporteur Zn	Perméase	/	NO	NO
		ATPase	/	NO	NO
		SBP	/	NO	NO
9	ABC transporteur Zn	SBP	ZnuA (3)	FDV56_RS05380	WP_096495735.1
		Protéine hypothétique	/	FDV56_RS05385	WP_232519975.1
		ATPase	ZnuC (3)	FDV56_RS05390	WP_096495737.1
		Perméase	ZnuB (3)	FDV56_RS05395	WP_096495738.1
10	ABC transporteur Fe	ATPase	FepC (4)	FDV56_RS05925	WP_096495823.1
		Perméase	FepG (3)	FDV56_RS05930	WP_096495824.1
		Perméase	FepD (4)	FDV56_RS05935	WP_096495825.1
		SBP	FecB (2)	FDV56_RS05940	WP_177154336.1
11	ABC transporteur Fe	ATPase	FepC (5)	FDV56_RS06600	WP_096495934.1
		Perméase	FepG (4)	FDV56_RS06605	WP_096495935.1
		Perméase	FepD (5)	FDV56_RS06610	WP_232519997.1
12	Exporteur Zn	CDF	CzcD	FDV56_RS14255	WP_096498082.1
13	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	ZntA (1)	FDV56_RS22415	WP_096497278.1
14	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	HAD like	FDV56_RS03100	WP_096495367.1
15	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	ZntA (2)	FDV56_RS07405	WP_096493253.1
16	ABC transporteur Fe	ATPase	FepC (6)	FDV56_RS03150	WP_096495376.1
		Perméase	FepG (5)	FDV56_RS03155	WP_198320524.1
		Perméase	FepD (6)	FDV56_RS03160	WP_096495377.1
		SBP	FhuD	FDV56_RS03165	WP_096495378.1
17	Importeur Zn	Transporteur ZIP	ZupT	FDV56_RS25020	WP_096497805.1
18	ABC transporteur Fe	Perméase	EfeU	FDV56_RS03115	WP_096495369.1
		SBP	EfeO	FDV56_RS03120	WP_096495370.1
		Oxydase	EfeB	FDV56_RS03125	WP_232519940.1
19	Sodium/K/Ca	Transporteur d'ions	Transporteur d'ions	FDV56_RS09080	WP_096492913.1
20	Exporteur de Fe/Zn/Co	CDF	/	NO	NO
21	ABC transporteur Fe	SBP	TroA like (3)	FDV56_RS05450	WP_096495748.1
		ATPase	FepC (7)	FDV56_RS05455	WP_177154367.1
		Perméase	FepD (7)	FDV56_RS05460	WP_096495750.1

Tableau 5 : Gènes putatifs impliqués dans le transport du fer et du zinc chez A. pretiosum.

CDF : Cation Diffusion Facilitator ; SBP : Substrate Binding Protein ; NO : Non trouvé.

Certains opérons présentent même des particularités, comme c'est le cas de l'opéron codant pour le transporteur ZnuABC 3. Ce cluster possède un gène codant pour une ATPase, une perméase, une SBP ainsi qu'une protéine de fonction inconnue. Plus particulièrement, la SBP de ZnuABC3 possède en son centre une insertion d'une séquence originale codant une centaine d'acide aminé non retrouvée chez la SBP de ZnuABC1 (Figure 66).

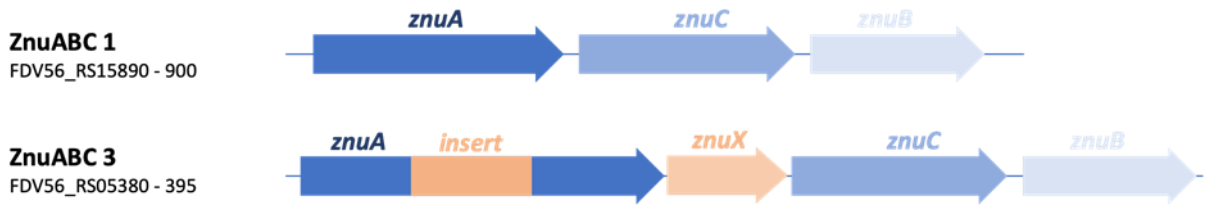


Figure 66 : Schéma des différents clusters codant pour des transporteurs ABC de type ZnuABC.
znuA code une SBP, znuB code une perméase, znuC code une ATPase, znuX code une protéine putative extracellulaire.

Une prédiction de structure en utilisant AlphaFold indique un repliement sans équivalent dans les structures expérimentales et qui pourrait être décrit comme un triple feuillet béta. Pour parfaire l'originalité de ce transporteur putatif, cette SBP « originale » est suivie par un gène (appelé *znuX*) codant une protéine extracellulaire de fonction inconnue, mais dont une prédiction AlphaFold de la structure indique un repliement homologue au domaine inséré dans la SBP (triple feuillet béta) (Figure 67).

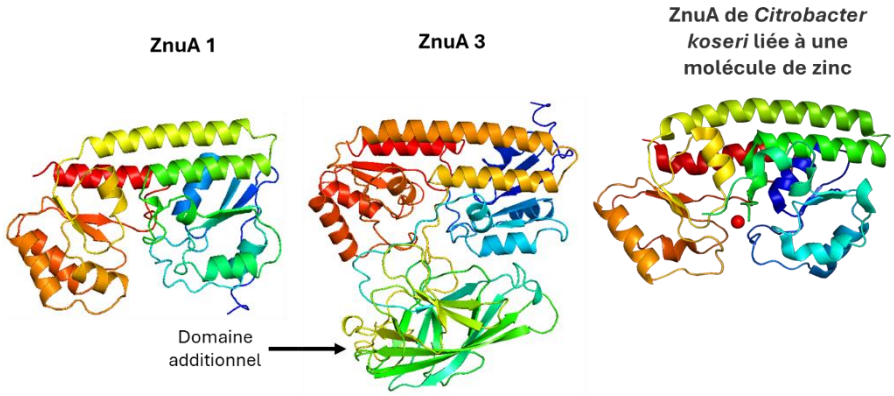


Figure 67 : Prédiction de la structure tridimensionnelle des ZnuA.

Cependant, la superposition de ces deux modèles structuraux indique que les N- et C-terminus ne sont pas placés aux mêmes endroits, ce qui explique pourquoi ces séquences n'ont pas d'homologie entre elles et ne forment donc pas une famille bien identifiée. Pour finir, toujours en utilisant AlphaFold, une prédiction du complexe entre cette SBP originale et la

protéine hypothétique suivante (ZnuA3-ZnuX), indique avec une forte probabilité la formation d'un tel complexe (Figure 68). La fonction d'un tel complexe, s'il existe, n'est pas connue.

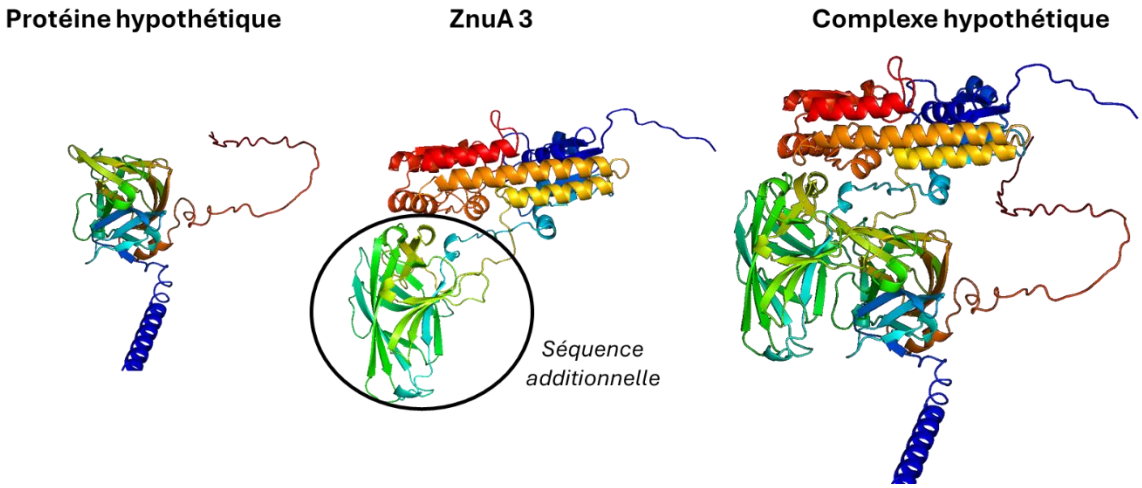


Figure 68 : Prédiction de l'interaction entre la protéine hypothétique ZnuX et la séquence additionnelle de la SBP ZnuA 3.

En dehors de cette redondance observée pour les systèmes ZnuABC, d'autres systèmes de transport du zinc s'ajoutent à ces derniers afin d'optimiser au maximum l'homéostasie du zinc. Pour le fer, on retrouve également cette diversité de transporteurs allant des systèmes à plusieurs composants aux protéines transmembranaires de transport.

5. Etude de l'expression de gènes impliqués dans l'import/export du fer et du zinc

Dans cette partie, nous sommes intéressés à l'homéostasie du fer et du zinc chez A. pretiosum. Dans cette optique, nous avons étudié l'expression de trois types d'opérons codant pour des protéines impliquées dans l'import du zinc et du fer : *znu1* et *znu3* qui régule le transport du zinc non chélaté et l'opéron *cnt* qui régule à la fois l'homéostasie du fer et du zinc. Notre choix s'est porté sur l'expression de *znu1* et *znu3* car le premier est un transporteur ABC « classique » alors que *znu3* présente une originalité de séquence. De l'autre côté, *cnt* représente un transporteur de zinc chélaté et de fer (ici probablement la staphylopine, bien qu'un gène codant pour une méthyltransférase pourrait indiquer une forme méthylée de cette dernière). Dans tous les cas, toutes les études antérieures sur ces systèmes indiquent qu'ils sont induits par une carence en zinc et/ou en fer en fonction du système.

5.1. Rappels sur les opérons *cnt* et *znu*

L'opéron *cnt* a été largement étudié au sein d'autres organismes comme *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis* ou encore chez *Y. pestis* (Ghssein et al., 2016; Laffont et al., 2019; Laffont and Arnoux, 2020; Lhospice et al., 2017; McFarlane et al., 2018; Zhang et al., 2019). Bien qu'il existe une diversité génétique parmi ces différents opérons, ils sont tous induits en carence de zinc et/ou de fer (Fillat, 2014; Fojcik et al., 2018; Lee and Helmann, 2007; Lhospice et al., 2017).

Chez *S. aureus*, l'opéron *cnt* est régulé par la présence de zinc et de fer associés aux systèmes Fur et Zur, appartenant à la famille FUR. Cette famille comprend les régulateurs Fur (Ferric uptake regulator), Zur (Zinc uptake regulator), Mur (Manganese uptake regulator) et Nur (Nickel uptake regulator) avec chacun une spécificité qui leur est propre. Fur et Zur sont des protéines métallo-régulatrices qui une fois liées à un ion métallique changent de conformation et favorisent la dissociation ou la fixation du régulateur sur les régions promotrices de l'ADN régulant l'expression des gènes en aval (Fillat, 2014; Lee and Helmann, 2007). Ces régulateurs peuvent être des répresseurs, auquel cas ils répriment l'expression des gènes qu'ils régulent lorsque la concentration en métal est suffisante, ou alors des activateurs lorsque la concentration en métal est insuffisante (Ding et al., 2012; Grim et al., 2017; Remy et al., 2013). Chez *S. aureus*, la régulation par Fur et Zur se fait à deux niveaux dans les régions promotrices présentes dans l'opéron. Le premier groupe de gènes de biosynthèse de la staphylopine est exprimé sous le contrôle d'une boite Fur suivie d'une boite Zur tandis que le groupe de gènes de la voie de transport est sous le contrôle d'une boite Fur superposée à une boîte Zur (Fojcik et al., 2018). L'expression des deux groupes de gènes est réprimée par la fixation de Fur ou Zur lors de la présence de fer ou de zinc, avec un effet strict sur les gènes de biosynthèse (une faible concentration en fer ou en zinc suffisent à réprimer ces gènes) et un effet coopératif sur les gènes de transport (fer et zinc sont nécessaires pour réprimer ces gènes).

Chez *P. aeruginosa*, seule une boîte Zur est présente en amont du gène *cntO* de l'opéron *cnt* (Lhospice et al., 2017) et la régulation de cet opéron est dépendante du niveau de zinc. Comme chez *S. aureus*, une carence en zinc induit l'expression de l'opéron *cnt*. La yersinopine, quant à elle, n'aurait pas la même fonction chez *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis.* Les deux opérons sont sous le contrôle de Zur mais chez *Y. pseudotuberculosis* l'opéron *cnt* semble responsable de l'import de fer alors qu'il est responsable de l'import de zinc chez *Y. pestis*.

Les transporteurs de type ZnuABC/AdcABC sont également largement étudiés car ils présentent une importance capitale pour l'acquisition du zinc lors d'infection bactéries/pathogènes. Ces transporteurs sont connus pour être induits lors d'une carence en zinc chez diverses bactéries à Gram-négatif comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* (Chaoprasid et al., 2016; Ducret et al., 2023; Patzer and Hantke, 1998; Perry et al., 2015). Il en va de même pour les bactéries à Gram-positif comme *S. aureus* ou des bactéries du genre *Streptococcus* ou *Enterococcus* (Grim et al., 2017; Lam et al., 2022; Loisel et al., 2008; Plumptre et al., 2014). En effet, chez *A. tumefaciens* et *S. aureus*, des expériences ont montré que l'expression des différents opérons *znuABC* et *adcABC* étaient augmentées lorsque les cellules étaient cultivées en carence de zinc (Bhubhanil et al., 2014; Grim et al., 2017; Lam et al., 2022).

De ce fait, l'utilisation de rapporteurs en aval de ces promoteurs devrait donc nous renseigner sur l'activité de ces derniers dans un environnement carencé.

5.2. Etude de l'expression d'une GFP fonctionnelle chez *A. pretiosum* sous le contrôle d'un promoteur constitutif

Dans un premier temps nous avons voulu vérifier l'expression fonctionnelle de la protéine fluorescente dans notre modèle d'étude grâce à une fusion avec un promoteur constitutif. Par la suite, nous avons réalisé des fusions transcriptionnelles entre cette protéine et les promoteurs cibles. Enfin, par le biais de la microscopie confocale, nous avons analysé la production de la protéine fluorescente au sein de nos synnemata mais également dans des cultures liquides, en milieu riche ou en milieu chélaté.

Tout d'abord, par le biais d'une recherche bibliographique, nous avons identifié les vecteurs nécessaires pour les transformations. Nous avons trouvé deux vecteurs intégratifs, pTMW018 (Ito et al., 2009) (Figure 69) et pTMN002 (Asamizu et al., 2013), ainsi que le vecteur pIB139 (Fan et al., 2016b). Les deux vecteurs intégratifs nous ont été envoyés par Taifo Mahmud, professeur à la faculté de pharmacie de l'université d'État de l'Oregon. Et le vecteur pIB139 a été commandé chez LifeScienceMarket.

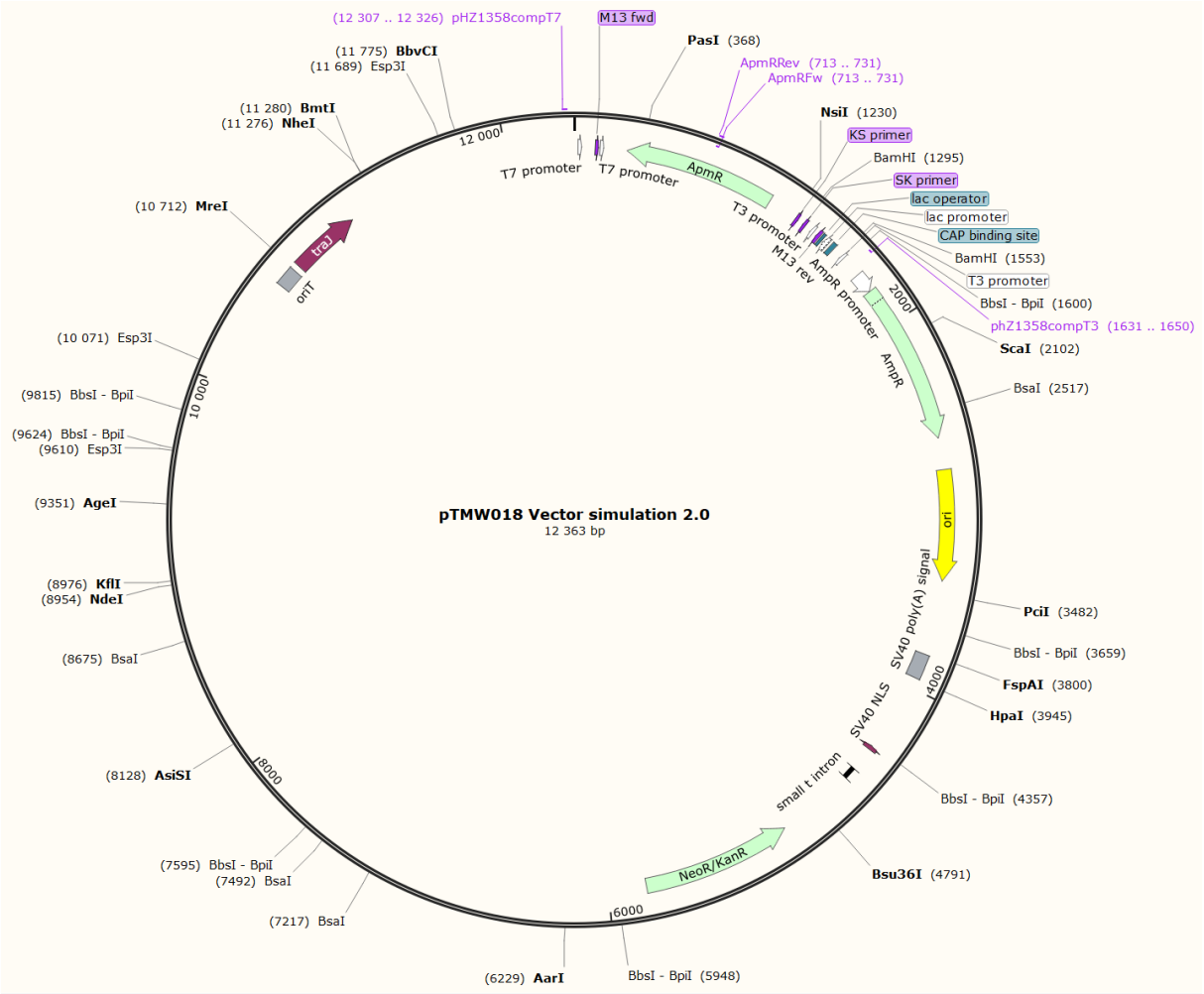


Figure 69 : Carte du plasmide pTMW018 avec les différents sites de restrictions et gènes de résistance.

Les séquences n'étant pas entièrement disponibles, nous avons d'abord dû effectuer un travail de caractérisation des plasmides. Pour ce faire, plusieurs digestions avec différentes enzymes de restriction (XbaI, NdeI, BamHI, NotI et HindIII) ont été effectuées. Pour vérifier et confirmer la présence d'un site de clonage multiple (MCS) et du gène codant pour la résistance à l'apramycine (gène essentiel pour la sélection des transformants), il a été nécessaire de faire séquencer plusieurs régions des vecteurs *via* Eurofins Genomics. Cela a permis d'obtenir la carte des vecteurs et la liste des différents sites de restriction afin d'établir une stratégie pour nos constructions. La sélection des conjugants a été possible grâce à la présence, dans les vecteurs utilisés, d'un gène de résistance à un antibiotique, l'apramycine. De plus, les Actinosynnema sont naturellement résistantes à l'acide nalidixique. Cet antibiotique a servi lors des conjugaisons a éliminer la souche donneuse.

Ensuite, nous avons choisi une protéine fluorescente qui servirait de gène rapporteur pour les fusions transcriptionnelles. Dans la littérature, aucun article ne présente de transformation d'*Actinosynnema* pour les rendre fluorescente. Il a donc été nécessaire de trouver une protéine fluorescente théoriquement fonctionnelle dans les modèles. La mNeonGreen a été choisie car elle est présentée comme étant monomérique, plus lumineuse et plus stable que la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Stockmar et al., 2018; Tanida-Miyake et al., 2018). Elle serait également moins sensible à une perte de fluorescence (*photobleaching*) et conviendrait davantage à la microscopie confocale et à la microscopie à super résolution, en particulier lorsque l'on étudie des protéines de fusion qui sont exprimées à de faibles niveaux. La mNeonGreen est une protéine fluorescente monomérique de 26.6 kDa provenant de *Branchiostoma lanceolatum*. Elle a une longueur d'onde d'excitation à 506 nm et une longueur d'onde d'émission à 517 nm (Figure 70).

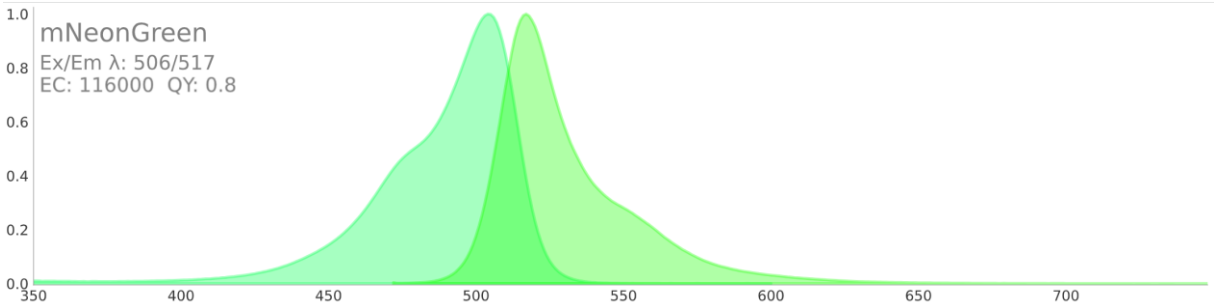


Figure 70 : Spectre d'émission et d'excitation de la mNeonGreen.

Pour nos expériences, la séquence de la mNeonGreen a été optimisée afin d'être traduite efficacement (optimisation des codons) par les *Actinosynnema (*Annexe 5*).* Afin de faciliter les remaniements et les clonages, un fragment d'ADN a été synthétisé et commandé à Genewiz. Il comprend la séquence de la mNeonGreen précédée de la séquence du promoteur constitutif du gène codant la résistance à l'érythromycine (*ermEp*). De part et d'autre de la séquence du promoteur et de la mNeonGreen ont été ajoutés 300 paires de bases homologues à une région de l'ADN chromosomique. Ces régions homologues sont essentielles pour l'intégration du vecteur dans l'ADN chromosomique et elles ont été choisies de telle sorte à ce que l'intégration n'ait pas d'effet polaire. Ainsi, elle doit se faire après un codon stop d'un groupe de gènes transcrits en 5'-3' et avant un codon stop d'un groupe de gènes antisens. Des sites de restriction ont également été insérés pour modifier facilement les vecteurs. Des sites BamHI aux extrémités du fragment synthétisé et intégré, XbaI en amont de la séquence du promoteur, NdeI

et XbaI en amont et en aval de la séquence de la mNeonGreen. Le fragment a été cloné par BamHI dans le pTMW018 donnant ainsi le pMDV01.

Au laboratoire, nous avons construit le vecteur pIB139ermEpmNG. Dans nos construction, si le site de restriction XbaI (séquence TCTAGA) chevauche un site méthylé (GATC) et cette méthylation bloque la reconnaissance de XbaI ainsi que son activité. Le vecteur méthylé n'est alors pas digéré. Pour pallier ce problème, nous avons dû transformer des bactéries *E. coli dam-* avec le vecteur pMDV01 afin d'obtenir des plasmides non méthylés. De ces vecteurs pMDV01 ont été récupérés par digestion enzymatique XbaI et NdeI, le gène codant la mNeonGreen puis ce dernier a été sous-cloné dans le plasmide pIB139 qui possède déjà le promoteur *ermEp*. Ce promoteur est celui du gène codant la résistance à l'érythromycine, il est exprimé de manière constitutive chez les *Streptomyces* et utilisé chez *A. pretiosum* (Wilkinson et al., 2002). Ces deux vecteurs (pIB139ermEpmNG et pMDV01) ont été transformés dans les *E. coli pET12567/pUZ8002* qui était la souche donneuse lors des étapes de conjugaison. Elle possède en effet toute la machinerie nécessaire pour fixer et transmettre le vecteur à notre souche modèle.

Malgré l'obtention d'un protocole détaillé et fourni par le professeur Linquan Bai, chercheur au laboratoire de métabolisme microbien à Shangaï, la conjugaison bactérienne n'a pas été évidente et a nécessité de nombreuses mises au point. En effet, les bactéries se développent sous forme filamentaire en culture liquide et la densité optique est donc difficile à évaluer. Il a alors fallu tester plusieurs concentrations bactériennes plus ou moins âgées. Les transformations ont été également testées avec *A. mirum* mais n'ont réussies qu'en utilisant *A. pretiosum*.

5.2.1. Vecteur pIB139

Pour vérifier que la mNeonGreen était fonctionnelle dans nos bactéries, nous avons d'abord testé la production de la protéine fluorescente avec le vecteur pIB139 pour construire : pIB139ermEpmNG. Le plasmide pIB139 est un vecteur utilisé pour la manipulation génétique, en particulier dans le domaine des Actinobacteria, comme les *Streptomycètes*. Ce plasmide est utilisé ici pour le transfert entre des souches *d'E. coli* et les *Actinosynnema*. Il contient une région intégrative spécifique qui permet son insertion dans le génome de l'hôte cible via des mécanismes de recombinaison spécifiques (gène de l'intégrase du phage φC31 ainsi que son

site *attP*). C'est donc un vecteur permettant une intégration spécifique de site dans les génomes de la plupart des *Actinomycètes* possédant le site *attB* nécessaire à l'intégration du plasmide.

Le gène codant la mNeonGreen est donc sous le contrôle du promoteur *ermEp*.

A. pretiosum a été mise en culture en milieu LB et en milieu eau/agar pour la souche WT et additionnés en apramycine à 50mg/mL pour les transformants. La fluorescence des bactéries WT et transformées a été analysée directement en liquide grâce à un fluorimètre cary (Figure 71).

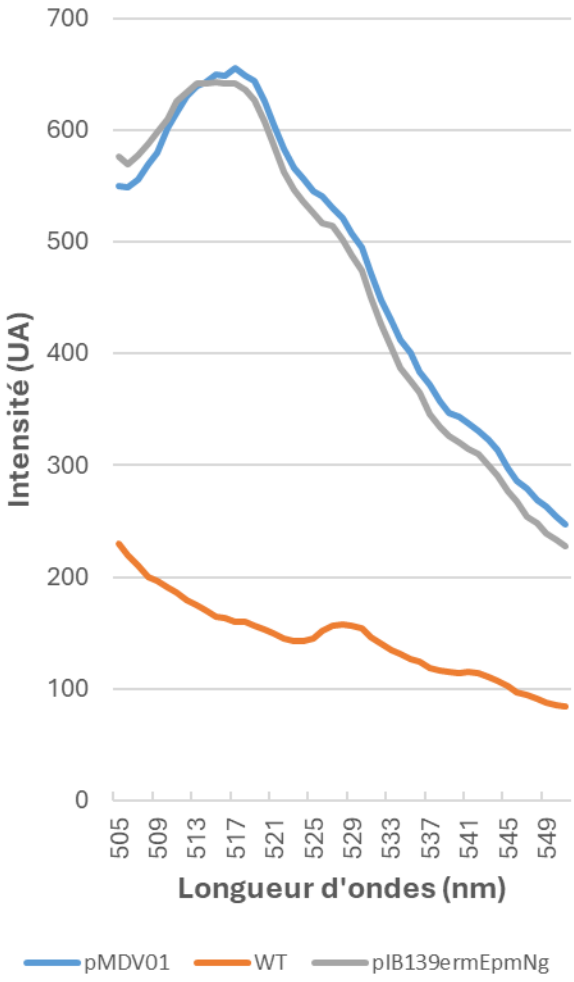


Figure 71 : Intensité de fluorescence sur des cultures d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformé avec les plasmides pIB139ermEpmNG et pMDV01 en milieu LB solide.
Intensité en unité arbitraire (U.A). Longueur d'ondes d'émission de la mNeonGreen : 517 nm.

Cette expérience a aussi confirmé que le transformant avait bel et bien intégré le vecteur puisque la croissance des bactéries sur le milieu additionné en antibiotique indiquait la présence du gène de résistance à l'antibiotique (apporté par le vecteur). De plus la présence d'un pic de

fluorescence à 517 nm confirme bien la présence de la mNeonGreen et donc son expression au sein des bactéries transformées. Pour valider son expression dans les transformants, nous avons utilisé le microscope confocal pour détecter la fluorescence sur des cultures en milieu riche (Figure 72) et sur les synnemata en milieu pauvre (Figure 73). La souche WT présente une faible auto-fluorescence mais si on la compare à la fluorescence du transformant elle est négligeable.

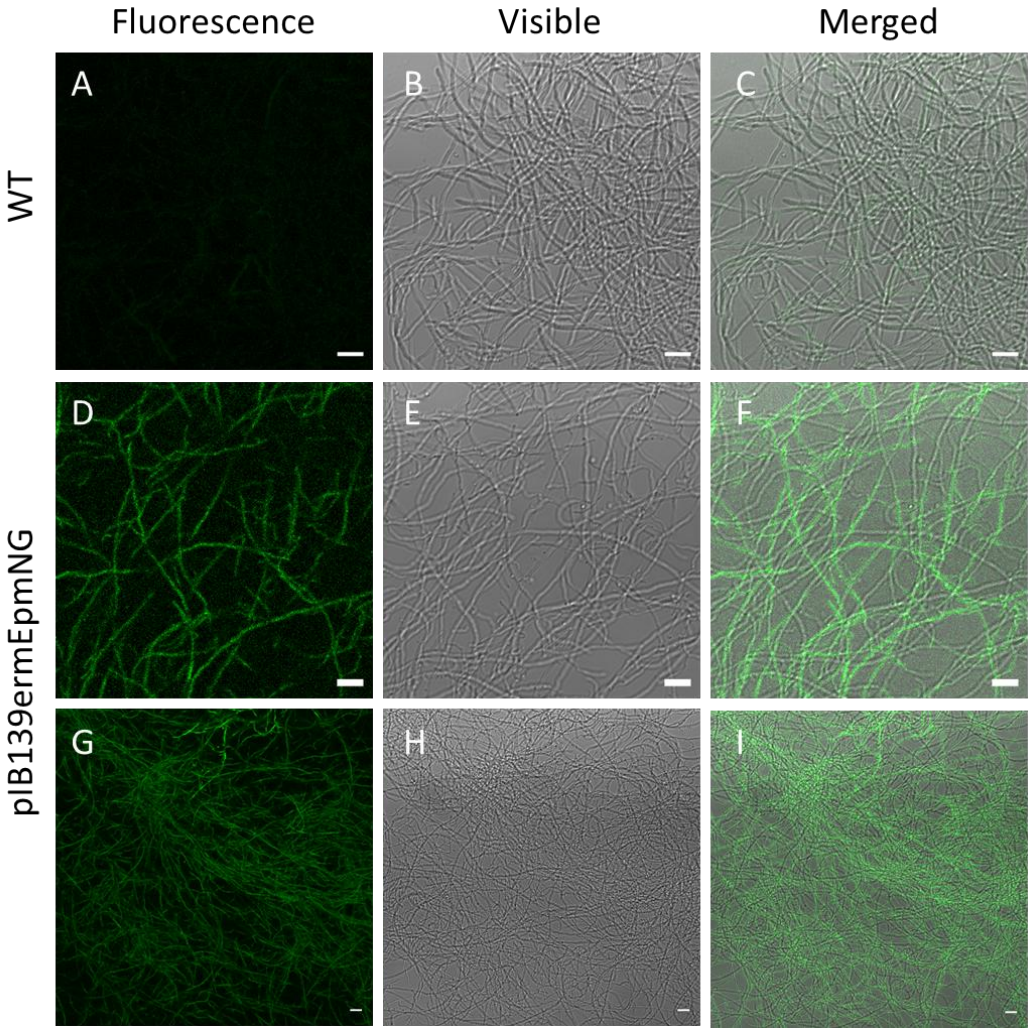


Figure 72 : Images au microscope confocal des cultures bactériennes d'A. pretiosum.
Les souches WT (A, B et C) et transformées pIB139ermEpmNG (D, E, F, G, H et I) ont été cultivées en milieu LB liquide à 30°C pendant 5 jours. Excitation à 504 nm. Grossissement x63. Echelle : 5 µm.

Pour les synnemata, on observe une forte fluorescence au niveau du tronc mais aussi au niveau des extrémités des filaments (Figure 73). Malgré la résolution et les capacités de ce microscope confocal, l'épaisseur et la densité de nos synnemata ne nous permettaient pas

d'analyser les coupes intérieures d'où cette impression de coiffe qui ne fluorescence pas mais cela dépend de la mise au point et de la taille du synnemata.

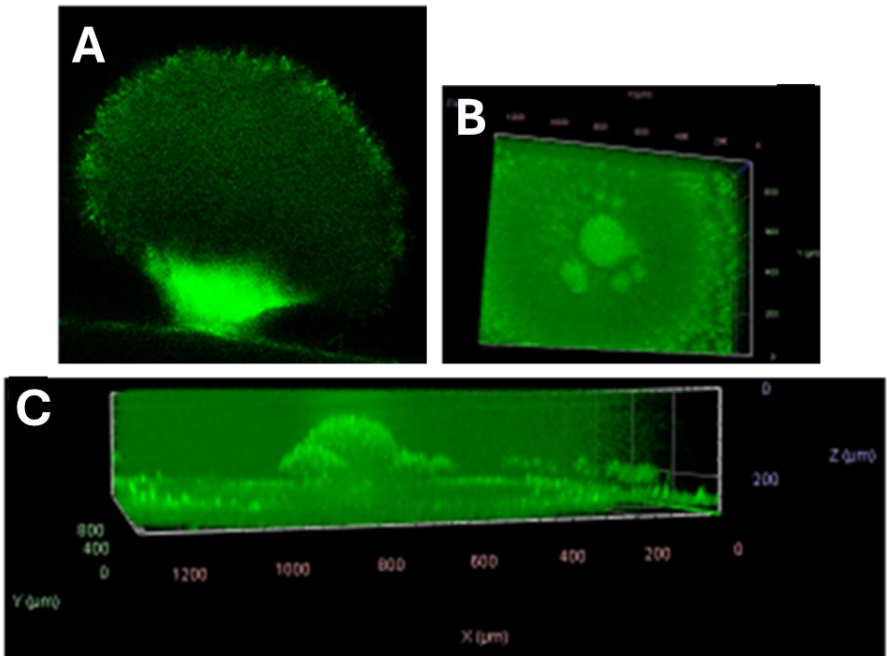


Figure 73 : Observation à l'Axio Zoom de synnemata de culture d'A. pretiosum transformé avec le plasmide pIB139ermEpmNG cultivés sur milieu solide pauvre

5.2.2. Vecteur pMDV01

Le protocole de conjugaison et la mNeonGreen fonctionnant sur *A. pretiosum*, nous avons effectué la même expérience avec le vecteur intégratif pMDV01. Il a été construit de manière à venir s'intégrer dans une région où il ne devrait pas engendrer d'effet polaire à la fin du gène CNX65_RS25825 (Figure 74).

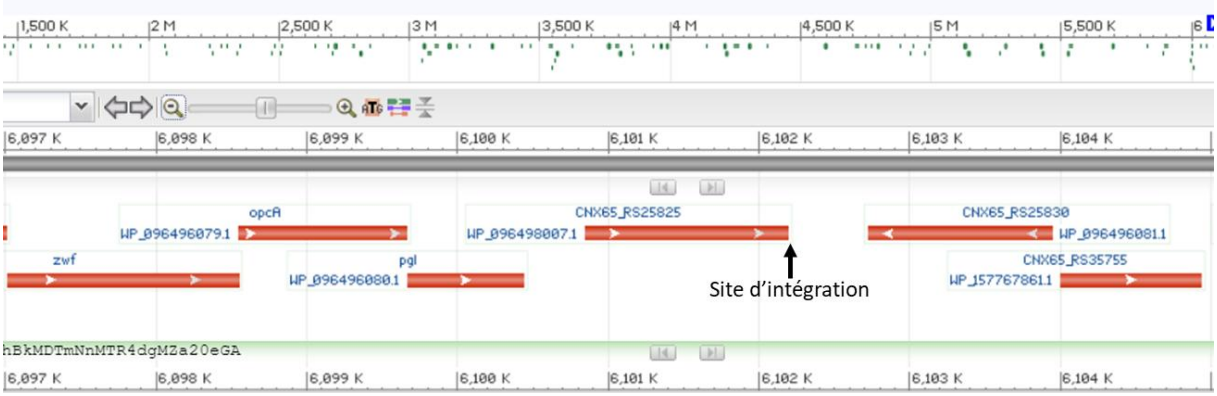


Figure 74 : Site d'intégration pour la recombinaison homologue et séquence intégrée.
Image obtenue sur NCBI illustrant la partie du génome où se situe le site d'intégration choisi pour la recombinaison homologue chez A. pretiosum.

De la même manière que pour les transformants du vecteur pIB139ermEpmNG, les transformants pMDV01 ont été analysés au fluorimètre cary. Ici aussi un pic de fluorescence à 517 nm est observé confirmant ainsi l'intégration du vecteur dans le chromosome de la bactérie (Figure 71). Les deux souches *A. pretiosum pIB139ermEpmNG* et *A. pretiosum pMDV01* expriment de la même manière la mNeonGreen puisque les pics de fluorescence sont tous les deux à la même intensité de fluorescence (environ 650 U.A). La fluorescence est également détectée au microscope confocal pour *A. pretiosum pMDV01* et ce avec la même intensité que pour le premier transformant (Figure 75). Nous confirmons donc que le vecteur intégratif choisi est fonctionnel dans nos souches et que son intégration est possible.

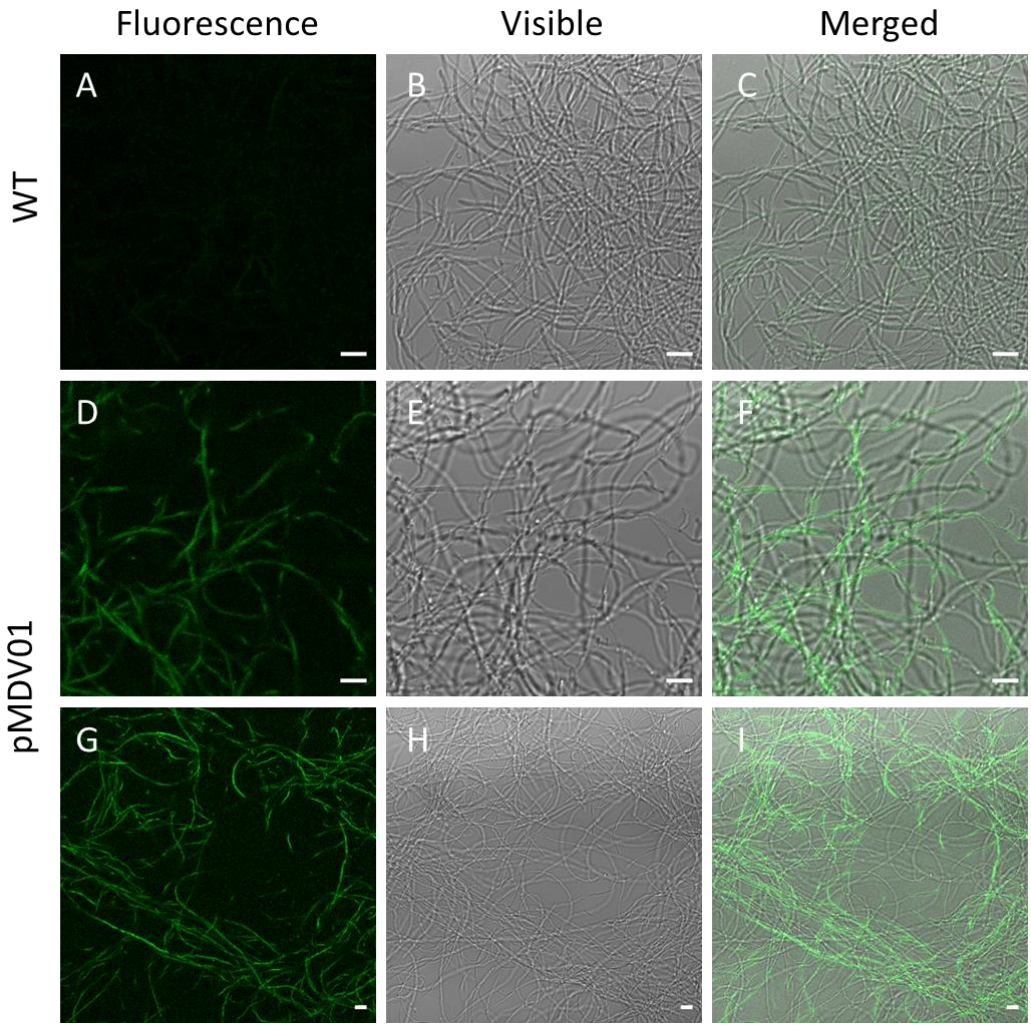


Figure 75 : Images de microscopie confocal sur des cultures bactéries et des synnemata d'A. pretiosum WT et transformant.

Les souches WT (A, B et C) et transformées pMDV01 (D, E, F, G, H et I) ont été cultivées en milieu LB liquide à 30°C pendant 5 jours. Excitation à 504 nm. Grossissement x63. Echelle : 5 µm.

Ces images nous permettent de confirmer que la mNeonGreen optimisée est correctement exprimée et fonctionnelle dans notre modèle d'étude aussi bien dans les cellules cultivées en milieu riche que dans les synnemata. En revanche, il est important de noter qu'avec les transformants pMDV01, nous n'arrivons pas à obtenir de synnemata dans les différentes conditions de culture que nous avons testées. Plusieurs essais ont été effectués avec des cultures différentes (fraiches et cryotubes), avec des milieux différents (liquide/solide ; pauvre/riche) et aucune des conditions testées n'a permis l'obtention de synnemata avec ces transformants.

5.3. Etude de fusions transcriptionnelles entre des promoteurs d'opérons putatifs et la mNeonGreen

Les expériences précédentes ont prouvé que la mNeonGreen ainsi que nos deux vecteurs (pIB139ermEpmNG et pMDV01) étaient fonctionnels dans notre modèle. Les constructions faites, nous avons ensuite voulu identifier les niveaux d'expression des trois opérons codant pour des gènes impliqués dans l'import du zinc/fer chélaté (opérons *cnt*) et du zinc libre (*znu1* et *znu3*). Par ailleurs, la comparaison entre l'opéron original *znu3* et l'opéron « classique » *znu1* permettrait de savoir si ce système est exprimé ou non.

Plusieurs tentatives de clonages ont été nécessaires pour identifier les régions promotrices de l'opéron *cnt*. Une première tentative de clonage avec la séquence de 500 pb en amont du gène *cntK* a été réalisée (Figure 76 région A). Des analyses plus approfondies nous ont poussés à rallonger la séquence promotrice et à prendre les 856 acides aminés en amont du gène *cntK* (Figure 76 région B ; induisant l'insertion d'un gène putatif codant pour une protéine hypothétique) pour les cloner en amont de la mNeonGreen. En effet, des analyses de cette séquence (B) ont prédit la présence d'un promoteur en amont du +1 de transcription avec des boites -35 et -10 suggérant une région promotrice complète alors que la région A présentait un promoteur putatif mal placé pour une bonne transcription.

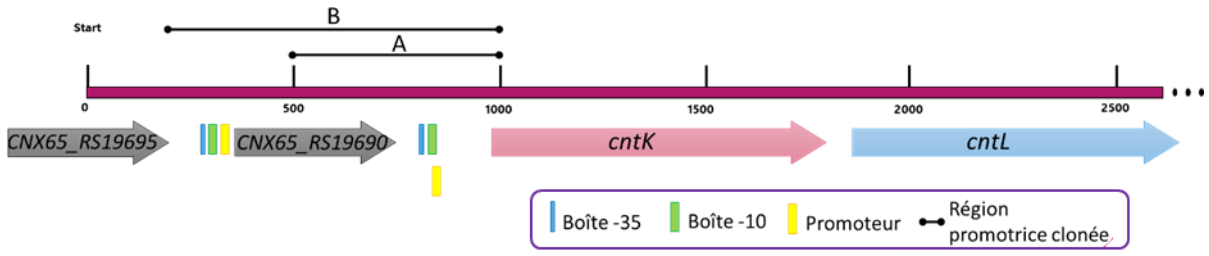


Figure 76 : Organisation de la région promotrice de l'opéron cnt chez A. pretiosum.

Les fragments de 500 pb en amont des gènes codant les protéines ZnuA ont été amplifiés et clonés en amont du gène codant pour la mNeonGreen. Les clonages ont été effectués dans le pIB139, vecteur non intégratif. Comme pour les expériences précédentes, la fluorescence des transformants a été analysée au fluorimètre en prenant comme contrôle négatif la souche WT et comme contrôle positif le transformant pIB139ermEpmNG. L'analyse de fluorescence a été effectuée dans différentes conditions de culture (milieu riche/pauvre, liquide/solide) afin de tester la production de la protéine fluorescente dans les transformants. Que ce soit en milieu LB (riche) liquide ou solide, aucun pic n'est détecté pour la souche WT et un pic significatif est détecté chez le contrôle positif pIB139ermEpmNG, confirmant la validité de nos contrôles. Concernant les trois souches transformées, aucun pic n'est détecté à 517 nm suggérant que la protéine de fluorescence n'est pas produite au sein de ces bactéries en milieu riche (Figure 77).

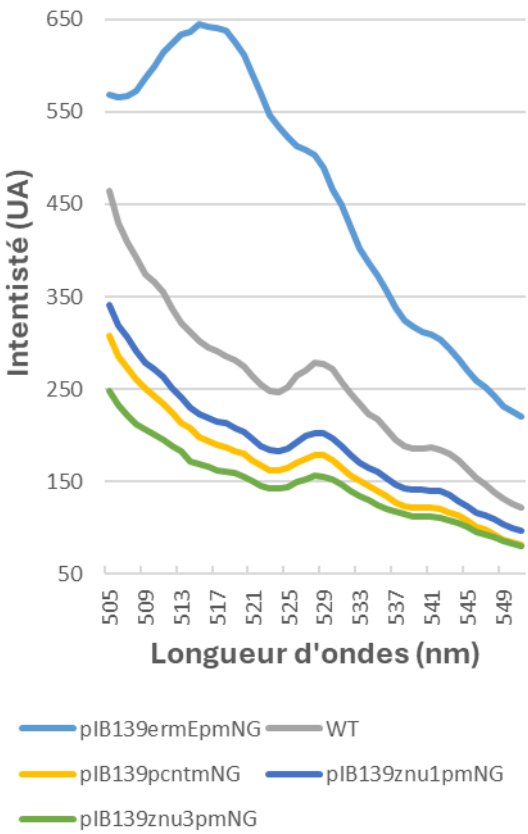


Figure 77 : Intensité de fluorescence sur des cultures LB liquide d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformants.
Longueur d'ondes d'émission de la mNeonGreen : 517 nm.
Intensité en unité arbitraire (U.A).

Ces résultats indiquent que les promoteurs de ces trois opérons ne sont pas exprimés en milieu riche, là où le zinc et le fer sont normalement disponibles. Pour évaluer si l'expression

de ces promoteurs est induite par un environnement carencé, des cultures en milieu pauvre liquide ont été effectuées. Les analyses ont été faites sur des cultures TSB$^{1/100ème}$, avec et sans EDTA, une molécule qui permet de chélater le zinc afin de le rendre indisponible pour les bactéries. Les résultats obtenus (Figure 78) ne montrent cependant aucun pic de fluorescence, et cela quel que soit le transformant considéré. Ces résultats suggèrent que les transformants ne produisent pas de protéines fluorescentes dans les différentes conditions testées ici ou que les régions promotrices putatives sélectionnées sont incomplètes.

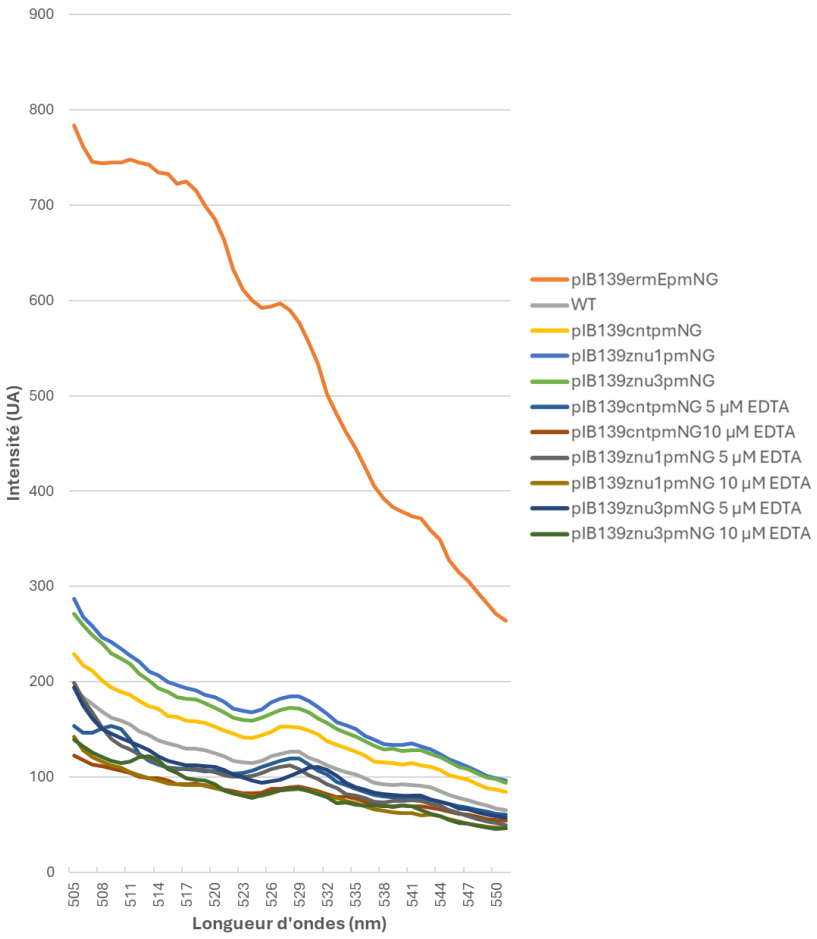


Figure 78 : Intensité de fluorescence sur des cultures d'A. pretiosum WT et A. pretiosum transformants en milieu TSB$^{1/100ème}$ liquide 0 µM, 5 µm et 10 µm EDTA.
Longueur d'ondes d'émission de la mNeonGreen : 517 nm.
Intensité en unité arbitraire (U.A).

Nous en avons conclu que les différentes conditions testées ne suffisaient pas à l'induction des différents promoteurs impliqués dans l'import du zinc et du fer. Néanmoins, l'analyse de la fluorescence par fluorimétrie en cuve n'est sans doute pas la meilleure alternative pour détecter et valider la présence de fluorescence au sein de nos échantillons. Cette analyse

nous permet d'avoir un aperçu rapide mais nécessite une vérification par microscopie confocale afin de confirmer nos observations. De la même manière que pour l'analyse par fluorimétrie, plusieurs conditions ont été testées afin d'évaluer la présence de fluorescence. La souche WT et le transformant pIB139ermEpmNG ont une nouvelle fois été utilisés comme contrôle. Ici encore, la souche WT ne présente pas de fluorescence, confirmant bien que les souches transformées ne sont pas fluorescentes. Le contrôle positif a été utilisé comme référence pour ajuster les paramètres de détection de fluorescence dans les autres échantillons. Quelque que soit le transformant analysé, aucune fluorescence n'est détectée au sein des cellules. Cette observation est valable aussi bien pour les cultures en milieu pauvre qu'en milieu riche, ou même additionné d'EDTA (Figure 79).

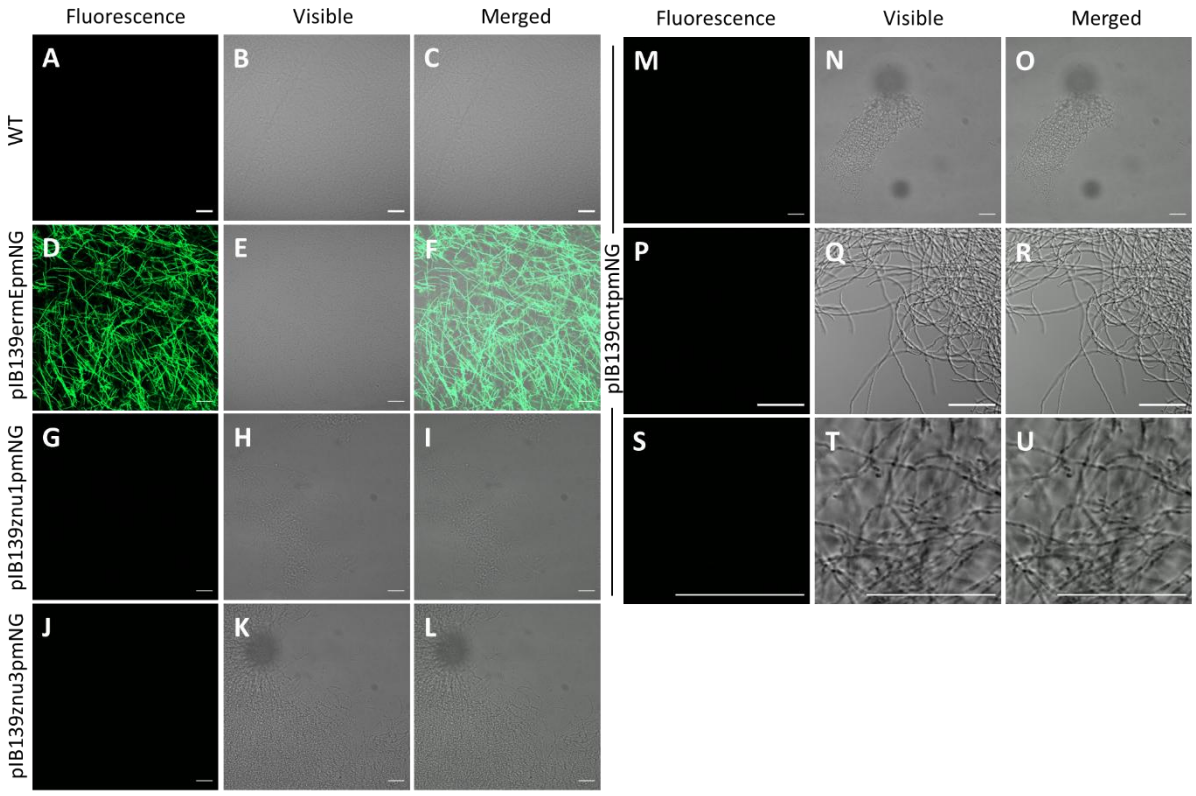


Figure 79 : Images de microscopie confocale sur des cultures d'A. pretiosum WT et transformants. *Les souches ont été cultivées à 30°C pendant 5 jours en milieu TSB$^{1/100ème}$ solide : (A, B et C) souche WT ; (D, E et F) souche transformée pIB139ermEpmNG ; (G, H et I) pIB139znu1pmNG ; (J, K et L) pIB139znu3pmNG ; (M, N et O) pIB139cntpmNG. LB solide : (P, Q et R) pIB139cntpmNG ; (S, T et U) pIB139cntpmNG (+1mM EDTA). Excitation à 504 nm. Grossissement x63. Echelle : 20 µm.*

L'absence de fluorescence dans les bactéries transformées suggèrent que les promoteurs ne sont pas ou peu exprimés dans les différentes conditions testées. Premièrement, les conditions nécessaires à l'induction de ces transporteurs dans *A. pretiosum* ne sont pas connues

pourtant les systèmes de régulation de ces transporteurs sont assez bien étudiés et décrits car ils sont retrouvés dans plusieurs phyla bactériens.

Comment expliquer l'absence de fluorescence dans nos expériences de fusion transcriptionnelles ? Il n'est pas exclu que les conditions que nous avons testées n'engendrent pas d'expression de ces transporteurs, bien que (1) l'utilisation de trois promoteurs différents soit justement une option choisie afin d'augmenter les chances d'obtenir une information et (2) les différentes conditions de culture (riche, pauvre et avec EDTA) étaient précisément utilisées pour essayer de voir un seuil d'expression. Il est possible que nous n'ayons pas atteint une carence en métal suffisante lors de nos ajouts d'EDTA, bien que dans notre expérience l'ajout d'1 mM d'EDTA soit généralement suffisant. En effet, des expériences de croissance en milieu solide en présence de concentration croissante d'EDTA (0 à 10 mM) ont révélé que les bactéries pouvaient se développer jusqu'à 1 mM d'EDTA. Néanmoins, en condition solide pauvre et avec les cryotubes testés, seul le mycélium végétatif se développait. Il est également possible que nos constructions induisent un niveau de production de la protéine fluorescente qui soit faible. En effet les protéines dont nous voulons évaluer l'expression correspondent à des transporteurs dont la localisation se fait au niveau des membranes des bactéries. Or les fusions transcriptionnelles que nous avons effectuées ne permettent pas une localisation spécifique, les protéines fluorescentes produites se retrouvent ainsi diluées au sein du cytoplasme des bactéries. Une faible activité des promoteurs pourrait entrainer une faible quantité de protéines produites, ce qui pourrait s'avérer plus difficile à détecter. Afin d'avoir une autre méthode permettant d'évaluer les niveaux de production de protéines nous avons effectué des expériences de protéomique. Cette méthode à l'avantage de ne pas être ciblée sur une protéine en particulier ou bien un groupe de protéines mais au contraire de donner une idée du niveau de production de l'ensemble des protéines.

Nous avons utilisé des constructions géniques pour comprendre les mécanismes d'expression des opérons *cnt* et *znu* impliqués dans le transport des métaux. Le choix de ces deux systèmes semblait pertinent en raison des nombreux travaux de recherche de l'équipe sur l'opéron *cnt* et de la redondance de trois systèmes ZnuABC dans le génome de *A. pretiosum*. Néanmoins, compte tenu des résultats obtenus ici, il semblerait que ces trois opérons ne soient pas (ou très peu) exprimés, suggérant éventuellement l'implication d'autres systèmes de transport du fer et du zinc. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons donc effectué des analyses protéomiques afin d'identifier les potentiels systèmes de transport chez *A. pretiosum*.

Il serait également pertinent de vérifier les régions où se sont intégrés les vecteurs pour s'assurer que l'intégration se soit faite aux endroits ciblés.

6. Etude des protéomes de cultures d'*A. pretiosum* dans différentes conditions

Les analyses protéomiques ont été initiées à partir de plusieurs conditions de cultures différentes : milieu riche (LB) et milieu pauvre (TSB dilué au 1/50ème ou au 1/100ème) en culture liquide et solide. Ces conditions de culture ont été choisies afin de pouvoir comparer les différents protéomes et comprendre si l'expression des transporteurs identifiés dépend du milieu ou si elle est constitutive. Sachant que les synnemata se forment préférentiellement dans la condition de culture solide en milieu pauvre (en milieu riche des synnemata peuvent apparaitre au cours du temps au sommet de colonies, mais les conditions locales correspondent probablement à un milieu appauvri).

Les analyses ont été faites sur la plateforme de protéomique de Marcoule en utilisant des quintuplas de chacune des conditions choisies grâce à un protocole mis au point au cours de ma thèse. Les cultures liquides ont été ensemencées avec une colonie d'*A. pretiosum* dans 20 mL de milieu (LB ou TSB$^{1/50ème}$) dans des erlenmeyers de 100 mL et laissées 7 jours à 30°C 110 rpm en présence de billes de verre. Les cellules ont été récoltées grâce à des unités de filtration qui ont permis d'éliminer le milieu et grâce à un râteau stérile la biomasse a été prélevée, pesée puis directement congelée dans de l'azote liquide. Pour les colonies sur milieu solide, les bactéries ont été récoltées à 5 jours à l'aide d'une oese, pesées et congelées rapidement (Tableau 4).

Les synnemata quant à eux ont été prélevés sous loupe binoculaire grâce à de petites boucles en mylar (utilisées habituellement en cristallographie). Un gel SDS-PAGE préalable nous avait indiqué qu'une dizaine de synnemata correspondait à une quantité suffisante de protéines pour une détection subséquente par spectrométrie de masse.

Nous avons enregistré 1 124 843 spectres MS/MS sur les 20 échantillons correspondant à 592 944 spectres MS/MS (*Peptides-to-Spectrum Matches*, PSMs) dont la p-value était inférieure à 0,05. Ces PSMs ont permis de lister 30 778 peptides, de valider la présence de 2 863 protéines (au moins 2 peptides différents dont au moins 1 unique dans la base de données, *False Discovery Rate*, FDR <1%), et de les quantifier par leur « spectral counts » (nombre de

spectres assignés à chaque séquence de protéine = proxy pour abondance des protéines). L'abondance des protéines peut être normalisée par le poids moléculaire de chaque protéine (ou la longueur des polypeptides) afin de corriger le nombre de spectres qui est forcément plus important si plus de peptides peuvent être généré quand une protéine est longue. On parle alors de NSAF (*Normalized Spectral Abundance Factor*). Sur ce critère, il est possible de classer les 2 863 protéines détectées selon leur niveau d'abondance.

Parmi les 20 échantillons, la condition TSB$^{1/100ème}$ solide présente des signaux plus faibles que les autres (total des spectral counts). Ils ont donc été normalisés en comptant des « Pseudo-spectral counts » qui permettent de pondérer les peptides détectés en fonction de leur intensité. Ensuite, une analyse en composante principale a été réalisée pour voir si les réplicas biologiques étaient homogènes (Figure 80).

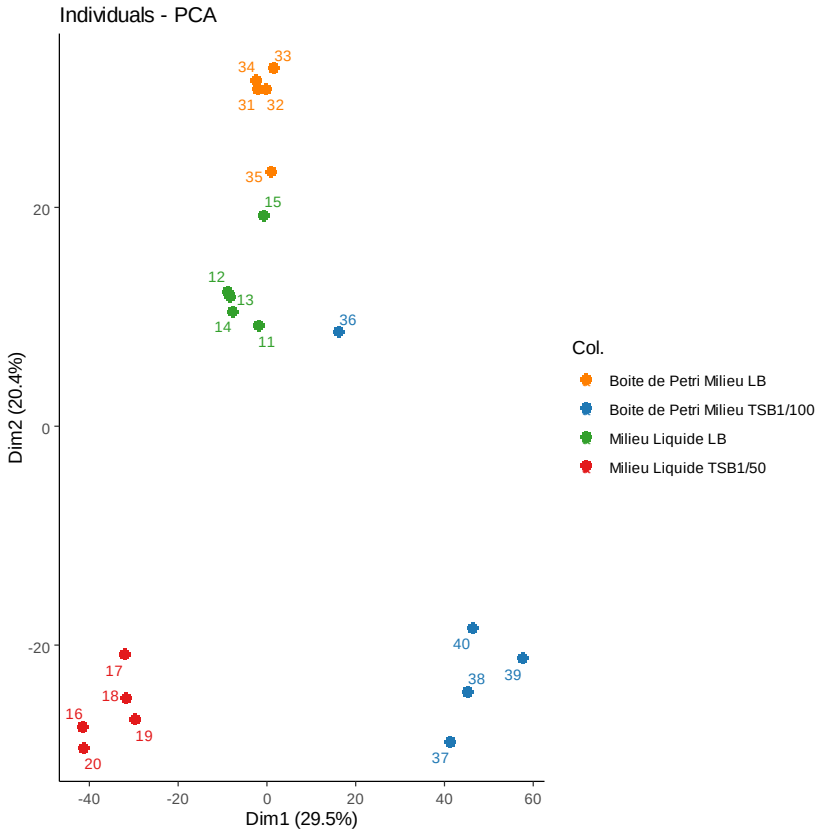


Figure 80 : Analyse en composante principale des échantillons analysés en protéomique.

Dans un premier temps, une observation sur les 4 différents protéomes totaux a été effectuée afin de mettre en évidence la variation de ces derniers en fonction des conditions de culture. La Figure 81 permet de comparer toutes les conditions les unes aux autres et de définir le nombre de protéines communes entre toutes, plusieurs ou présentes dans une seule condition.

Parmi les 2 863 protéines détectées, 1 827 sont détectées dans les 4 conditions, suggérant que ces protéines sont nécessaires au bon développement des bactéries quelques soit les conditions de culture (Figure 81). Chaque condition semble présenter un protéome différent : 2 441 protéines sont détectées en milieu LB liquide, 2 473 en milieu TSB$^{1/50ème}$ liquide, 2 497 en milieu LB solide et 2 160 en milieu TSB$^{1/100ème}$ solide. On remarque qu'en condition pauvre solide (condition dans laquelle se forment les synnemata), le nombre de protéines est relativement bas comparé aux trois autres conditions ce qui peut s'expliquer par le manque d'apport de nutriments puisque c'est une condition carencée. De plus, un certain nombre de protéines sont spécifiques à une condition de culture et ne sont pas partagées avec les autres conditions (Figure 81). Parmi ces protéines, 15 sont spécifiques à la condition LB liquide, 128 à TSB$^{1/50ème}$ liquide, 55 à LB solide et 69 à TSB$^{1/100ème}$ solide. Ces protéines propres à une condition suggèrent qu'elles ont une fonction uniquement dans la condition dans laquelle elles ont été détectées. Cette analyse n'est pas surprenante étant donné que les cellules en culture liquide, solide et les synnemata n'ont pas la même structure, la même composition et ni la même facilité pour avoir accès aux ressources. Ne serait-ce qu'entre les cultures en milieu solide riche et pauvre, 160 protéines ne sont présentes qu'en milieu pauvre alors que 497 protéines ne le sont qu'en milieu riche. Cependant, si on compare deux conditions que l'on estimait assez différentes (LB liquide *vs* TSB$^{1/100ème}$ solide) on constate que le nombre de protéines communes (1 979 ; 75,5 %) est beaucoup plus important que le nombre de protéines détectées dans l'une ou l'autre des conditions (546 et 182, respectivement ; équivalent à 20,8% et 6,9%), indiquant que le protéome de cette bactérie est relativement stable et ne dépend pas radicalement des conditions de culture.

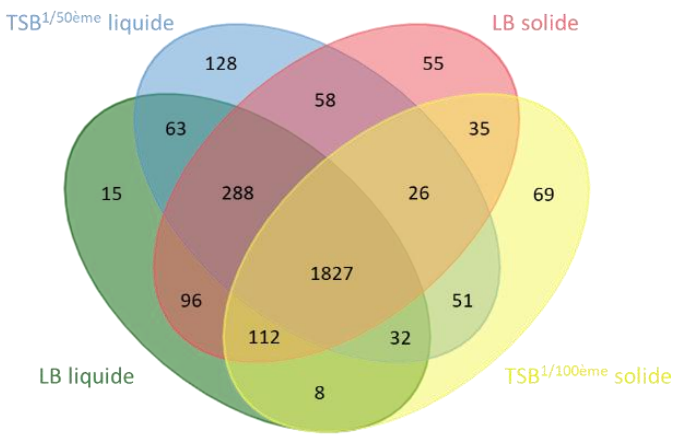


Figure 81 : Diagramme de Venn des protéomes des 4 conditions de culture.

De manière générale, les études protéomiques s'intéressent aux protéomes de bactéries cultivées en milieu liquide car c'est un bon modèle pour contrôler des paramètres environnementaux prédéfinis en plus du fait que la croissance en milieu liquide permet l'obtention d'une biomasse cellulaire plus importante. En 2020, une étude protéomique sur *E.coli* K12 a comparé le protéome de cultures en milieu LB liquide à différentes phase de croissance avec une culture en milieu LB solide afin de mettre en évidence l'expression différentielle de certains gènes en fonction de l'environnement de culture (Fortuin et al., 2020). Les données obtenues dans cet article mettent en évidence ici aussi la présence d'un large groupe de protéines communes aux deux conditions de culture (1 370 protéines (68,9%) partagées par les deux conditions sur 2 044 protéines totales, 280 protéines (14,1%) uniques aux cultures solides et 339 protéines (17%) propres aux cultures liquides). Une étude encore plus récente de 2023 menée sur les protéomes de *Candida albicans* cultivée également sur milieu liquide et solide révèle une fois de plus la présence de nombreuses protéines communes aux deux conditions de culture (Alhameed et al., 2023). Ces deux études vont dans le sens de nos résultats où les conditions de culture n'impactent que minoritairement le protéome et suggère qu'un grand nombre de protéines est exprimée constitutivement pour assurer le bon développement de la souche.

La détection des 2 863 protéines ne représentent que 42% des protéines totales prédites dans le génome. Cette donnée démontre l'importance de notre approche en protéomique pour identifier les systèmes produits par *A. pretiosum* et compléter nos premières études par fusion transcriptionnelles. La non-détection des autres protéines peut être liée soit à une trop faible présence des protéines dans la cellule ou bien à une incapacité de la cellule à la produire dans les conditions testées.

6.1. Etude comparative entre les différents protéomes

6.1.1. Identification et rôle des 20 protéines les plus abondantes

Parmi toutes les protéines détectées, nous nous sommes focalisés sur les 20 protéines les plus abondantes dans chaque condition (Figure 82). Pour ce faire, nous avons utilisé les NSAF de chaque protéine que nous avons rapporté à la somme de tous les NSAF de la condition. Afin d'avoir le pourcentage d'abondance, les résultats obtenus ont été multipliés par 100.

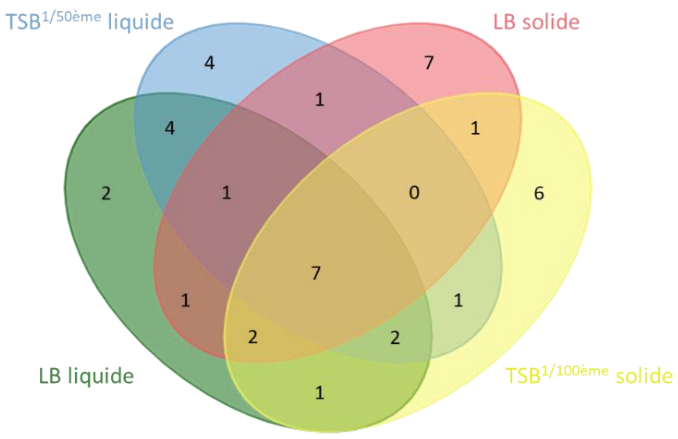


Figure 82 : Diagramme de Venn des 20 protéines les plus abondantes de chaque protéome.

Au total, 40 protéines sont comptabilisées (

Annexe 1) et parmi elles, 7 sont communes aux 4 conditions de culture. Ces 7 protéines ont des fonctions variées (Tableau 6).

Protéine	Fonction prédite
WP_096497128.1	Facteur d'élongation Tu
WP_012783072.1	Chaperonne GroEL
WP_232520035.1	SBP d'acides amines à chaine ramifiée (ABC transporteur)
WP_015805227.1	Co-chaperonne GroES
WP_096497035.1	Isocitrate déhydrogénase NADP-dépendant
WP_096496085.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
WP_096496584.1	Facteur d'élongation Ts

Tableau 6 : Fonctions prédites des protéines communes aux 4 conditions de croissances étudiées.

Deux protéines, le facteur d'élongation thermo instable (EF-Tu) et le facteur d'élongation thermo stable (EF-Ts), jouent un rôle central dans la biosynthèse des protéines. EF-Tu est l'une des protéines les plus abondantes dans les protéomes bactériens de manière générale (Harvey et al., 2019). Elle est indispensable pour la traduction et sa principale fonction est de transporter les aminoacyl-ARNt au ribosome afin de permettre la biosynthèse de protéines. L'ajout d'un acide aminé par un ARNt au niveau du ribosome appareillé à l'ARNm nécessite la présence de EF-Tu complexé à un GTP (Harvey et al., 2019; Xu et al., 2022). Ce dernier, lors de la liaison est hydrolysé en GDP par EF-Tu et le complexe EF-Tu-GDP se dissocie du ribosome. EF-Tu-GDP est ensuite recyclé par EF-Ts qui vient se lier au complexe et libère le GDP pour que EF-Tu puisse continuer le cycle d'élongation de synthèse des protéines (Tomita, 2014; Wang et al., 1997). EF-Tu intervient principalement dans le processus de traduction des protéines mais il est également connu, en interaction avec d'autres protéines, pour permettre l'adaptation au stress ou être impliqué dans des processus de pathogénicité (Caldas et al., 1998; Defeu Soufo et al., 2015; Torres et al., 2020).

Un autre facteur d'élongation (EF-G), essentiel à la synthèse des protéines, est présent parmi les 20 protéines les plus abondantes en condition LB solide. Cette protéine est aussi présente dans les 3 autres conditions, c'est la 23ème protéines plus abondantes en LB liquide, la 35ème en TSB$^{1/50ème}$ liquide et la 57ème en TSB$^{1/100ème}$ solide. EF-G complexé au GTP permet la translocation de l'ARNt et de l'ARNm le long du ribosome à la fin de chaque cycle d'élongation (Xu et al., 2022).

Les protéines du complexe de chaperonnes GroEL/GroES font également parties des 7 protéines communes les plus abondantes. En temps normal, le processus de repliement est spontané. En effet, les fonctions des protéines dépendent de leurs structures tertiaires dictées par leurs séquences en acides aminés. Mais il arrive que le processus de repliement entre en compétition avec le processus de formation d'agrégats protéiques et celui-ci peut être évité grâce à l'intervention de protéines dites chaperonnes comme GroEL/GroES ou encore DnaK/DnaJ/GrpE. Elles vont, à l'aide de l'ATP, permettre le bon repliement des protéines afin que ces dernières puissent effectuer leurs fonctions (Horwich et al., 2006; Taguchi and Koike-Takeshita, 2023).

On retrouve également, parmi les 7 protéines communes, deux enzymes jouant un rôle important dans la respiration cellulaire, une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase impliquée dans la glycolyse et une isocitrate déshydrogénase NADP-dépendant intervenant dans le cycle de Krebs (Tableau 6) (Jurtshuk, 1996). Elles peuvent également avoir des fonctions dans d'autres voies communes telles que les voies de biosynthèses de métabolites secondaires, les voies du métabolisme microbien dans divers environnements et les voies de biosynthèse d'acides aminés. L'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendant peut aussi jouer un rôle dans les voies du métabolisme du glutathion et les voies métaboliques de l'acide 2-oxocarboxylique (KEGG Pathway Database, https://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Très peu d'articles s'intéressent à ces différentes voies chez *A. pretiosum.* Seul un article de 2016 met en évidence l'importance du cycle de Krebs et de la glycolyse pour la production d'un antibiotique, l'ansamitocine, chez *A. pretiosum* (Fan et al., 2016a).

Enfin, la 7ème protéine commune aux différentes conditions est annotée comme étant une SBP associée à un transporteur ABC permettant le transport d'acides aminés à chaine ramifiée. Elle possède des domaines conservés semblables aux protéines LivJ et LivK d'*E. coli*. Ces deux protéines bien qu'ayant des fonctions différentes ont des séquences et des structures très similaires (Adams et al., 1990; Trakhanov et al., 2005). LivJ à une haute affinité pour la leucine, l'isoleucine et la valine qui sont toutes trois des acides aminés à chaine ramifiée alors que LivK est spécifique de la leucine. D'après des analyses d'alignement de séquences, la protéine d'*A. pretiosum* présenterait 26,25% d'homologie avec la protéine LivJ d'*E. coli* et permettrait ainsi l'import des trois acides aminés.

Bien qu'elles soient communes aux 4 conditions, l'abondance de ces protéines peut varier en fonction des conditions. En effet, pour avoir un ordre de grandeur, les valeurs

d'abondance (en %) des 40 protéines dans les 4 conditions varient de 0,27% à 1,31%. Des analyses statistiques (t.test) ont été effectuées en comparant les conditions liquide/liquide et les conditions solide/solide. En condition liquide, les protéines EF-Tu, GroEL, l'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendant et la glycéraldéhyde-3-phosphate sont plus abondantes en LB qu'en TSB$^{1/50ème}$. Ce qui peut s'expliquer encore une fois par l'accessibilité aux ressources : en milieu riche, la disponibilité est telle que le métabolisme de la cellule est important et permet une plus grande production de la machinerie énergétique et protéique. En revanche en condition solide, les protéines GroES et EF-Ts sont plus abondantes en TSB$^{1/100ème}$ qu'en LB. Des expériences complémentaires et plus quantitatives seraient nécessaires pour confirmer les variations d'abondances entre les différentes conditions de ces 7 protéines, qui de toutes évidences sont indispensables aux bactéries quelques soient les conditions de culture en laboratoire.

Chez *A. mirum*, les mêmes analyses préliminaires ont été effectuées et ont permis de montrer que les protéomes des deux souches différaient (Annexe 2). Toutefois, les données de protéomiques obtenues étaient de moins bonne qualité et nécessitaient un traitement des données plus approfondi tel que la stratégie du *Pseudo Spectral Count*. Cette stratégie, moins précise que la stratégie utilisée pour *A. pretiosum*, nous a permis de corriger les biais présents dans les spectres. Ajouté à cela les expériences de transformations de nos bactéries qui n'ont fonctionné que chez *A. pretiosum*, nous avons préféré présenter les résultats de protéomique uniquement pour *A. pretiosum* afin de conserver une cohérence entre les différentes approches expérimentales.

6.1.2. Analyse comparative entre le protéome du milieu TSB$^{1/100ème}$ solide et TSB$^{1/50ème}$ liquide

La comparaison des quatre conditions de cultures (liquide vs solide et milieu riche ou minimum) est sans doute riche d'informations mais également complexe. Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à la comparaison du protéome d'*A. pretiosum* cultivé en milieu minimum (TSB dilué), soit en culture liquide, soit sur gélose solide, sur laquelle les synnemata se sont développés. Cette comparaison devrait nous permettre de décrire les déterminants moléculaires de l'adaptation à l'air.

Nous avons constaté que de nombreux composants (EccABDE) du système de sécrétion de type VII étaient moins abondants en culture liquide que dans les synnemata (Figure 83).

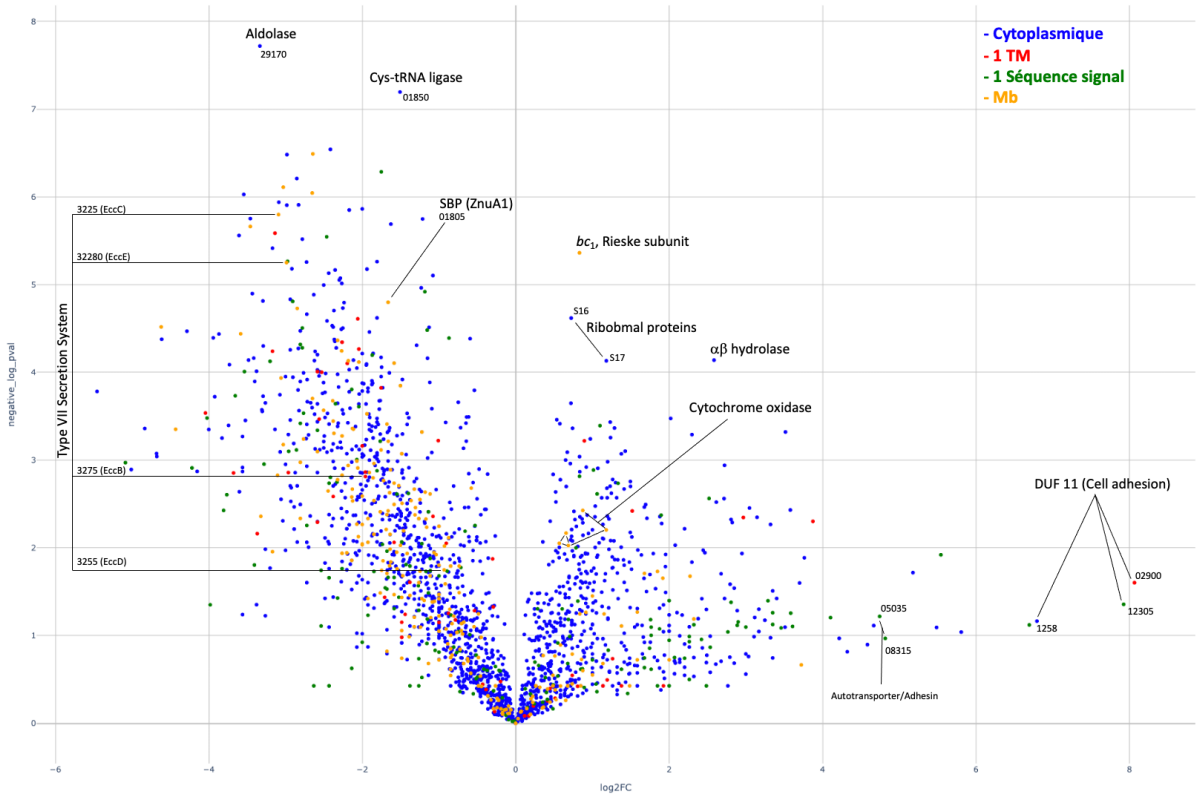


Figure 83 : Volcano Plot comparant les protéines en milieu solide pauvre vs en milieu liquide pauvre.

En bleu ; les protéines cytoplasmiques, en rouge : les protéines avec 1 segment transmembranaire ; en vert ; les protéines avec un peptide signal (sécrétées) ; en jaune : les protéines membranaire (avec plus d'un segment transmembranaire.

Le système de sécrétion de type VII a été étudié chez le pathogène humain *Mycobacterium tuberculosis* (Rivera-Calzada et al., 2021). Il joue un rôle important dans sa pathogénicité et il présente même une différence génétique (délétion partielle) que l'on retrouve dans la souche vaccinale *Mycobacterium bovis*. Ce système de sécrétion a également été étudié chez les pathogènes végétaux *Streptomyces scabies* (Fyans et al., 2013) et *S. coelicolor* (Akpe San Roman et al., 2010), bien que dans ces cas-là il n'ait pas été associé à la pathogénicité vis-à-vis des plantes. Dans tous les cas, il a été constaté que ce système de sécrétion avait un effet important sur le développement des hyphes aériens, soit en les stimulant lorsque le gène *eccC* était muté, soit en retardant son développement lorsque les composants sécrétés étaient mutés. La découverte que plusieurs des composants de ce système de sécrétion sont moins abondants en culture liquide que dans les synnemata est donc en accord avec le rôle qu'il semble jouer dans le développement des hyphes aériens.

Il y a également des protéines qui sont plus abondantes lorsque la bactérie forme des synnemata plutôt que lorsqu'elle est cultivée en milieu liquide. Il s'agit notamment de la sous-

unité Rieske du cytochrome bc_1 ainsi que de deux protéines ribosomales (S16 et S17). Le lien entre l'abondance de ces protéines et la formation de synnemata n'est pas clair, excepté que la respiration et la traduction des protéines semblent être des processus actifs dans les synnemata. L'abondance plus importante de 4 sous-unités de la cytochrome oxydase dans les synnemata soutient cette hypothèse d'une respiration importante dans ce mode de vie. Le domaine C-terminal des protéines contenant une séquence signal (donc sécrétées ou attachées à la membrane de la bactérie) CNX65_08315 et CNX65_05035 partagent des similitudes structurales (même repliement prédit par AlphaFold) et sont potentiellement liées à l'adhésion. Nous avons également découvert que quatre protéines très abondantes dans les synnemata contiennent un domaine DUF11 ou Big_2, qui sont des domaines impliqués dans l'adhésion cellulaire.

6.1.3. Etude des protéines propres aux synnemata

Nous avons encore voulu approfondir nos analyses sur le protéome des cultures en milieu solide pauvre. En effet, 69 protéines sont propres aux cultures en milieu TSB$^{1/100ème}$ (synnemata) (Figure 81). Parmi ces protéines, les 10 plus abondantes sont prédites pour être des protéines enzymatiques (peptidases ou superoxydes dismutases) ou alors des protéines de signalisation. Trois protéines hypothétiques figurent aussi parmi les plus abondantes sans pour autant connaitre leur fonction. Une protéine impliquée dans les mécanismes d'adhésion de bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte (WP_177154397.1) sort du lot (Melvin et al., 2015). En effet, elle possède des domaines conservés de fixation de l'hème et une étude a mis en évidence que son expression était dépendante des niveaux de fer environnants (Sun et al., 2016) (Tableau 7).

Protéines	Fonctions prédites
WP_096492872.1	Protéine contenant un domaine CHRD
WP_177154323.1	Protéine contenant un domaine EF-Hand
WP_096491720.1	Protéine hypothétique
WP_096496836.1	Sérine peptidase de la famille S8
WP_177154397.1	Protéine contenant un domaine de type régulateur de la carboxypeptidase
WP_198320508.1	Hydrolase SGNH/GDSL
WP_157767549.1	Protéine contenant un domaine PKD
WP_096492731.1	Protéine hypothétique
WP_096495503.1	Protéine hypothétique
WP_096491337.1	Protéine contenant un domaine DUF4232

Tableau 7 : Fonctions prédites des 10 protéines spécifiques aux synnemata les plus abondantes.

Parmi les protéines propres aux synnemata, 27 sont des protéines sécrétées. Leur fonction sont variées et redondantes : peptidases ou protéases, hydrolases, protéines de résistances aux antibiotiques, et de nombreuses protéines hypothétiques. Neuf d'entre elles figurent parmi les 10 protéines les plus abondantes retrouvées pour les synnemata. Seulement 4 protéines membranaires sont identifiées dont une, WP_157767873.1, serait impliquée dans l'export du cuivre. Très peu de protéines d'adhésion ou permettant la formation des synnemata sont identifiées clairement suggérant que ces protéines sont nécessaires à tous les modes de développement des bactéries d'*A. pretiosum*, y compris en milieu riche.

6.2. Recherche de protéines impliquées dans l'import/export du fer et du zinc dans les différents protéomes

En plus des analyses décrites ci-dessus, nous avons cherché dans les données protéomique obtenues si les protéines impliquées dans l'import et l'export du fer et du zinc étaient détectées dans les différentes conditions. Cette analyse permettrait d'évaluer leur abondance, mais plus précisément d'évaluer le niveau d'expression des transporteurs de métaux que nous avions sélectionnés lors de nos expériences de fusion transcriptionnelle. Sur les 60 protéines identifiées seules 21 sont détectées dans les données de protéomique, ce qui signifie qu'une large part n'est soit pas détectable, soit que ces transporteurs ne sont pas ou très peu exprimés. Chaque protéine de chaque opéron identifié a été recherchée et de manière étonnante, toutes les protéines d'un opéron ne sont pas détectées. Par ailleurs, malgré leur détection au sein des différents échantillons, les protéines recherchées sont très peu abondantes. Pour identifier les niveaux d'abondance de chaque protéine, une protéine contrôle parmi les 20 plus abondantes a été utilisée, la protéine WP_096497598.1, qui est une SBP appartenant à une famille de système d'import et impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Cette dernière est relativement abondante dans les 4 conditions testées, on la retrouve entre 0,18 et 0,56% (Figure 84). Les transporteurs de zinc et de fer que nous avons identifiés sont ici tous plus faiblement représentés avec des abondances comprises entre 0 (Non détectée) et 0,18%. Parmi toutes les protéines détectées, cinq sortent légèrement du lot avec des abondances un peu plus élevées tout en restant très faiblement présentes.

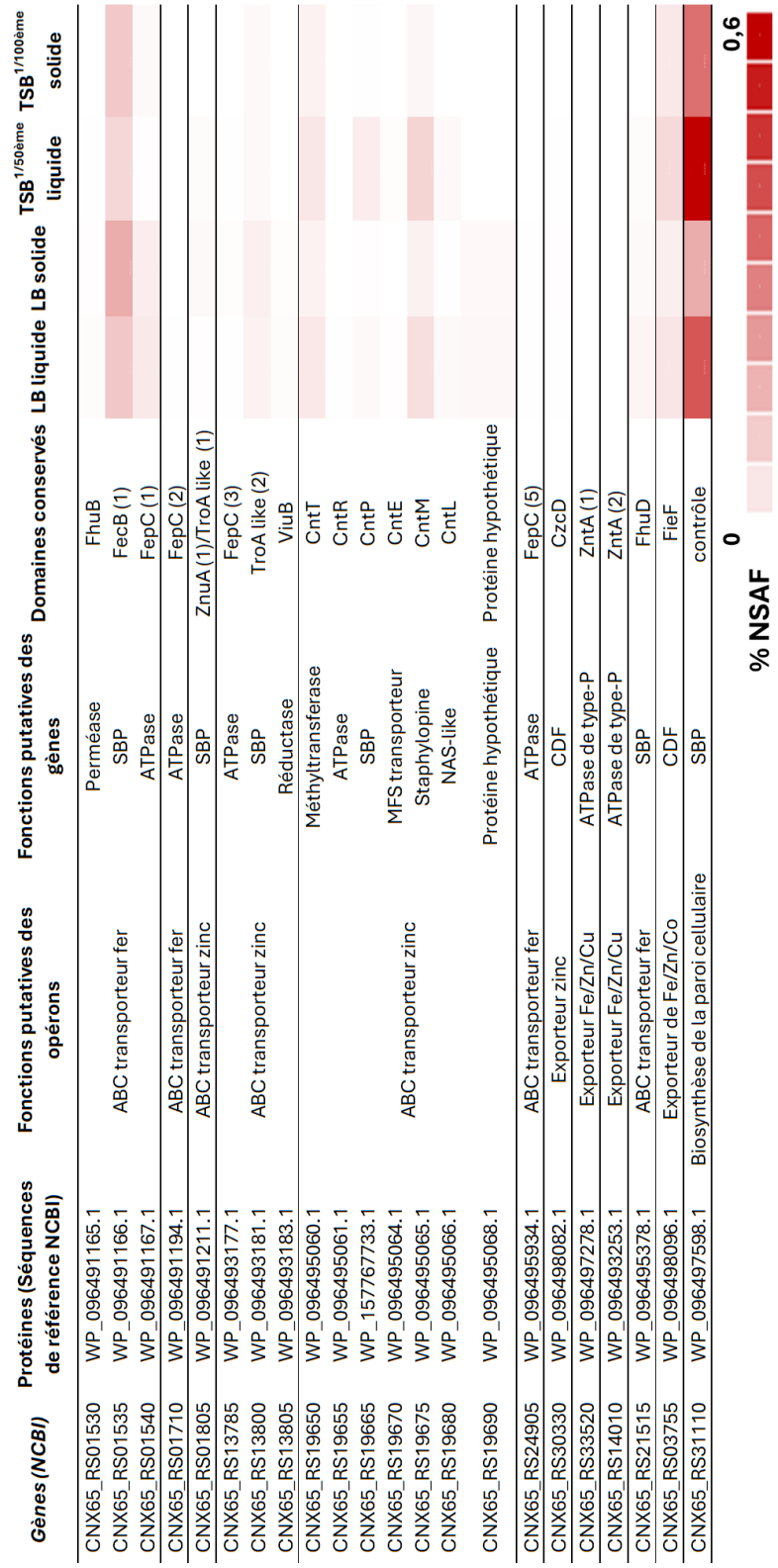


Figure 84 : Heatmap des protéines impliquées dans le transport du fer ou du zinc détectées en protéomique.

La moyenne des SAF a été faite puis multipliée par 100 pour obtenir le pourcentage d'abondance dans chaque conditions.

On retrouve une SBP d'un ABC transporteur de fer (FecB), une ATPase d'un ABC transporteur de zinc (TroA), la staphylopine et la méthyltransférase de l'opéron *cnt* et un CDF (FieF). Concernant l'ABC transporteur de fer, toutes les protéines sont présentes dans les différents échantillons, ce qui suggère que l'ABC transporteur est complet et fonctionnel. Ceci n'est pas le cas pour l'ABC transporteur de zinc, où seule l'ATPase et la SBP sont détectées. Comme mentionné précédemment, l'absence d'une protéine n'est pas nécessairement synonyme d'absence de la protéine au sein des cellules mais peut être due au manque de profondeur de l'analyse protéomique. Etant donné la place de la perméase au sein de cet opéron, cela pourrait également justifier l'absence de la protéine. Le premier gène de l'opéron est l'ATPase, suivie de la SBP puis de la perméase. Après la transcription des ARNm issus d'opéron, des mécanismes de régulation post-transcriptionnels, essentiellement basés sur la structure tridimensionnelle de l'ARN, permettent de réguler la traduction. Cela entraine une traduction incomplète des ARNm polycistroniques qui ne codent alors que les premières protéines de leur séquence (Samatova et al., 2021; Zhang et al., 2023). Ainsi, dans notre cas où la perméase se situe à la fin de la séquence de l'ARNm, il est probable que sa traduction soit soumise aux mêmes mécanismes de régulation de la traduction.

D'après ces analyses, on ne constate pas de variation d'abondance entre les cultures en milieu pauvre (TSB) et riche (LB) alors que l'on pourrait s'attendre à un enrichissement de ces transporteurs en condition de carence en métal. Certaines protéines semblent plus abondantes en milieu liquide, comme c'est le cas pour les protéines de l'opéron *cnt*, tandis que d'autres semblent plus retrouvés en milieu solide. Néanmoins, l'abondance relative de ces transporteurs de métaux reste faible ce qui rend difficile l'interprétation de ces différences dans notre souche. Cette faible abondance peut être le reflet d'une localisation précise des transporteurs sur la membrane. Comme décrit plus haut, les cellules d'*A. pretiosum* s'organisent en filaments et les analyse en XRF ont démontrées la présence du fer et du zinc aux pôles des cellules. Ainsi, les transporteurs pourraient n'être présents qu'au niveau des jonctions cellulaires ce qui expliquerait leur faible abondance. Une seconde hypothèse qui expliquerait l'absence de variation d'abondances serait que bien que les milieux $TSB^{1/100ème}$ et eau/agar soient pauvre, il est possible qu'ils ne soient pas ou insuffisamment carencés en fer et en zinc. De plus, ces résultats peuvent aussi révéler des limites techniques, avec par exemple des peptides qui sont plus ou moins bien ionisés et donc plus ou moins bien détectés. Ces deux observations nous ont conduit à envisager une autre méthode d'évaluation de l'expression de ces gènes, mais cette fois-ci en utilisant la détection de l'ARNm par RT-qPCR.

Chez *A. mirum*, les mêmes analyses ont été effectuées et ont également démontré des variabilités d'abondances des différentes protéines cibles. Néanmoins, ces variations sont différentes de celles observées pour *A. pretiosum* (Annexe 3). Toutefois, il en ressort également que chez *A. mirum* les protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et du zinc son très peu abondantes.

7. Etude du niveau d'expression de différents opérons impliqués dans l'import/export du fer et zinc

L'étude du niveau d'expression des gènes s'est faite sur des cultures de 7 jours en milieu solide riche (LB) et solide pauvre (eau/agar). Toutes les expériences ont été effectuées en utilisant un protocole mis au point en collaboration avec la plateforme de transcriptomique à l'IMM. Les ARNs totaux ont été purifiés en utilisant le kit Maxwell et ont été rétrotranscrits en ADN complémentaire avec le kit GoScript™ Reverse transcriptase (Promega). Les résultats obtenus ont été traités de manière à obtenir le nombre de copie présente par quantité d'ARN (ng), permettant de comparer les niveaux d'expression des gènes dans une condition puisque la comparaison entre deux conditions n'est pas pertinente étant donné la différence de phénotype bactérien.

Le fer et le zinc sont colocalisés aux pôles des bactéries, deux des opérons permettant l'import du zinc sont faiblement exprimés et les protéines putatives du transport de ces deux métaux sont peu abondantes. Pour vérifier ces résultats, nous avons utilisé l'ARN16S et la SBP du transporteur ABC, fortement représentée dans les protéomes, qui servent à pondérer l'expression des gènes cibles dans les conditions testées et ainsi confirmer les résultats obtenus en protéomique. Pour ces analyses, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes en condition solide riche et pauvre après 6 jours de culture. Le but étant de comparer le niveau d'expression dans des conditions riches et pauvres afin d'identifier les gènes essentiels à l'acquisition de ces métaux au sein des synnemata. Les amorces (environ 20 pb) ont été réalisées grâce à Primer-BLAST afin que les amplicons fassent entre 70 et 200 pb et qu'elles aient toutes la même température d'hybridation, soit environ 60°C. Un couple d'amorces a été synthétisé pour chaque groupe de gènes (opéron) en essayant de prendre le premier gène de l'opéron quand cela était possible. Les résultats obtenus ont été traités de manière à obtenir le nombre de copie présente par quantité d'ARN (ng), permettant de comparer les niveaux d'expression de tous les gènes dans une condition.

A l'exception de la condition de culture en milieu LB liquide, les données obtenues pour l'ARN16S montrent que la quantité de ce dernier ne varie que très peu et reste dans le même ordre de grandeur pour chacune des conditions (Tableau 8). De plus, des courbes d'étalonnage nous ont permis de valider l'efficacité de nos expériences (Annexe 4). Ainsi, les conditions de culture n'impactent pas les niveaux d'expression de l'ARN16S qui servira donc ici de contrôle. En effet, pour les deux conditions qui nous intéressent pour comparer l'expression des gènes au sein des synnemata versus colonies (LB solide et eau/agar), l'ARN16S est retrouvé à environ 50 millions de copies par ng d'ARN.

Conditions de culture	Mean Cq	Nombre de copies/ ng d'ARN
LB liquide	7,86	1,62E+07
$TSB^{1/50ème}$ liquide	6,84	3,24E+07
$TSB^{1/100ème}$ liquide	6,73	3,50E+07
LB solide	6,22	4,95E+07
$TSB^{1/100ème}$ solide	6,14	5,23E+07
Eau/agar	6,11	5,33E+07

Tableau 8 : Quantité d'ARN16S obtenue par RT-qPCR pour chaque condition de culture.

En analysant les données (Figure 85A et B), la quantité d'ARN16S apparait très largement supérieure à la quantité des ARNs des gènes d'intérêt, et ce même par rapport au gène contrôle sélectionné sur la base des données de protéomique, codant pour une protéine (SBP) abondante. Cette observation vient confirmer les données de protéomique qui détectaient également avec une faible intensité les protéines codées par les gènes ici étudiés (Figure 85).

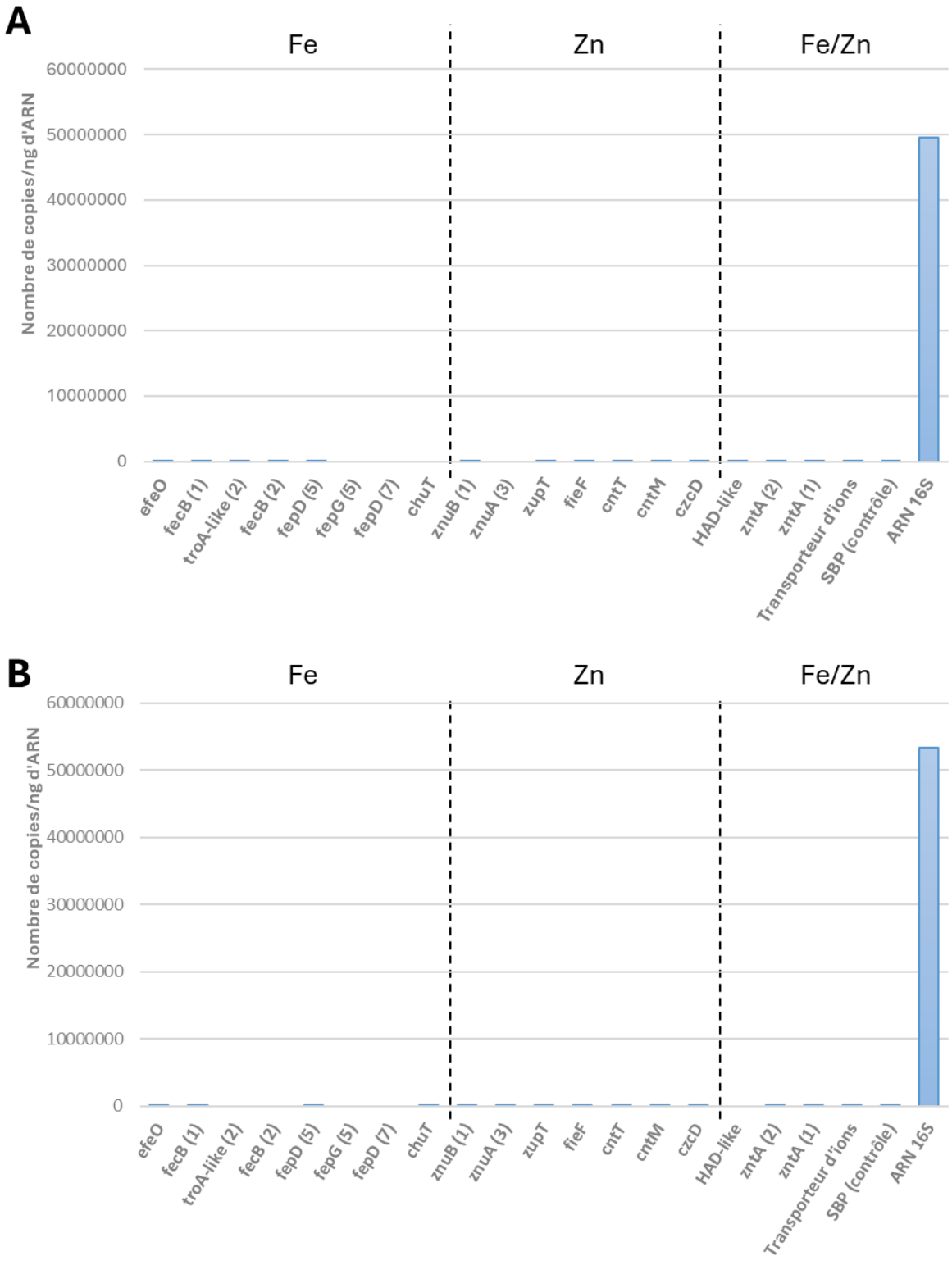


Figure 85 : Niveau d'expression par RT-qPCR des gènes impliqués dans l'import et l'export du fer et du zinc.

(A) culture en milieu solide riche (LB) ; (B) culture en milieu pauvre (eau/agar). Les analyses ont été faites sur des colonies de 6 jours cultivées en milieu LB et de synnemata cultivés 6 jours sur eau/agar.

Pour contrer l'écrasement des données figurant sur le graphique (Figure 85), nous avons opté pour une représentation en échelle logarithmique permettant une meilleure illustration des différences d'expression des gènes même pour les moins exprimés (Figure 86).

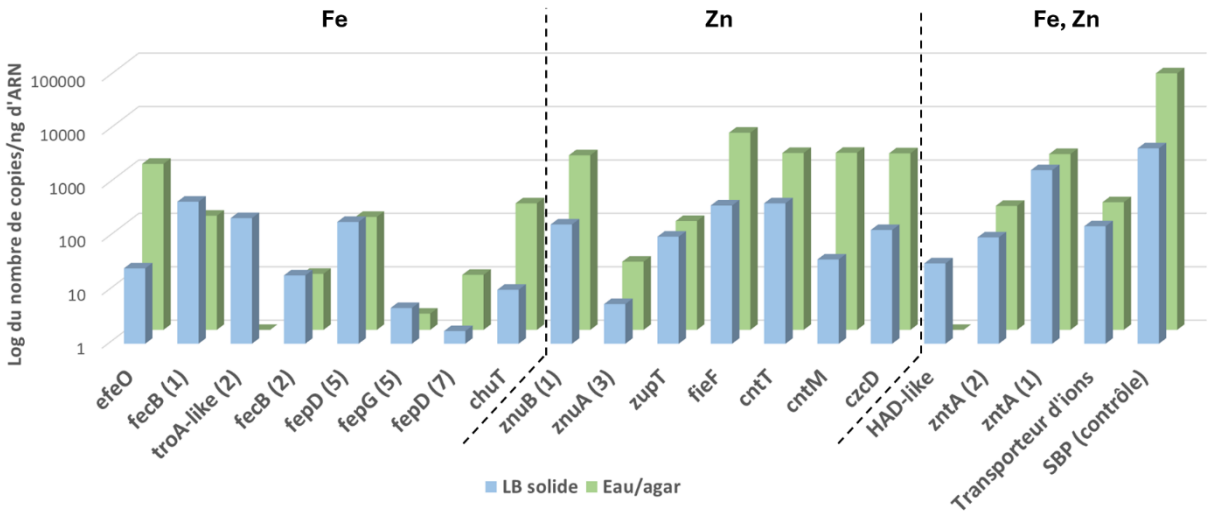


Figure 86 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer et du zinc.

Sur ces résultats, nous pouvons observer une variation de l'expression des gènes en fonction des conditions. Tout d'abord l'expression de la SBP contrôle est plus importante dans les synnemata (eau/agar) avec un nombre de copies/ng d'ARN d'environ 63000 (environ 19 cycles/Cq) contre 4500 (environ 23 Cq) pour la condition LB solide. De manière générale, l'expression des gènes étudiés est très faible. Le gène d'intérêt le plus exprimé est fieF dont l'expression en condition eau/agar avoisine les 4800 copies/ng d'ARN (23ème Cq). Sur l'ensemble des gènes exprimés l'expression moyenne oscille autour de 220 copies/ng d'ARN pour la condition LB solide et 1000 copies/ng d'ARN pour la condition eau/agar.

En comparant les deux conditions, il semblerait que l'expression des gènes étudiés soit plus importante dans les synnemata que dans les colonies. C'est notamment le cas des gènes impliqués dans le transport du zinc (*znuB1*, *znuA3*, *fieF*, *cnt*, *czcD* et *cntM*). Pour le fer, les différences sont moins marquées avec à la fois des gènes plus exprimés en condition pauvre (*efeO*, *fepD* et *chuT*) et en condition riche (*troA-like* qui n'est retrouvé qu'en condition riche et *fepG*). Le gène codant l'ATPase de type-P, *HAD-like*, est également retrouvé uniquement en condition riche (Figure 86).

En couplant les analyses de protéomique avec les résultats de RT-qPCR, malgré des niveaux d'abondance et d'expression relativement faibles, il apparait que certains systèmes de transports sont détectés avec les deux approches et dans les deux milieux de culture d'intérêt (LB solide et synnemata). Parmi ces systèmes, trois transporteurs ABC dont l'opéron *cnt* et le système de transport de la mirubactine, deux ATPases de type-P et un CDF. Par ailleurs, cette analyse comparative suggère que la souche *A. pretiosum* exprime et produit plusieurs systèmes de transport pour le fer et pour le zinc, spécialisés pour certains dans l'import et pour d'autres dans l'export (Tableau 9).

	Fonction putatives des opérons	Fonctions putatives des gènes	Domaines conservés	LB solide		Synnemata	
				Détecté en RT-qPCR	Détectée en protéomique	Détecté en RT-qPCR	Détectée en protéomique
1	ABC transporteur fer	Perméase	FhuB	Non	Oui	Non	Oui
		SBP	FecB (1)	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
		ATPase	FepC (1)	Non	Oui	Non	Oui
2	ABC transporteur fer	ATPase	FepC (2)	Non	Oui	Non	Non
3	ABC transporteur zinc	SBP	ZnuA (1)/TroA-like (1)	Non	Oui	Non	Oui
		Perméase	ZnuB (1)	Oui	Non	Oui	Non
4	ABC transporteur fer	ATPase	FepC (3)	Non	Oui	Non	Non
		SBP	TroA-like (2)	**Oui**	**Oui**	Non	Oui
		Réductase	ViuB	Non	Oui	Non	Oui
5	ABC transporteur fer	SBP	ChuT	Oui	Non	Oui	Non
7	ABC transporteur zinc	Méthyltransferase	CntT	Non	Oui	Non	Oui
		ATPase	CntR	Non	Non	Non	Non
		SBP	CntP	Non	Oui	Non	Oui
		MFS transporteur	CntE	Non	Non	Non	Non
		Staphylopine	CntM	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
		NAS-like	CntL	Non	Oui	Non	Non
		Protéine hypothétique	Protéine hypothétique	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
9	ABC transporteur zinc	SBP	ZnuA (3)	Oui	Non	Oui	Non
10	ABC transporteur fer	SBP	FecB (2)	Oui	Non	Oui	Non
11	ABC transporteur fer	ATPase	FepC (5)	Non	Oui	Non	Oui
		Perméase	FepD (5)	Oui	Non	Oui	Non
12	Exporteur zinc	CDF	CzcD	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
13	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	ZntA (1)	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
14	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	HAD-like	Oui	Non	Non	Non
15	Exporteur Fe/Zn/Cu	ATPase de type-P	ZntA (2)	**Oui**	**Oui**	**Oui**	**Oui**
16	ABC transporteur fer	Perméase	FepG (5)	Oui	Non	Oui	Non
		SBP	FhuD	Non	Oui	Non	Oui
17	Importeur zinc	Transporteur ZIP	ZupT	Oui	Non	Oui	Non
18	ABC transporteur fer	SBP	EfeO	Oui	Non	Oui	Non
19	Sodium/K/Ca	Transporteur d'ions	Transporteur d'ions	Oui	Non	Oui	Non
20	Exporteur de Fe/Zn/Co	CDF	FieF	Non	Oui	Non	Oui
21	ABC transporteur fer	Perméase	FepD (7)	Oui	Non	Oui	Non

Tableau 9 : Comparaison des différents systèmes de transport des métaux détectés en RT-qPCR et/ou protéomique.

Oui = détecté ; Non = non détecté ; / = Non ciblé en RT-qPCR.

Néanmoins, le système de transport de la mirubactine (Tableau 9 ligne 4) est retrouvé en milieu solide riche avec les deux approches mais seule l'analyse en protéomique détecte le système en milieu solide pauvre. A l'inverse, certains gènes ciblés en RT-qPCR sont détectés sans pour autant retrouver la protéine correspondante en protéomique (Tableau 9 ligne 5, 9 ou 10). Ainsi, ces résultats, bien qu'utiles pour comprendre les différents systèmes de transport

exprimés et produits par *A. pretiosum* dans différentes conditions, restent préliminaires. En effet, l'absence de détection des protéines en protéomique peut s'expliquer par la faible expression des gènes en RT-qPCR ou par des mécanismes de modifications post-transcriptionnelles pouvant conduire à la dégradation de l'ARNm (Huch et al., 2023). Ces expériences n'ont été effectuées qu'une fois (n = 1) et nécessiteraient d'être confirmées avec au moins deux autres réplicats biologiques pour valider les résultats et pouvoir identifier les mécanismes de transport majoritaires de la souche.

8. Etude des gènes et protéines impliqués dans la formation du mycélium aérien et la sporulation chez *A. pretiosum*

La thèse s'est focalisée sur le transport et la répartition des métaux chez *A. pretiosum* et plus précisément dans les synnemata. Les données protéomiques obtenues nous ont permis d'élargir les recherches et de s'intéresser à d'autres mécanismes importants du métabolisme de notre souche. Notamment, nous avons étudié les gènes et protéines potentiellement impliqués dans la formation des synnemata et dans les mécanismes de sporulation.

8.1. Gènes impliqués dans la formation des synnemata et spores

Chez *Streptomyces*, le développement du mycélium aérien et la sporulation sont bien identifiés. Comme décrit dans l'introduction, plusieurs protéines sont impliquées dans ces mécanismes. L'affranchissement de la tension de surface du mycélium aérien est permis grâce à différents groupes de gènes : *ram*, *chp*, *rdl*. En période de stress nutritionnel, le processus de sporulation est activé et s'effectue par l'intermédiaire d'une cascade d'activation de protéines qui s'inter-régulent. Parmi elles, le régulateur BldD est central et régule l'activité des protéines Whi, Ssg et ParA pour permettre la septation à l'aide de la protéine DivIVA et pour finir la sporulation (Figure 31A).

Etant donné l'appartenance des bactéries du genre *Actinosynnema* au même phylum que les bactéries du genre *Streptomyces*, nous avons émis l'hypothèse qu'*A. pretiosum* utilise les mêmes mécanismes. Des recherches bio-informatiques ont permis d'identifier 30 gènes dont les fonctions prédites selon les domaines conservés sont proches de celles des gènes connus pour *Streptomyces* (Tableau 10).

Gènes	Protéines	Fonctions prédites	Domaines conservés
FDV56_RS30020	WP_096492527.1	Régulateur transcriptionnel	ramB
FDV56_RS10155	WP_096492731.1	Composant majeur de la matrice du biofilm	tasA
FDV56_RS33730	WP_096496087.1	Protéine de contrôle de la croissance aérienne	whiA
FDV56_RS15185	WP_012782868.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS18610	WP_012783551.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS22485	WP_157767948.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS29080	WP_015800653.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS09415	WP_096497738.1	Facteur sigma d'ARN polymérase de la famille sigma-70	fliA
FDV56_RS04265	WP_096495565.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS34555	WP_015804068.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS12960	WP_232520216.1	Facteur sigma d'ARN polymérase de la famille FliA/WhiG	whiG
FDV56_RS14895	WP_015104912.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS31895	WP_177154679.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS32835	WP_041838582.1	Régulateur transcriptionnel de la famille WhiB	whiB
FDV56_RS33735	WP_015803910.1	Protéine de liaison à l'ADN WhiA	whiA
FDV56_RS33960	WP_015803953.1	Domaine bldD	bldD
FDV56_RS24550	WP_096491010.1	Protéine de la famille de formation du septum	/
FDV56_RS36300	WP_232519687.1	Protéine de la formation du septum	ftsB
FDV56_RS12175	WP_096496455.1	Protéine de division cellulaire	sepF
FDV56_RS12195	WP_096496458.1	Protéine contenant le domaine POTRA de type FtsQ	ftsQ
FDV56_RS23485	WP_096497452.1	Protéine de la famille de formation du septum	/
FDV56_RS30075	WP_015800852.1	Régulateur de sporulation/division cellulaire	ssgA
FDV56_RS32745	WP_015805207.1	Régulateur de sporulation/division cellulaire	ssgA
FDV56_RS12165	WP_015804453.1	Protéine contenant le domaine DivIVA	divIVA
FDV56_RS17300	WP_096491435.1	Protéine contenant le domaine DivIVA	divIVA
FDV56_RS00505	WP_096494856.1	Protéines de sporulation	spo0M
FDV56_RS34255	WP_096496169.1	Protéine d'ancrage	chpA
FDV56_RS20605	WP_096491953.1	Lanthionine synthétase de classe III	lanKC
FDV56_RS20600	WP_096491952.1	Lanthipeptide de la famille SapB/AmfS	sapB
FDV56_RS24110	WP_096490937.1	Sérine/thréonine-protéine kinase	lanKC

Tableau 10 : Gènes et protéines correspondantes du développement du mycélium aérien et de la sporulation chez A. pretiosum.

Parmi les gènes identifiés, la plupart possède des fonctions prédites identiques à ceux de *Streptomyces*. Par exemple, une majorité sont des gènes du groupe *whi*, d'autres sont des gènes de la sporulation : *bldD*, *divIVA*, ou *ssgA*. D'autres gènes sont impliqués dans l'extraction de la tension de surface comme *sapB* ou *chpA*. Deux gènes sont prédits pour coder une lanthionine synthétase et une sérine/thréonine kinase, deux protéines impliquées dans la biosynthèse de lanthipeptides (Hernandez Garcia and Nair, 2023). La formation de ces peptides est également controlé par d'autres gènes du groupe *ramCSAB*. Plus exactement, *ramC* code pour la protéine responsable de la synthèse de ces lanthipeptides en agissant sur SapB (Capstick et al., 2007), dont le gène est également retrouvé par nos analyses. Bien que tous les gènes

connus chez *Streptomyces* ne soient pas identifiés chez *A. pretiosum*, cette dernière semble utiliser les mêmes mécanismes dans la formation du mycélium aérien et la sporulation.

8.2. Analyses protéomiques

En s'intéressant aux protéines codées par les gènes identifiés précédemment, nous avons mis en évidence que la majorité d'entre elles étaient détectées en protéomique (Figure 87).

Protéines	Homologie	LB liquide	TSB$^{1/50ème}$ liquide	LB solide	TSB$^{1/100ème}$ solide
WP_096492527.1	RamB				
WP_096492731.1	TasA				0,000427644
WP_232520216.1	WhiG				
WP_015803910.1	WhiA				
WP_015803953.1	BldD	0,000803432	0,000639551	0,00086125	0,000918047
WP_096491010.1	/				
WP_096496455.1	SepF				
WP_015804453.1	DivIVA	0,000783796	0,000589481	0,000690954	0,000797765
WP_096494856.1	Spo0M				
WP_096496169.1	ChpA				
WP_096490937.1	LanKC				
WP_096497328.1	RsiG				
WP_198320565.1	ParA				
WP_015804458.1	FtsZ	0,000816461	0,00059804	0,000706629	0,000440565
WP_096490939.1	FtsW				
WP_096491395.1	FtsK				
WP_096496495.1	FtsK				
WP_232519745.1	Spo0M	0,00030512	0,000565512	0,000268314	0,000350834

% NSAF 0 0.001

Figure 87 : Heatmap des protéines détectées en protéomique et impliquées dans la formation du mycélium aérien et la sporulation.

Compte tenu de la forte implication de ces protéines dans la formation du mycélium aérien, nous avions émis l'hypothèse que leur présence était majoritairement retrouvée en conditions solide pauvre (Yagüe et al., 2012). C'est le cas d'une protéine présentant un domaine conservé TasA, connue chez *B. subtilis* pour être un composant majeur des biofilms (Álvarez-Mena et al., 2020), et une autre protéine homologue de RsiG qui est décrite pour activer WhiG et permettre la sporulation (Schumacher et al., 2021). En réalité, des études effectuées sur les bactéries du genre *Streptomyces* ont démontré que la sporulation pouvait également être effectuée en milieu liquide (Manteca et al., 2008). En effet, en comparant les profils d'expression des protéines de la sporulation et du mycélium aérien de notre souche, certaines sont retrouvées dans toutes les conditions de cultures avec une abondance relativement

importante par rapport aux autres. C'est le cas des protéines homologues de BldD, DivIVA, FtsZ et Spo0M (WP_232519745.1). Les trois premières sont les plus abondantes et leur rôle est bien connu dans la formation des spores chez *Streptomyces*. BldD est une protéine régulatrice inhibant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la sporulation dont *ftsZ* (Mouri et al., 2017). En effet, la protéine FtsZ est moins abondante en conditions $TSB^{1/50ème}$ liquide, en LB solide et en $TSB^{1/100ème}$ solide, des conditions où BldD est abondante. Néanmoins, cette observation ne s'applique pas à la condition LB liquide, où BldD et FtsZ sont retrouvées avec la même abondance. D'autres protéines, WhiA et WhiG, sont codés par des gènes également régulés par BldD et sont quant à elles très faiblement retrouvées dans les quatre conditions. Il est intéressant de noter que BldD régule négativement l'expression des gènes codant SsgA et SsgB, gènes présents sur le chromosome d'*A. pretiosum* mais dont les protéines ne sont pas détectées en protéomique.

En raison de la nature régulatrice de BldD sur l'expression de plusieurs gènes, il serait pertinent de compléter ces études de protéomique avec des expériences de RT-qPCR pour vérifier si l'expression des gènes est effectivement inhibée en présence de BldD. Par ailleurs, la technique de retard sur gel pourrait fournir des éléments de réponses plus directs en identifiant les potentiels interactions de BldD sur les régions promotrices des gènes identifiés (*ftsZ*, *whiA*, *whiG*, *ssgA* et *ssgB*). Ces analyses protéomiques ont également permis d'identifier certaines protéines du développement étaient présentes mais avec une abondance relativement faible. Ainsi, d'autres protéines plus faiblement abondantes pourraient ne pas être détectables mais quand même présentes dans les cellules. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des gènes codant ces protéines et en sélectionner pour construire des mutants afin de voir s'ils ont un impact sur la formation du mycélium et des spores et comprendre leur fonction dans notre souche.

Conclusion générale et perspectives

Les études menées au cours de cette thèse nous ont permis d'aborder plusieurs aspects d'*A. mirum* et *A. pretiosum*. Les images de microscopie électronique ont permis de réactualiser les données concernant la structure des synnemata et leur diversité morphologique. Les cellules des filaments ont une taille relativement régulière d'environ 2 µm et semblent être liées entre elles par des jonctions fortes. Par ailleurs, ces images ont révélé la présence de vacuoles au niveau de ces jonctions et pouvant s'apparenter à des gouttelettes lipidiques dont le rôle pourrait être lié à l'échange de ressources entre cellules. Cependant, leur nature reste à évaluer, et aux vues des données de XRF que nous avons obtenues, d'autres hypothèses pourraient être évoquées comme nous le décrirons après. Dans le cadre de l'étude du partage des ressources, des analyses approfondies en imagerie XRF ont démontré que les métaux sont présents de la base du synnemata jusqu'à l'extrémité des filaments suggérant des mécanismes de transport au sein de ces synnemata. Plus précisément, nous avons mis en évidence une colocalisation régulière de certains métaux tels que le zinc, le fer, le phosphore et le calcium au sein des cellules. Ces éléments semblent suivre un pattern de répartition de 2 µm puis de 0,4 µm environ, pouvant être expliqué par l'enchainement des cellules entre elles et une répartition des métaux aux pôles de chaque cellule (Figure 88).

Ainsi, il semblerait que les jonctions cellulaires soient un véritable carrefour d'échange de ressources entre les cellules des synnemata que ce soit d'un point de vue énergétique ou nutritionnel. Néanmoins, s'il est possible d'isoler un filament du mycélium aérien pour visualiser la distribution des métaux ce n'est pas le cas pour les filaments à la base du synnemata ainsi que ceux présents au sein du mycélium végétatif. De nouvelles cartographies issues de coupes permettraient d'identifier la répartition des métaux dans ces zones et de confirmer la présence de ce schéma dans les cellules quel que soit leur localisation vis-à-vis du substrat. Par ailleurs, effectuer de nouvelles cartographies XRF sur des cultures en milieux riche permettraient également de vérifier si ce schéma dépend de la richesse du milieu ou si c'est un schéma de répartition des nutriments constitutif. Également, il serait intéressant de mieux caractériser les jonctions entre les cellules dans les filaments. Notamment, essayer de marquer ces gouttelettes lipidiques avec des sondes (Nile Red) afin de confirmer ou pas leur nature. Il est également possible que ces gouttelettes que l'on voit à proximité des jonctions cellulaires soient des granules de polyphosphate. Cela expliquerait en partie la colocalisation de cet élément avec des métaux divalents que l'on observe fréquemment sur nos images de nanoXRF, sachant que les groupements phosphates ont une affinité relativement importante avec l'ensembles des métaux divalent (Maki et al., 2013). Pour apporter de nouveaux éléments sur

cette question il serait intéressant de réaliser de nouvelles images de microscopie électronique couplée avec une sonde EDS pour obtenir une cartographie des éléments dans ces jonctions. Dans l'hypothèse où ces gouttelettes seraient des complexes phosphate-métal, une autre approche serait d'étudier la phase riche en métaux (située donc à l'extrémité des cellules) par l'intermédiaire de d'une approche spectroscopique (*X-ray absorption near-edge structure*, nanoXANES) comme cela a déjà été décrit chez des bactéries magnétotactiques (Chevrier et al., 2022). Il serait aussi intéressant d'étendre l'usage des sondes fluorescentes pour la détection des éléments comme le zinc, le calcium ou le fer et ainsi compléter les informations obtenues en XRF.

Nos analyses en RT-qPCR croisées avec les données de protéomique ont également permis d'identifier des transporteurs *a priori* présents dans nos souches. Parmi eux sont retrouvés l'opéron *cnt*, divers exporteurs d'ions incluant le fer et le zinc ainsi que deux transporteurs ABC pour le fer. Les faibles abondances retrouvées pour les protéines de transport ainsi que les ARNs correspondants peuvent être discutées de deux manières. Une façon d'analyser nos données est qu'il peut s'agir d'une limite technique puisque ces transporteurs sont minoritaires vis-à-vis de l'ensemble du protéome de nos souches ce qui les rend difficilement détectables. Ces premières analyses nous permettent néanmoins d'avoir identifié des transporteurs d'intérêt qui pourront être analysés plus précisément avec des techniques plus quantitatives pour mieux appréhender l'effet de nos conditions de culture sur leur expression. Par exemple, étudier l'effet d'un gradient de concentration du fer et/ou du zinc dans le milieu sur l'expression des transporteurs. Par ailleurs, effectuer des mutants pour ces transporteurs permettraient de confirmer ou d'infirmer leur rôle dans l'homéostasie de ces métaux. Dans un second temps, le fait que ces transporteurs soient minoritaires pourrait s'expliquer par leur localisation au niveau des jonctions cellulaires qui représentent une très faible portion de la cellule et qui viendrait confirmer, là encore, ce carrefour d'échange entre cellules (Figure 88). Étudier la localisation de certains de ces transporteurs devient donc important et, outre l'immunolocalisation, des études de fusion traductionnelles entre un transporteur et un rapporteur (luciférase ou GFP par exemple) devraient permettre d'apporter des éléments de réflexion.

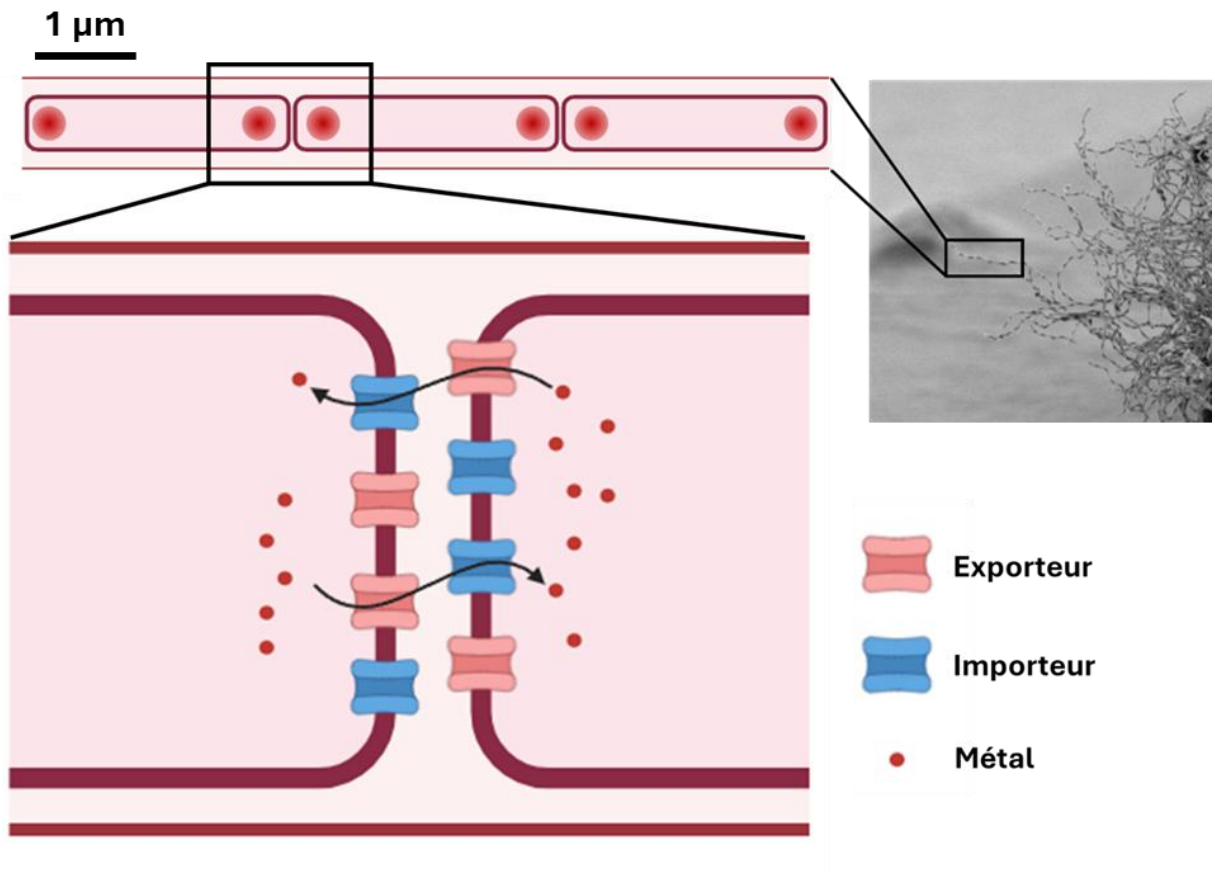


Figure 88 : Représentation schématique du carrefour d'échange des métaux entre deux cellules.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour tester notre modèle et mieux comprendre les mécanismes de transport utilisés, la localisation précise des transporteurs et le rôle des métallophores dans l'échange des métaux. Dans cette optique d'identifier la localisation précise des transporteurs, nous avions initié des travaux visant à surproduire les différentes ZnuA afin de les purifier. L'idée était dans un premier temps d'étudier et caractériser la région originale de la ZnuA3 et de voir si ces différentes protéines (ZnuA1, 2 et 3) avaient des affinités différentes pour le zinc. Toutefois, la production des ZnuA s'est avérée infructueuse en raison de la formation de corps d'inclusion rendant difficile leur purification et leur caractérisation. Il serait intéressant de produire des anticorps monoclonaux couplés à des nanoparticules d'or pour ensuite visualiser ces dernières en MET et ainsi localiser indirectement les transporteurs ZnuABC dans nos cellules. Dans ce cas, sachant que les trois protéines ZnuA présentent des régions homologues, deux approches sont possibles : (1) les anticorps sont spécifiques des trois ZnuA auquel cas l'analyse microscopique nous permettra uniquement d'obtenir la localisation des ZnuA de manière générale (sans pouvoir les distinguer) ; (2)

sélectionner des anticorps spécifiques de chacune des ZnuA par l'intermédiaire de purification pour pouvoir identifier la localisation précise de chacune des protéines.

Bien qu'un seul métallophore, la staphylopine, ait été identifié dans nos expériences et nos conditions, plusieurs gènes permettant la synthèse de métallophores sont codés sur le génome d'*A. mirum* et *A. pretiosum*. Cela soulève la question de leur implication et leur rôle dans l'acquisition des métaux au sein des filaments. L'opéron *cnt*, qui permet la synthèse de la staphylopine, sa sécrétion ainsi que sa recapture une fois complexée au métal, présente également un gène codant une méthyltransférase capable de méthyler la staphylopine. L'hypothèse qui découle de cette observation serait que la méthylation de la staphylopine lui permettrait d'être sécrétée dans la gaine hydrophobe. Ceci lui permettrait d'être préférentiellement localisée dans la gaine hydrophobe entourant un filament et permettrait la capture de métaux libérés dans cette zone pour être recapturés par les cellules sous forme métallophore/métal. Ces observations auraient pu être validées grâce aux fusions transcriptionnelles avec les promoteurs d'intérêt et le rapporteur mNeonGreen. Néanmoins, bien que l'opéron *cnt* soit détecté à la fois en protéomique et en RT-qPCR et que les opérons *znuABC1* et *znuABC3* soient détectés uniquement en RT-qPCR, aucune fluorescence n'a été détectée, et cela quel que soit le type de milieu. Comme décrit précédemment, cela pourrait s'expliquer par une très faible expression de ces opérons qui ne pourraient donc pas produire suffisamment de fluorescence pour qu'elle soit détectée.

Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur le transport et la répartition des métaux au sein des synnemata. Néanmoins, l'accès aux données de protéomique des différentes cultures d'*A. mirum* et *A. pretiosum* nous ont permis d'élargir nos recherches et nous nous sommes intéressés aux protéines impliquées dans la formation du mycélium aérien. En effet, si ces dernières sont bien décrites chez les *Streptomyces* (Claessen et al., 2004), appartenant au même phylum que nos souches, aucune étude n'a décrit ni la présence ni le rôle de ces protéines chez les bactéries du genre *Actinosynnema*. Ainsi, nous avons détecté plusieurs protéines présentant des domaines conservés avec les protéines connues dans la formation du mycélium de *Streptomyces* : FtsZ, DivIVA, BldD, RamB et Spo0M. Néanmoins, ces protéines présentent une faible abondance et nos analyses ont été faites sur des synnemata matures (200 µm) qui ont pu se développer grâce à l'extraction de la tension de surface. Des études similaires menées sur des cultures plus jeunes avec des synnemata en devenir permettraient probablement une abondance plus importante de ces protéines et de mieux définir si ces dernières sont bien

produites chez *Actinosynnema* étudiées. D'autres gènes/protéines comme les *rodlins* et les *chaplins* (connues chez certains *Streptomyces* comme jouant un rôle dans l'extraction de la tension de surface pour la formation du mycélium aérien) sont absentes des génomes de *A. mirum* et *A. pretiosum*, suggérant des mécanismes ici aussi originaux pour remplir ces fonctions.

Pour finir, les études menées au cours de cette thèse ont établi de nouvelles connaissances sur la répartition des métaux dans les structures aériennes des bactéries du genre *Actinosynnema*. Les métaux sont présents tout au long du synnemata et, à l'échelle cellulaire, nous constatons qu'au moins certain d'entre eux sont localisés et accumulés au niveau des jonctions cellulaires. Sur la base de ces observations ainsi que de l'analyse des niveaux d'expression de nombreux transporteurs de métaux, nous proposons un système de partage innovant dans lequel les transporteurs de métaux ne seraient localisés qu'au niveau des jonctions entre bactéries adjacentes, permettant ainsi un mode de transport économique et efficace sur de longues distances.

« Les aventures n'ont-elles jamais de fin ? Je suppose que non. Quelqu'un d'autre doit toujours continuer l'histoire. » - Sam Gamegie

Références bibliographiques

A

Adams, M.D., Wagner, L.M., Graddis, T.J., Landick, R., Antonucci, T.K., Gibson, A.L., Oxender, D.L., 1990. Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 265, 11436–11443. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38417-0

Adnani, N., Rajski, S.R., Bugni, T.S., 2017. Symbiosis-inspired Approaches to Antibiotic Discovery. Nat. Prod. Rep. 34, 784–814. https://doi.org/10.1039/c7np00009j

Aguiar, M.S., Carvalho, A.L., Oliveira, E.A., 2023. Characterization of amylase, lipase and xylanase produced by actinobacteria cultivated in licuri [Syagrus coronata - (Martius) Beccari] residues. Rev. Biotecnol. Ciênc. ISSN 2238-6629 12, e13183. https://doi.org/10.31668/rbc.v12i0.13183

Akpe San Roman, S., Facey, P.D., Fernandez-Martinez, L., Rodriguez, C., Vallin, C., Del Sol, R., Dyson, P., 2010. A heterodimer of EsxA and EsxB is involved in sporulation and is secreted by a type VII secretion system in Streptomyces coelicolor. Microbiology 156, 1719–1729. https://doi.org/10.1099/mic.0.037069-0

Alhameed, R.A., Semreen, M.H., Hamad, M., Giddey, A.D., Sulaiman, A., Al Bataineh, M.T., Al-Hroub, H.M., Bustanji, Y., Alzoubi, K.H., Soares, N.C., 2023. Multi-Omics Profiling of Candida albicans Grown on Solid Versus Liquid Media. Microorganisms 11, 2831. https://doi.org/10.3390/microorganisms11122831

Álvarez-Mena, A., Cámara-Almirón, J., de Vicente, A., Romero, D., 2020. Multifunctional Amyloids in the Biology of Gram-Positive Bacteria. Microorganisms 8, 2020. https://doi.org/10.3390/microorganisms8122020

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., 2006. Zinc through the three domains of life. J. Proteome Res. 5, 3173–3178. https://doi.org/10.1021/pr0603699

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M., 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem. 13, 1205–1218. https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quiñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol. Rev. 27, 215–237. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X

Angert, E.R., 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 3, 214–224. https://doi.org/10.1038/nrmicro1096

Asamizu, S., Abugreen, M., Mahmud, T., 2013. Comparative Metabolomic Analysis of an Alternative Biosynthetic Pathway to Pseudosugars in Actinosynnema mirum DSM 43827. ChemBioChem 14, 1548–1551. https://doi.org/10.1002/cbic.201300384

B

Bandi, Srinivasulu, Kim, Y.J., Chang, Y.-K., Shang, G., Floss, T.-W.Y. and H.G., 2006. Construction of asm2 Deletion Mutant of Actinosynnema pretiosum and Medium Optimization for Ansamitocin P-3 Production Using Statistical Approach 16, 1338–1346.

Banin, E., Vasil, M.L., Greenberg, E.P., 2005. Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 11076–11081. https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102

Bao, Y., Dolfing, J., Guo, Z., Chen, R., Wu, M., Li, Z., Lin, X., Feng, Y., 2021. Important ecophysiological roles of non-dominant Actinobacteria in plant residue decomposition, especially in less fertile soils. Microbiome 9, 84. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01032-x

Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., Restaino, O.F., 2021. Streptomycetes as platform for biotechnological production processes of drugs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 551–568. https://doi.org/10.1007/s00253-020-11064-2

Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Wezel, G.P. van, 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 80, 1–43. https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15

Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N., Tolker-Nielsen, T., 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Environ. Microbiol. 10, 2331–2343. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x

Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F.-X., Leblond, P., Pernodet, J.-L., Challis, G.L., 2006. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in Streptomyces coelicolor A3(2) and Streptomyces ambofaciens ATCC 23877. Microbiol. Read. Engl. 152, 3355–3366. https://doi.org/10.1099/mic.0.29161-0

Barry, S.M., Challis, G.L., 2009. Recent advances in siderophore biosynthesis. Curr. Opin. Chem. Biol., Molecular Diversity 13, 205–215. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.008

Bearden, S.W., Perry, R.D., 1999. The Yfe system of Yersinia pestis transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. Mol. Microbiol. 32, 403–414. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01360.x

Becker, F., Wienand, K., Lechner, M., Frey, E., Jung, H., 2018. Interactions mediated by a public good transiently increase cooperativity in growing Pseudomonas putida metapopulations. Sci. Rep. 8, 4093. https://doi.org/10.1038/s41598-018-22306-9

Bédard, A.-S.V., Hien, E.D.M., Lafontaine, D.A., 2020. Riboswitch regulation mechanisms: RNA, metabolites and regulatory proteins. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. 1863, 194501. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2020.194501

Behrenfeld, M.J., Kolber, Z.S., 1999. Widespread iron limitation of phytoplankton in the south pacific ocean. Science 283, 840–843. https://doi.org/10.1126/science.283.5403.840

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2). Nature 417, 141–147. https://doi.org/10.1038/417141a

Bergeijk, D.A. van, Terlouw, B.R., Medema, M.H., Wezel, G.P. van, 2020. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. Nat. Rev. Microbiol. 18, 546–558. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y

Berntsson, R.P.-A., Smits, S.H.J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., Poolman, B., 2010. A structural classification of substrate-binding proteins. FEBS Lett., Gothenburg Special Issue: Molecules of Life 584, 2606–2617. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043

Bhatti, A.A., Haq, S., Bhat, R.A., 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. Microb. Pathog. 111, 458–467. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036

Bhubhanil, S., Sittipo, P., Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., Mongkolsuk, S., 2014. Control of zinc homeostasis in Agrobacterium tumefaciens via zur and the zinc uptake genes znuABC and zinT. Microbiology 160, 2452–2463. https://doi.org/10.1099/mic.0.082446-0

Bignell, D.R.D., Seipke, R.F., Huguet-Tapia, J.C., Chambers, A.H., Parry, R.J., Loria, R., 2010. Streptomyces scabies 87-22 Contains a Coronafacic Acid-Like Biosynthetic Cluster That Contributes to Plant–Microbe Interactions. Mol. Plant-Microbe Interactions® 23, 161–175. https://doi.org/10.1094/MPMI-23-2-0161

Binda, C., Lopetuso, L.R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., Gasbarrini, A., 2018. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. Dig. Liver Dis. 50, 421–428. https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012

Blindauer, C.A., 2008. Zinc-Handling in Cyanobacteria: An Update. Chem. Biodivers. 5, 1990–2013. https://doi.org/10.1002/cbdv.200890183

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J., Robinson, N.J., 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. Mol. Microbiol. 45, 1421–1432. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03109.x

Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrière, G.M., Waddell, S.J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P.D., Castagnoli, P.R., Gicquel, B., de Chastellier, C., Neyrolles, O., 2011. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. Cell Host Microbe 10, 248–259. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006

Boudehen, Y.-M., Faucher, M., Maréchal, X., Miras, R., Rech, J., Rombouts, Y., Sénèque, O., Wallat, M., Demange, P., Bouet, J.-Y., Saurel, O., Catty, P., Gutierrez, C., Neyrolles, O., 2022. Mycobacterial resistance to zinc poisoning requires assembly of P-ATPase-containing membrane metal efflux platforms. Nat. Commun. 13, 4731. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32085-7

Bradley, J.M., Svistunenko, D.A., Wilson, M.T., Hemmings, A.M., Moore, G.R., Brun, N.E.L., 2020. Bacterial iron detoxification at the molecular level. J. Biol. Chem. 295, 17602–17623. https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007746

Brown, J.B., Lee, M.A., Smith, A.T., 2021. Ins and outs: recent advancements in membrane protein-mediated prokaryotic ferrous iron transport. Biochemistry 60, 3277–3291. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00586

Budrene, E.O., Berg, H.C., 1995. Dynamics of formation of symmetrical patterns by chemotactic bacteria. Nature 376, 49–53. https://doi.org/10.1038/376049a0

Bush, M.J., Gallagher, K.A., Chandra, G., Findlay, K.C., Schlimpert, S., 2022. Hyphal compartmentalization and sporulation in Streptomyces require the conserved cell division protein SepX. Nat. Commun. 13, 71. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27638-1

Büttner, H., Mack, D., Rohde, H., 2015. Structural basis of Staphylococcus epidermidis biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5, 14. https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014

C

Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem. 58, 79–110. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455

Caldas, T.D., Yaagoubi, A.E., Richarme, G., 1998. Chaperone Properties of Bacterial Elongation Factor EF-Tu *. J. Biol. Chem. 273, 11478–11482. https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11478

Cámara, M., Hardman, A., Williams, P., Milton, D., 2002. Quorum sensing in Vibrio cholerae. Nat. Genet. 32, 217–218. https://doi.org/10.1038/ng1002-217

Cao, J., Woodhall, M.R., Alvarez, J., Cartron, M.L., Andrews, S.C., 2007. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe2+ transporter that is cryptic in Escherichia coli K-12 but functional in E. coli O157:H7. Mol. Microbiol. 65, 857–875. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05802.x

Capdevila, D.A., Wang, J., Giedroc, D.P., 2016. Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface *. J. Biol. Chem. 291, 20858–20868. https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742023

Capstick, D.S., Willey, J.M., Buttner, M.J., Elliot, M.A., 2007. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in Streptomyces coelicolor. Mol. Microbiol. 64, 602–613. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05674.x

Carvalho, P.C., Hewel, J., Barbosa, V.C., Yates, J.R., 2008. Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. Genet. Mol. Res. GMR 7, 342–356.

Castañeda-Tamez, P., Ramírez-Peris, J., Pérez-Velázquez, J., Kuttler, C., Jalalimanesh, A., Saucedo-Mora, M.Á., Jiménez-Cortés, J.G., Maeda, T., González, Y., Tomás, M., Wood, T.K., García-Contreras, R., 2018. Pyocyanin Restricts Social Cheating in Pseudomonas aeruginosa. Front. Microbiol. 9, 1348. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01348

Chadwick, G.L., Jiménez Otero, F., Gralnick, J.A., Bond, D.R., Orphan, V.J., 2019. NanoSIMS imaging reveals metabolic stratification within current-producing biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 20716–20724. https://doi.org/10.1073/pnas.1912498116

Challis, G.L., Hopwood, D.A., 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 Suppl 2, 14555–14561. https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100

Chandrangsu, P., Rensing, C., Helmann, J.D., 2017. Metal Homeostasis and Resistance in Bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 15, 338–350. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15

Chaoprasid, P., Dokpikul, T., Johnrod, J., Sirirakphaisarn, S., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., Mongkolsuk, S., 2016. Agrobacterium tumefaciens Zur Regulates the High-Affinity Zinc Uptake System TroCBA and the Putative Metal Chaperone YciC, along with ZinT and ZnuABC, for Survival under Zinc-Limiting Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 82, 3503–3514. https://doi.org/10.1128/AEM.00299-16

Chater, K.F., 2006. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361, 761–768. https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1758

Cheng, Y., Yang, R., Lyu, M., Wang, S., Liu, X., Wen, Y., Song, Y., Li, J., Chen, Z., 2018. IdeR, a DtxR Family Iron Response Regulator, Controls Iron Homeostasis, Morphological Differentiation, Secondary Metabolism, and the Oxidative Stress Response in Streptomyces avermitilis. Appl. Environ. Microbiol. 84, e01503-18. https://doi.org/10.1128/AEM.01503-18

Chevrette, M.G., Carlson, C.M., Ortega, H.E., Thomas, C., Ananiev, G.E., Barns, K.J., Book, A.J., Cagnazzo, J., Carlos, C., Flanigan, W., Grubbs, K.J., Horn, H.A., Hoffmann, F.M., Klassen, J.L., Knack, J.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Muller, L., Melo, W.G.P., Pinto-Tomás, A.A., Schmitz, A., Wendt-Pienkowski, E., Wildman, S., Zhao, M., Zhang, F., Bugni, T.S., Andes, D.R., Pupo, M.T., Currie, C.R., 2019. The antimicrobial potential of Streptomyces from insect microbiomes. Nat. Commun. 10, 516. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0

Chevrier, D.M., Cerdá-Doñate, E., Park, Y., Cacho-Nerin, F., Gomez-Gonzalez, M., Uebe, R., Faivre, D., 2022. Synchrotron-Based Nano-X-Ray Absorption Near-Edge Structure Revealing Intracellular Heterogeneity of Iron Species in Magnetotactic Bacteria. Small Sci. 2, 2100089. https://doi.org/10.1002/smsc.202100089

Chi, X., Ogunsade, O.O., Zhou, Z., Li, Z., Li, X., Zhang, M., Song, F., Wang, J., Hammad, M.A., Zhang, X., Zhang, S., Wan, X., Zhang, L., Zhang, C., Liu, P., 2020. Lipid Droplet Is an Ancient and Inheritable Organelle in Bacteria. https://doi.org/10.1101/2020.05.18.103093

Choby, J.E., Skaar, E.P., 2016. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. J. Mol. Biol., Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions 428, 3408–3428. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.018

Choi, J.-H., Abe, N., Tanaka, H., Fushimi, K., Nishina, Y., Morita, A., Kiriiwa, Y., Motohashi, R., Hashizume, D., Koshino, H., Kawagishi, H., 2010. Plant-Growth Regulator, Imidazole-4-Carboxamide, Produced by the Fairy Ring Forming Fungus Lepista sordida. J. Agric. Food Chem. 58, 9956–9959. https://doi.org/10.1021/jf101619a

Christie-Oleza, J.A., Fernandez, B., Nogales, B., Bosch, R., Armengaud, J., 2012. Proteomic insights into the lifestyle of an environmentally relevant marine bacterium. ISME J. 6, 124–135. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.86

Chung, J., Byng, G.S., 2004. Mutant Actinosynnema pretiosum strain with increased maytansinoid production. US6790954B2.

Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F.G.H., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.B., 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. Genes Dev. 17, 1714–1726. https://doi.org/10.1101/gad.264303

Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Søgaard-Andersen, L., van Wezel, G.P., 2014. Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. Nat. Rev. Microbiol. 12, 115–124. https://doi.org/10.1038/nrmicro3178

Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.B., 2004. The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlins and chaplins. Mol. Microbiol. 53, 433–443. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04143.x

Claessen, D., Wösten, H.A.B., Keulen, G. van, Faber, O.G., Alves, A.M.C.R., Meijer, W.G., Dijkhuizen, L., 2002. Two novel homologous proteins of Streptomyces coelicolor and Streptomyces lividans are involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. Mol. Microbiol. 44, 1483–1492. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02980.x

Clair, G., Roussi, S., Armengaud, J., Duport, C., 2010. Expanding the Known Repertoire of Virulence Factors Produced by Bacillus cereus through Early Secretome Profiling in Three Redox Conditions. Mol. Cell. Proteomics MCP 9, 1486–1498. https://doi.org/10.1074/mcp.M000027-MCP201

Clardy, J., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. Nat. Biotechnol. 24, 1541–1550. https://doi.org/10.1038/nbt1266

Contreras-Moreno, F.J., Muñoz-Dorado, J., García-Tomsig, N.I., Martínez-Navajas, G., Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., 2020. Copper and Melanin Play a Role in Myxococcus xanthus Predation on Sinorhizobium meliloti. Front. Microbiol. 11, 94. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00094

Contreras-Moreno, F.J., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., 2024. Myxococcus xanthus predation: an updated overview. Front. Microbiol. 15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1339696

Corno, G., Jürgens, K., 2006. Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity. Appl. Environ. Microbiol. 72, 78–86. https://doi.org/10.1128/aem.72.1.78-86.2006

Coronel-Tellez, R.H., Pospiech, M., Barrault, M., Liu, W., Bordeau, V., Vasnier, C., Felden, B., Sargueil, B., Bouloc, P., 2022. sRNA-controlled iron sparing response in Staphylococci. Nucleic Acids Res. 50, 8529–8546. https://doi.org/10.1093/nar/gkac648

Corral-Lugo, A., De la Torre, J., Matilla, M.A., Fernández, M., Morel, B., Espinosa-Urgel, M., Krell, T., 2016. Assessment of the contribution of chemoreceptor-based signalling to biofilm formation. Environ. Microbiol. 18, 3355–3372. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13170

Côté, R.G., Griss, J., Dianes, J.A., Wang, R., Wright, J.C., van den Toorn, H.W.P., van Breukelen, B., Heck, A.J.R., Hulstaert, N., Martens, L., Reisinger, F., Csordas, A., Ovelleiro, D., Perez-Rivevol, Y., Barsnes, H., Hermjakob, H., Vizcaíno, J.A., 2012. The PRoteomics IDEntification (PRIDE) Converter 2 Framework: An Improved Suite of Tools to Facilitate Data Submission to the PRIDE Database and the ProteomeXchange Consortium. Mol. Cell. Proteomics MCP 11, 1682–1689. https://doi.org/10.1074/mcp.O112.021543

Creamer, K.E., Kudo, Y., Moore, B.S., Jensen, P.R., 2021. Phylogenetic analysis of the salinipostin γ-butyrolactone gene cluster uncovers new potential for bacterial signalling-molecule diversity. Microb. Genomics 7, 000568. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000568

Culotta, V.C., Yang, M., O'Halloran, T.V., 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Biochim. Biophys. Acta 1763, 747–758. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.003

D

Dayel, M.J., King, N., 2014. Prey Capture and Phagocytosis in the Choanoflagellate Salpingoeca rosetta. PLOS ONE 9, e95577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095577

de Lima Júnior, A.A., de Sousa, E.C., de Oliveira, T.H.B., de Santana, R.C.F., da Silva, S.K.R., Coelho, L.C.B.B., 2023. Genus Streptomyces: Recent advances for biotechnological purposes. Biotechnol. Appl. Biochem. 70, 1504–1517. https://doi.org/10.1002/bab.2455

De Samber, B., De Rycke, R., De Bruyne, M., Kienhuis, M., Sandblad, L., Bohic, S., Cloetens, P., Urban, C., Polerecky, L., Vincze, L., 2020. Effect of sample preparation techniques upon single cell chemical imaging: A practical comparison between synchrotron radiation based X-ray fluorescence (SR-XRF) and Nanoscopic Secondary Ion Mass Spectrometry (nano-SIMS). Anal. Chim. Acta 1106, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.054

Defeu Soufo, H.J., Reimold, C., Breddermann, H., Mannherz, H.G., Graumann, P.L., 2015. Translation Elongation Factor EF-Tu Modulates Filament Formation of Actin-Like MreB Protein In Vitro. J. Mol. Biol. 427, 1715–1727. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.025

Demain, A.L., Sanchez, S., 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. J. Antibiot. (Tokyo) 62, 5–16. https://doi.org/10.1038/ja.2008.16

Deo, P.N., Deshmukh, R., 2019. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP 23, 122–128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18

Dial, C.N., Eichinger, S.J., Foxall, R., Corcoran, C.J., Tischler, A.H., Bolz, R.M., Whistler, C.A., Visick, K.L., 2021. Quorum Sensing and Cyclic di-GMP Exert Control Over Motility of Vibrio fischeri KB2B1. Front. Microbiol. 12, 690459. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690459

Díaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jiménez-Fernández, A., Wirebrand, L., Velasco-Domínguez, M.G., López-Sánchez, A., Shingler, V., Govantes, F., 2017. The

stringent response promotes biofilm dispersal in Pseudomonas putida. Sci. Rep. 7, 18055. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18518-0

Dietrich, L.E.P., Teal, T.K., Price-Whelan, A., Newman, D.K., 2008. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. Science 321, 1203–1206. https://doi.org/10.1126/science.1160619

Ding, Y., Fu, Y., Lee, J.C., Hooper, D.C., 2012. Staphylococcus aureus NorD, a putative efflux pump coregulated with the Opp1 oligopeptide permease, contributes selectively to fitness in vivo. J. Bacteriol. 194, 6586–6593. https://doi.org/10.1128/JB.01414-12

Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R.A., Taufa, T., 2022. parte. Microbiol. Res. 13, 418–465. https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031

Dong, X., 2023. Fairy circle tales. Proc. Natl. Acad. Sci. 120, e2314908120. https://doi.org/10.1073/pnas.2314908120

Dong, Y., Dong, H., Feng, Z., Wang, X., Yao, Q., Zhu, H., 2022. A Disturbed Siderophore Transport Inhibits Myxobacterial Predation. Cells 11, 3718. https://doi.org/10.3390/cells11233718

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063

Drechsel, H., Freund, S., Nicholson, G., Haag, H., Jung, O., Zähner, H., Jung, G., 1993. Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from staphylococci. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. 6, 185–192. https://doi.org/10.1007/BF00205858

Drew, D., North, R.A., Nagarathinam, K., Tanabe, M., 2021. Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). Chem. Rev. 121, 5289. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983

Ducret, V., Gonzalez, D., Perron, K., 2023. Zinc homeostasis in Pseudomonas. Biometals 36, 729–744. https://doi.org/10.1007/s10534-022-00475-5

Dunne, E.F., Burman, W.J., Wilson, M.L., 1998. Streptomyces Pneumonia in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection: Case Report and Review of the Literature on Invasive Streptomyces Infections. Clin. Infect. Dis. 27, 93–96. https://doi.org/10.1086/514612

Dupierris, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., 2009. A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. Bioinformatics 25, 1980–1981. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp301

Dworkin, M., 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 84, 250–257. https://doi.org/10.1128/jb.84.2.250-257.1962

Dyson, P., 2009. Streptomyces, in: Schaechter, M. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 318–332. https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00037-7

Dziewanowska, K., Settles, M., Hunter, S., Linquist, I., Schilkey, F., Hartzell, P.L., 2014. Phase Variation in Myxococcus xanthus Yields Cells Specialized for Iron Sequestration. PLOS ONE 9, e95189. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095189

E

El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., Latrache, H., 2021. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in *Actinobacteria*. Int. J. Microbiol. 2021, e6637438. https://doi.org/10.1155/2021/6637438

Enriquez, R.P.H., Do, T.N., 2012. Bioavailability of Metal Ions and Evolutionary Adaptation. Life Open Access J. 2, 274. https://doi.org/10.3390/life2040274

Eto, D., Watanabe, K., Saeki, H., Oinuma, K., Otani, K., Nobukuni, M., Shiratori-Takano, H., Takano, H., Beppu, T., Ueda, K., 2013. Divergent effects of desferrioxamine on bacterial growth and characteristics. J. Antibiot. (Tokyo) 66, 199–203. https://doi.org/10.1038/ja.2012.111

F

Fan, Y., Hu, F., Wei, L., Bai, L., Hua, Q., 2016a. Effects of modulation of pentose-phosphate pathway on biosynthesis of ansamitocins in Actinosynnema pretiosum. J. Biotechnol. 230, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.010

Fan, Y., Zhao, M., Wei, L., Hu, F., Imanaka, T., Bai, L., Hua, Q., 2016b. Enhancement of UDPG synthetic pathway improves ansamitocin production in Actinosynnem pretiosum. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 2651–2662. https://doi.org/10.1007/s00253-015-7148-2

Feitelson, J.S., Malpartida, F., Hopwood, D.A., 1985. Genetic and Biochemical Characterization of the red Gene Cluster of Streptomyces coelicolor A3(2). Microbiology 131, 2431–2441. https://doi.org/10.1099/00221287-131-9-2431

Fidopiastis, P.M., Childs, C., Esin, J.J., Stellern, J., Darin, A., Lorenzo, A., Mariscal, V.T., Lorenz, J., Gopan, V., McAnulty, S., Visick, K.L., 2022. Vibrio fischeri Possesses Xds and Dns Nucleases That Differentially Influence Phosphate Scavenging, Aggregation, Competence, and Symbiotic Colonization of Squid. Appl. Environ. Microbiol. 88, e01635-22. https://doi.org/10.1128/aem.01635-22

Fidopiastis, P.M., Miyamoto, C.M., Jobling, M.G., Meighen, E.A., Ruby, E.G., 2002. LitR, a new transcriptional activator in Vibrio fischeri, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. Mol. Microbiol. 45, 131–143. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02996.x

Fillat, M.F., 2014. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. Arch. Biochem. Biophys. 546, 41–52. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.029

Flärdh, K., 2010. Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. Curr. Opin. Microbiol., Growth and development: eukaryotes/prokaryotes 13, 758–765. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.002

Flärdh, K., Buttner, M.J., 2009. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat. Rev. Microbiol. 7, 36–49. https://doi.org/10.1038/nrmicro1968

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flores, E., Herrero, A., 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. Nat. Rev. Microbiol. 8, 39–50. https://doi.org/10.1038/nrmicro2242

Flores, E., Herrero, A., Wolk, C.P., Maldener, I., 2006. Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? Trends Microbiol. 14, 439–443. https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.08.007

Flores, E., Picossi, S., Valladares, A., Herrero, A., 2019. Transcriptional regulation of development in heterocyst-forming cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech., Gene expression in bacterial development 1862, 673–684. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.006

Flórez, L.V., Biedermann, P.H.W., Engl, T., Kaltenpoth, M., 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Nat. Prod. Rep. 32, 904–936. https://doi.org/10.1039/C5NP00010F

Fojcik, C., Arnoux, P., Ouerdane, L., Aigle, M., Alfonsi, L., Borezée-Durant, E., 2018. Independent and cooperative regulation of staphylopine biosynthesis and trafficking by Fur and Zur. Mol. Microbiol. 108, 159–177. https://doi.org/10.1111/mmi.13927

Fortuin, S., Nel, A.J.M., Blackburn, J.M., Soares, N.C., 2020. Comparison between the proteome of Escherichia coli single colony and during liquid culture. J. Proteomics 228, 103929. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103929

Frawley, E.R., Crouch, M.-L.V., Bingham-Ramos, L.K., Robbins, H.F., Wang, W., Wright, G.D., Fang, F.C., 2013. Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in Salmonella Typhimurium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 12054–12059. https://doi.org/10.1073/pnas.1218274110

Fyans, J.K., Bignell, D., Loria, R., Toth, I., Palmer, T., 2013. The ESX/type VII secretion system modulates development, but not virulence, of the plant pathogen Streptomyces scabies. Mol. Plant Pathol. 14, 119–130. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00835.x

G

Gaballa, A., Helmann, J.D., 2003. Bacillus subtilis CPx-type ATPases: characterization of Cd, Zn, Co and Cu efflux systems. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. 16, 497–505. https://doi.org/10.1023/a:1023425321617

García-Cañas, R., Giner-Lamia, J., Florencio, F.J., López-Maury, L., 2021. A protease-mediated mechanism regulates the cytochrome c6/plastocyanin switch in Synechocystis sp. PCC 6803. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, e2017898118. https://doi.org/10.1073/pnas.2017898118

Ge, R., Sun, X., 2014. Iron acquisition and regulation systems in Streptococcus species. Metallomics 6, 996–1003. https://doi.org/10.1039/c4mt00011k

Geerlings, N.M.J., Zetsche, E.-M., Hidalgo-Martinez, S., Middelburg, J.J., Meysman, F.J.R., 2019. Mineral formation induced by cable bacteria performing long-distance electron

transport in marine sediments. Biogeosciences 16, 811–829. https://doi.org/10.5194/bg-16-811-2019

Ghssein, G., Brutesco, C., Ouerdane, L., Fojcik, C., Izaute, A., Wang, S., Hajjar, C., Lobinski, R., Lemaire, D., Richaud, P., Voulhoux, R., Espaillat, A., Cava, F., Pignol, D., Borezée-Durant, E., Arnoux, P., 2016. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in Staphylococcus aureus. Science 352, 1105–1109. https://doi.org/10.1126/science.aaf1018

Giessen, T.W., Franke, K.B., Knappe, T.A., Kraas, F.I., Bosello, M., Xie, X., Linne, U., Marahiel, M.A., 2012. Isolation, Structure Elucidation, and Biosynthesis of an Unusual Hydroxamic Acid Ester-Containing Siderophore from Actinosynnema mirum. J. Nat. Prod. 75, 905–914. https://doi.org/10.1021/np300046k

Goh, S., Camattari, A., Ng, D., Song, R., Madden, K., Westpheling, J., Wong, V.V.T., 2007. An integrative expression vector for Actinosynnema pretiosum. BMC Biotechnol. 7, 72. https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-72

Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., Rai, M., 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. Antonie Van Leeuwenhoek 108, 267–289. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0502-7

Goodfellow, M., 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov., in: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. pp. 33–2028. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_3

Gorby, Y.A., Beveridge, T.J., Blakemore, R.P., 1988. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. J. Bacteriol. 170, 834–841. https://doi.org/10.1128/jb.170.2.834-841.1988

Goswami, P., He, K., Li, J., Pan, Y., Roberts, A.P., Lin, W., 2022. Magnetotactic bacteria and magnetofossils: ecology, evolution and environmental implications. Npj Biofilms Microbiomes 8, 1–14. https://doi.org/10.1038/s41522-022-00304-0

Grant, C.R., Amor, M., Trujillo, H.A., Krishnapura, S., Iavarone, A.T., Komeili, A., 2022. Distinct gene clusters drive formation of ferrosome organelles in bacteria. Nature 606, 160–164. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04741-x

Grant, C.R., Komeili, A., 2020. Ferrosomes are iron storage organelles formed by broadly conserved gene clusters in bacteria and archaea. https://doi.org/10.1101/2020.01.10.902569

Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., Rensing, C., 2005. The Metal Permease ZupT from Escherichia coli Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. J. Bacteriol. 187, 1604–1611. https://doi.org/10.1128/jb.187.5.1604-1611.2005

Grass, G., Wong, M.D., Rosen, B.P., Smith, R.L., Rensing, C., 2002. ZupT is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli. J. Bacteriol. 184, 864–866. https://doi.org/10.1128/JB.184.3.864-866.2002

Greening, C., Lithgow, T., 2020. Formation and function of bacterial organelles. Nat. Rev. Microbiol. 18, 677–689. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0413-0

Grim, K.P., San Francisco, B., Radin, J.N., Brazel, E.B., Kelliher, J.L., Párraga Solórzano, P.K., Kim, P.C., McDevitt, C.A., Kehl-Fie, T.E., 2017. The Metallophore Staphylopine Enables Staphylococcus aureus To Compete with the Host for Zinc and Overcome Nutritional Immunity. mBio 8, e01281-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01281-17

Gu, H., Hou, S., Yongyat, C., De Tore, S., Ren, D., 2013. Patterned biofilm formation reveals a mechanism for structural heterogeneity in bacterial biofilms. Langmuir ACS J. Surf. Colloids 29, 11145–11153. https://doi.org/10.1021/la402608z

Guan, G., Pinochet-Barros, A., Gaballa, A., Patel, S.J., Argüello, J.M., Helmann, J.D., 2015. PfeT, a P1B4-type ATPase, effluxes ferrous iron and protects Bacillus subtilis against iron intoxication. Mol. Microbiol. 98, 787. https://doi.org/10.1111/mmi.13158

Gunther, M.R., Hanna, P.M., Mason, R.P., Cohen, M.S., 1995. Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. Arch. Biochem. Biophys. 316, 515–522. https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1068

Guo, S., Leng, T., Sun, X., Zheng, J., Li, R., Chen, J., Hu, F., Liu, F., Hua, Q., 2022. Global Regulator AdpA_1075 Regulates Morphological Differentiation and Ansamitocin Production in Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum. Bioengineering 9, 719. https://doi.org/10.3390/bioengineering9110719

H

Hantke, K., 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. Curr. Opin. Microbiol., Cell Regulation 8, 196–202. https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.001

Hartmann, E.M., Allain, F., Gaillard, J.-C., Pible, O., Armengaud, J., 2014. Taking the Shortcut for High-Throughput Shotgun Proteomic Analysis of Bacteria, in: Vergunst, A.C., O'Callaghan, D. (Eds.), Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 275–285. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2_16

Harvey, K.L., Jarocki, V.M., Charles, I.G., Djordjevic, S.P., 2019. The Diverse Functional Roles of Elongation Factor Tu (EF-Tu) in Microbial Pathogenesis. Front. Microbiol. 10, 2351. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02351

Hasegawa, T., Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A., 1978. New Genus of the Actinomycetales: Actinosynnema gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 304–310. https://doi.org/10.1099/00207713-28-2-304

Hasegawa, T., Tanida, S., Hatano, K., Higashide, E., Yoneda, M., 1983. Motile Actinomycetes: Actinosynnema pretiosum subsp. pretiosum sp. nov., subsp. nov., and Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 314–320. https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-314

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol. Microbiol. 20, 1083–1091. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x

Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G.J., Nies, D.H., 2008. Glutathione and Transition-Metal Homeostasis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 190, 5431–5438. https://doi.org/10.1128/jb.00271-08

Hernandez Garcia, A., Nair, S.K., 2023. Structure and Function of a Class III Metal-Independent Lanthipeptide Synthetase. ACS Cent. Sci. 9, 1944–1956. https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00484

Hickman, J.W., Tifrea, D.F., Harwood, C.S., 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 14422–14427. https://doi.org/10.1073/pnas.0507170102

Hidalgo-Cantabrana, C., Delgado, S., Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., Margolles, A., 2017. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. Microbiol. Spectr. 5, 10.1128/microbiolspec.bad-0010–2016. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0010-2016

Higashide, E., Asai, M., Ootsu, K., Tanida, S., Kozai, Y., Hasegawa, T., Kishi, T., Sugino, Y., Yoneda, M., 1977. Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from Nocardia. Nature 270, 721–722. https://doi.org/10.1038/270721a0

Hofmann, M., Retamal-Morales, G., Tischler, D., 2020. Metal binding ability of microbial natural metal chelators and potential applications. Nat. Prod. Rep. 37, 1262–1283. https://doi.org/10.1039/c9np00058e

Hopwood, D.A., Chater, K.F., Bibb, M.J., 1995. CHAPTER 2 - Genetics of Antibiotic Production in Streptomyces coelicolor A3(2), a Model Streptomycete, in: Vining, L.C., Stuttard, C. (Eds.), Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 65–102. https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-9095-9.50009-5

Hopwood, D.A., Wright, H.M., 1983. CDA is a New Chromosomally-determined Antibiotic from Streptomyces coelicolor A3(2). Microbiology 129, 3575–3579. https://doi.org/10.1099/00221287-129-12-3575

Horwich, A.L., Farr, G.W., Fenton, W.A., 2006. GroEL−GroES-Mediated Protein Folding. Chem. Rev. 106, 1917–1930. https://doi.org/10.1021/cr040435v

Huang, W., Wilks, A., 2017. Extracellular Heme Uptake and the Challenge of Bacterial Cell Membranes. Annu. Rev. Biochem. 86, 799–823. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014214

Huch, S., Nersisyan, L., Ropat, M., Barrett, D., Wu, M., Wang, J., Valeriano, V.D., Vardazaryan, N., Huerta-Cepas, J., Wei, W., Du, J., Steinmetz, L.M., Engstrand, L., Pelechano, V., 2023. Atlas of mRNA translation and decay for bacteria. Nat. Microbiol. 8, 1123–1136. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01393-z

Huertas, M.J., López-Maury, L., Giner-Lamia, J., Sánchez-Riego, A.M., Florencio, F.J., 2014. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms. Life 4, 865–886. https://doi.org/10.3390/life4040865

Hung, K.-W., Juan, T., Hsu, Y., Huang, T.H., 2012. NMR structure note: the ferrous iron transport protein C (FeoC) from Klebsiella pneumoniae. J. Biomol. NMR 53, 161–165. https://doi.org/10.1007/s10858-012-9633-6

Hunter, R.C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B.L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., Newman, D.K., 2013. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. mBio 4, e00557-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00557-13

Hussain, S., Khan, M., Sheikh, T.M.M., Mumtaz, M.Z., Chohan, T.A., Shamim, S., Liu, Y., 2022. Zinc Essentiality, Toxicity, and Its Bacterial Bioremediation: A Comprehensive Insight. Front. Microbiol. 13, 900740. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.900740

I

Iacovelli, R., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M., 2021. Nonribosomal peptide synthetases and their biotechnological potential in Penicillium rubens. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 48, kuab045. https://doi.org/10.1093/jimb/kuab045

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., Ōmura, S., 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis. Nat. Biotechnol. 21, 526–531. https://doi.org/10.1038/nbt820

Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., Tsernoglou, D., 2000. The dodecameric ferritin from Listeria innocua contains a novel intersubunit iron-binding site. Nat. Struct. Biol. 7, 38–43. https://doi.org/10.1038/71236

Ilbert, M., Bonnefoy, V., 2013. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. Biochim. Biophys. Acta 1827, 161–175. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.10.001

Ilic, S.B., Konstantinovic, S.S., Todorovic, Z.B., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., Jokovic, N., Radovanovic, B.C., 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. Microbiology 76, 421–428. https://doi.org/10.1134/S0026261707040066

Imlay, J.A., 2014. The mismetallation of enzymes during oxidative stress. J. Biol. Chem. 289, 28121–28128. https://doi.org/10.1074/jbc.R114.588814

Islam, S.T., Vergara Alvarez, I., Saïdi, F., Guiseppi, A., Vinogradov, E., Sharma, G., Espinosa, L., Morrone, C., Brasseur, G., Guillemot, J.-F., Benarouche, A., Bridot, J.-L., Ravicoularamin, G., Cagna, A., Gauthier, C., Singer, M., Fierobe, H.-P., Mignot, T., Mauriello, E.M.F., 2020. Modulation of bacterial multicellularity via spatio-specific polysaccharide secretion. PLOS Biol. 18, e3000728. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000728

Ito, T., Roongsawang, N., Shirasaka, N., Lu, W., Flatt, P.M., Kasanah, N., Miranda, C., Mahmud, T., 2009. Deciphering Pactamycin Biosynthesis and Engineered Production of New Pactamycin Analogues. ChemBioChem 10, 2253–2265. https://doi.org/10.1002/cbic.200900339

J

Jacques, J.-F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., Massé, E., 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 62, 1181–1190. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05439.x

Jagannathan, S.V., Manemann, E.M., Rowe, S.E., Callender, M.C., Soto, W., 2021. Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. Mar. Drugs 19, 365. https://doi.org/10.3390/md19070365

Jemielita, M., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., 2018. Quorum sensing controls *Vibrio cholerae* multicellular aggregate formation. eLife 7, e42057. https://doi.org/10.7554/elife.42057

Jiao, X., Takishita, Y., Zhou, G., Smith, D.L., 2021. Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. Front. Plant Sci. 12.

Jones, B., Renaut, R.W., Rosen, M.R., Ansdell, K.M., 2002. Coniform Stromatolites from Geothermal Systems, North Island, New Zealand. PALAIOS 17, 84–103.

Jones, S.E., Elliot, M.A., 2017. bar. Trends Microbiol. 25, 522–531. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.001

Jose, P.A., Jha, B., 2017. Intertidal marine sediment harbours Actinobacteria with promising bioactive and biosynthetic potential. Sci. Rep. 7, 10041. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09672-6

Jose, P.A., Maharshi, A., Jha, B., 2021. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. Microbiol. Res. 246, 126708. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708

Jurtshuk, P., 1996. Bacterial Metabolism, in: Baron, S. (Ed.), Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).

K

Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2002. Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. Science 296, 1127–1129. https://doi.org/10.1126/science.1070633

Kanabalan, R.D., Lee, L.J., Lee, T.Y., Chong, P.P., Hassan, L., Ismail, R., Chin, V.K., 2021. Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. Microbiol. Res. 246, 126674. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674

Kang, D., Kirienko, N.V., 2017. High-Throughput Genetic Screen Reveals that Early Attachment and Biofilm Formation Are Necessary for Full Pyoverdine Production by Pseudomonas aeruginosa. Front. Microbiol. 8, 1707. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01707

Kang, D., Turner, K.E., Kirienko, N.V., 2017. PqsA Promotes Pyoverdine Production via Biofilm Formation. Pathogens 7, 3. https://doi.org/10.3390/pathogens7010003

Karasz, D.C., Weaver, A.I., Buckley, D.H., Wilhelm, R.C., 2022. Conditional filamentation as an adaptive trait of bacteria and its ecological significance in soils. Environ. Microbiol. 24, 1–17. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15871

Kashyap, A.S., Fernandez-Rodriguez, L., Zhao, Y., Monaco, G., Trefny, M.P., Yoshida, N., Martin, K., Sharma, A., Olieric, N., Shah, P., Stanczak, M., Kirchhammer, N., Park, S.-M., Wieckowski, S., Laubli, H., Zagani, R., Kasenda, B., Steinmetz, M.O., Reinecker, H.-C., Zippelius, A., 2019. GEF-H1 Signaling upon Microtubule Destabilization Is Required for Dendritic Cell Activation and Specific Anti-tumor Responses. Cell Rep. 28, 3367-3380.e8. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.057

Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R., Ogawa, T., 2001. Genes Essential to Iron Transport in the Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803. J. Bacteriol. 183, 2779–2784. https://doi.org/10.1128/jb.183.9.2779-2784.2001

Khushboo, Kumar, P., Dubey, K.K., Usmani, Z., Sharma, M., Gupta, V.K., 2022. Biotechnological and industrial applications of Streptomyces metabolites. Biofuels Bioprod. Biorefining 16, 244–264. https://doi.org/10.1002/bbb.2294

King, M.M., Kayastha, B.B., Patrauchan, M.A., Franklin, M.J., 2020. Calcium Regulation of Bacterial Virulence. Adv. Exp. Med. Biol. 1131, 827–855. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_33

Kirienko, D.R., Revtovich, A.V., Kirienko, N.V., 2016. A High-Content, Phenotypic Screen Identifies Fluorouridine as an Inhibitor of Pyoverdine Biosynthesis and Pseudomonas aeruginosa Virulence. mSphere 1, e00217-16. https://doi.org/10.1128/mSphere.00217-16

Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Mol. Microbiol. 50, 61–68. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x

Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J.-C., Lagniel, G., Armengaud, J., Carrière, M., Chédin, S., Boulard, Y., Pin, S., Renault, J.-P., Aude, J.-C., Labarre, J., 2016. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. Nanotoxicology 10, 1555–1564. https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1244299

Kliegman, J.I., Griner, S.L., Helmann, J.D., Brennan, R.G., Glasfeld, A., 2006. The Structural Basis for the Metal Selective Activation of the Manganese Transport Regulator of Bacillus subtilis,. Biochemistry 45, 3493–3505. https://doi.org/10.1021/bi0524215

Kodani, S., Lodato, M.A., Durrant, M.C., Picart, F., Willey, J.M., 2005. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. Mol. Microbiol. 58, 1368–1380. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04921.x

Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. Nature 441, 300–302. https://doi.org/10.1038/441300a

Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J., Zähner, H., 1990. Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. Eur. J. Biochem. 191, 65–74. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19094.x

Kosman, D.J., 2019. Energy metabolism, oxygen flux, and iron in bacteria: The Mössbauer report. J. Biol. Chem. 294, 63–64. https://doi.org/10.1074/jbc.H118.006703

Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E.L., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V., Bjarnsholt, T., 2016. Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. mBio 7, 10.1128/mbio.00237-16. https://doi.org/10.1128/mbio.00237-16

Kramer, J., Özkaya, Ö., Kümmerli, R., 2020. Bacterial siderophores in community and host interactions. Nat. Rev. Microbiol. 18, 152–163. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4

Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R.P., Depège, N., Huijser, P., Merchant, S., 2005. A regulator of nutritional copper signaling in Chlamydomonas is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 18730–18735. https://doi.org/10.1073/pnas.0507693102

L

Laffont, C., Arnoux, P., 2020. The ancient roots of nicotianamine: diversity, role, regulation and evolution of nicotianamine-like metallophores. Metallomics 12, 1480. https://doi.org/10.1039/D0MT00150C

Laffont, C., Brutesco, C., Hajjar, C., Cullia, G., Fanelli, R., Ouerdane, L., Cavelier, F., Arnoux, P., 2019. Simple rules govern the diversity of bacterial nicotianamine-like metallophores. Biochem. J. 476, 2221–2233. https://doi.org/10.1042/BCJ20190384

Lam, L.N., Brunson, D.N., Molina, J.J., Flores-Mireles, A.L., Lemos, J.A., 2022. The AdcACB/AdcAII system is essential for zinc homeostasis and an important contributor of Enterococcus faecalis virulence. Virulence 13, 592–608. https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2056965

Land, M., Lapidus, A., Mayilraj, S., Chen, F., Copeland, A., Del Rio, T.G., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Cheng, J.-F., Chertkov, O., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Rohde, M., Göker, M., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C.C., Brettin, T., Detter, J.C., Han, C., Chain, P., Tindall, B.J., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., 2009. Complete genome sequence of Actinosynnema mirum type strain (101). Stand. Genomic Sci. 1, 46–53. https://doi.org/10.4056/sigs.21137

Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., Vogel, H.J., 2016. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. FEMS Microbiol. Rev. 40, 273–298. https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049

Lee, J.-W., Helmann, J.D., 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. 20, 485–499. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9070-7

Lee, W., van Baalen, M., Jansen, V.A.A., 2016. Siderophore production and the evolution of investment in a public good: An adaptive dynamics approach to kin selection. J. Theor. Biol. 388, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.09.038

Lemelle, L., Simionovici, A., Schoonjans, T., Tucoulou, R., Enrico, E., Salomé, M., Hofmann, A., Cavalazzi, B., 2017. Analytical requirements for quantitative X-ray fluorescence nano-imaging of metal traces in solid samples. TrAC Trends Anal. Chem. 91, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.008

Leung, T.L.F., Poulin, R., 2008. PARASITISM, COMMENSALISM, AND MUTUALISM: EXPLORING THE MANY SHADES OF SYMBIOSES. Vie Milieu.

Lewin, G.R., Carlos, C., Chevrette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G., Currie, C.R., 2016. Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. Annu. Rev. Microbiol. 70, 235–254. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748

Lewinson, O., Livnat-Levanon, N., 2017. Mechanism of Action of ABC Importers: Conservation, Divergence, and Physiological Adaptations. J. Mol. Biol. 429, 606–619. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.01.010

Lhospice, S., Gomez, N.O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghssein, G., Hajjar, C., Liratni, A., Wang, S., Richaud, P., Bleves, S., Ball, G., Borezée-Durant, E., Lobinski, R., Pignol, D., Arnoux, P., Voulhoux, R., 2017. Pseudomonas aeruginosa zinc uptake in chelating

environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. Sci. Rep. 7, 17132. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9

Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C., 2016. Morphological Identification of Actinobacteria, in: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/61461

Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J., Chen, R., 2013. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. BMC Plant Biol. 13, 114. https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-114

Li, Y., Liu, J., Díaz-Cruz, G., Cheng, Z., Bignell, D.R.D., 2019. Virulence mechanisms of plant-pathogenic Streptomyces species: an updated review. Microbiology 165, 1025–1040. https://doi.org/10.1099/mic.0.000818

Li, Y.-H., Tian, X., 2012. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. Sensors 12, 2519–2538. https://doi.org/10.3390/s120302519

Liau, P., Kim, C., Saxton, M.A., Malkin, S.Y., 2022. Microbial succession in a marine sediment: Inferring interspecific microbial interactions with marine cable bacteria. Environ. Microbiol. 24, 6348–6364. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16230

Linkous, R.O., Sestok, A.E., Smith, A.T., 2019. The crystal structure of Klebsiella pneumoniae FeoA reveals a site for protein-protein interactions. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 87, 897–903. https://doi.org/10.1002/prot.25755

Lioy, V.S., Lorenzi, J.-N., Najah, S., Poinsignon, T., Leh, H., Saulnier, C., Aigle, B., Lautru, S., Thibessard, A., Lespinet, O., Leblond, P., Jaszczyszyn, Y., Gorrichon, K., Varoquaux, N., Junier, I., Boccard, F., Pernodet, J.-L., Bury-Moné, S., 2021. Dynamics of the compartmentalized Streptomyces chromosome during metabolic differentiation. Nat. Commun. 12, 5221. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25462-1

Liu, T., Jin, Z., Wang, Z., Chen, J., Wei, L.-J., Hua, Q., 2020. Metabolomics analysis of Actinosynnema pretiosum with improved AP-3 production by enhancing UDP-glucose biosynthesis. J. Biosci. Bioeng. 130, 36–47. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.013

Loisel, E., Jacquamet, L., Serre, L., Bauvois, C., Ferrer, J.L., Vernet, T., Di Guilmi, A.M., Durmort, C., 2008. AdcAII, A New Pneumococcal Zn-Binding Protein Homologous with ABC Transporters: Biochemical and Structural Analysis. J. Mol. Biol. 381, 594–606. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.068

Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whitman, W.B., 2012. Road map of the phylum Actinobacteria, in: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds.), Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A and B. Springer New York, New York, NY, pp. 1–28. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4_1

Luo, Z., Morey, J.R., Deplazes, E., Motygullina, A., Tan, A., Ganio, K., Neville, S.L., Eleftheriadis, N., Isselstein, M., Pederick, V.G., Paton, J.C., Cordes, T., Harmer, J.R., Kobe, B., McDevitt, C.A., 2021. A Trap-Door Mechanism for Zinc Acquisition by Streptococcus pneumoniae AdcA. mBio 12, 10.1128/mbio.01958-20. https://doi.org/10.1128/mbio.01958-20

Lupp, C., Ruby, E.G., 2005. Vibrio fischeri uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors. J. Bacteriol. 187, 3620–3629. https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3620-3629.2005

Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E.P., Ruby, E.G., 2003. The Vibrio fischeri quorum-sensing systems ain and lux sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. Mol. Microbiol. 50, 319–331. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.t01-1-03585.x

Lyons, N.A., Kolter, R., 2015. On the evolution of bacterial multicellularity. Curr. Opin. Microbiol., Cell regulation 24, 21–28. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.007

M

Mahren, S., Schnell, H., Braun, V., 2005. Occurrence and regulation of the ferric citrate transport system in Escherichia coli B, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, and Photorhabdus luminescens. Arch. Microbiol. 184, 175–186. https://doi.org/10.1007/s00203-005-0035-y

Majerczyk, C.D., Sadykov, M.R., Luong, T.T., Lee, C., Somerville, G.A., Sonenshein, A.L., 2008. Staphylococcus aureus CodY negatively regulates virulence gene expression. J. Bacteriol. 190, 2257–2265. https://doi.org/10.1128/JB.01545-07

Maki, H., Tsujito, M., Sakurai, M., Yamada, T., Nariai, H., Mizuhata, M., 2013. Stabilities of the Divalent Metal Ion Complexes of a Short-Chain Polyphosphate Anion and Its Imino Derivative. J. Solut. Chem. 42, 2104–2118. https://doi.org/10.1007/s10953-013-0099-2

Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., Cellier, M.F.M., 2000. Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. Mol. Microbiol. 35, 1065–1078. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01774.x

Malkin, S.Y., Seitaj, D., Burdorf, L.D.W., Nieuwhof, S., Hidalgo-Martinez, S., Tramper, A., Geeraert, N., De Stigter, H., Meysman, F.J.R., 2017. Electrogenic Sulfur Oxidation by Cable Bacteria in Bivalve Reef Sediments. Front. Mar. Sci. 4. https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00028

Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P., Sanchez, J., 2008. Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of Streptomyces coelicolor. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3877–3886. https://doi.org/10.1128/AEM.02715-07

Manteca, Á., Fernández, M., Sánchez, J., 2005. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of Streptomyces antibioticus. Microbiology 151, 3689–3697. https://doi.org/10.1099/mic.0.28045-0

Martin, J.E., Le, M.T., Bhattarai, N., Capdevila, D.A., Shen, J., Winkler, M.E., Giedroc, D.P., 2019. A Mn-sensing riboswitch activates expression of a Mn2+/Ca2+ ATPase transporter in Streptococcus. Nucleic Acids Res. 47, 6885–6899. https://doi.org/10.1093/nar/gkz494

Martin, J.E., Waters, L.S., Storz, G., Imlay, J.A., 2015. The Escherichia coli Small Protein MntS and Exporter MntP Optimize the Intracellular Concentration of Manganese. PLOS Genet. 11, e1004977. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004977

Martin, K., Müller, P., Schreiner, J., Prince, S.S., Lardinois, D., Heinzelmann-Schwarz, V.A., Thommen, D.S., Zippelius, A., 2014. The microtubule-depolymerizing agent ansamitocin P3 programs dendritic cells toward enhanced anti-tumor immunity. Cancer Immunol. Immunother. 63, 925–938. https://doi.org/10.1007/s00262-014-1565-4

Martín-González, A., Wierzchos, J., Gutiérrez, J.C., Alonso, J., Ascaso, C., 2009. Microbial Cretaceous park: biodiversity of microbial fossils entrapped in amber. Naturwissenschaften 96, 551–564. https://doi.org/10.1007/s00114-009-0508-y

Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L., 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. Soil Biol. Biochem. 4, 79–91. https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90045-4

McCormick, J.R., Flärdh, K., 2012. Signals and regulators that govern Streptomyces development. FEMS Microbiol. Rev. 36, 206–231. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x

McFarlane, J.S., Davis, C.L., Lamb, A.L., 2018. Staphylopine, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase. J. Biol. Chem. 293, 8009–8019. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002007

McNeil, M.M., Brown, J.M., 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 7, 357–417.

Melvin, J.A., Scheller, E.V., Noël, C.R., Cotter, P.A., 2015. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in Bordetella Virulence. mBio 6, 10.1128/mbio.01189-15. https://doi.org/10.1128/mbio.01189-15

Miethke, M., Monteferrante, C.G., Marahiel, M.A., van Dijl, J.M., 2013. The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1833, 2267–2278. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.027

Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B., 1999. Hyphal Death during Colony Development in Streptomyces antibioticus: Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote. J. Cell Biol. 145, 515–525.

Mizuno, K., Maree, M., Nagamura, T., Koga, A., Hirayama, S., Furukawa, S., Tanaka, K., Morikawa, K., 2022. Novel multicellular prokaryote discovered next to an underground stream. eLife 11, e71920. https://doi.org/10.7554/eLife.71920

Mohammadipanah, F., Wink, J., 2016. Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. Front. Microbiol. 6.

Monds, R.D., O'Toole, G.A., 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol. 17, 73–87. https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001

Morey, J.R., Kehl-Fie, T.E., 2020. Bioinformatic Mapping of Opine-Like Zincophore Biosynthesis in Bacteria. mSystems 5, e00554-20. https://doi.org/10.1128/msystems.00554-20

Mouri, Y., Konishi, K., Fujita, A., Tezuka, T., Ohnishi, Y., 2017. Regulation of Sporangium Formation by BldD in the Rare Actinomycete Actinoplanes missouriensis. J. Bacteriol. 199, 10.1128/jb.00840-16. https://doi.org/10.1128/jb.00840-16

Mrochen, D.M., Fernandes de Oliveira, L.M., Raafat, D., Holtfreter, S., 2020. Staphylococcus aureus Host Tropism and Its Implications for Murine Infection Models. Int. J. Mol. Sci. 21, 7061. https://doi.org/10.3390/ijms21197061

Mulkidjanian, A.Y., Galperin, M.Y., 2010. On the abundance of zinc in the evolutionarily old protein domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, E137. https://doi.org/10.1073/pnas.1008745107

Muñoz-Dorado, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., Contreras-Moreno, F.J., Martin-Cuadrado, A.B., Schrader, J.M., Higgs, P.I., Pérez, J., 2019. Transcriptome dynamics of the Myxococcus xanthus multicellular developmental program. eLife 8, e50374. https://doi.org/10.7554/eLife.50374

Murphy, D., 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. Prog. Lipid Res. 40, 325–438. https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00013-3

N

Nagy, T.A., Moreland, S.M., Andrews-Polymenis, H., Detweiler, C.S., 2013. The Ferric Enterobactin Transporter Fep Is Required for Persistent Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection. Infect. Immun. 81, 4063–4070. https://doi.org/10.1128/IAI.00412-13

Nairn, B.L., Lonergan, Z.R., Wang, J., Braymer, J.J., Zhang, Y., Calcutt, M.W., Lisher, J.P., Gilston, B.A., Chazin, W.J., de Crécy-Lagard, V., Giedroc, D.P., Skaar, E.P., 2016. The Response of Acinetobacter baumannii to Zinc Starvation. Cell Host Microbe 19, 826–836. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.007

Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., Yuan, Z.-C., 2018. Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. Mol. Plant Pathol. https://doi.org/10.1111/mpp.12678

Nealson, K.H., Hastings, J.W., 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol. Rev. 43, 496–518. https://doi.org/10.1128/mr.43.4.496-518.1979

Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T., Hamilton, C.J., Claiborne, A., Helmann, J.D., Fahey, R.C., 2009. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. Nat. Chem. Biol. 5, 625–627. https://doi.org/10.1038/nchembio.189

Ning, X., Wang, X., Wu, Y., Kang, Q., Bai, L., 2017. Identification and Engineering of Post-PKS Modification Bottlenecks for Ansamitocin P-3 Titer Improvement in Actinosynnema pretiosum subsp. pretiosum ATCC 31280. Biotechnol. J. 12. https://doi.org/10.1002/biot.201700484

Nitschke, W., Farr, O., Gaudu, N., Truong, C., Guyot, F., Russell, M.J., Duval, S., 2024. The Winding Road from Origin to Emergence (of Life). Life 14, 607. https://doi.org/10.3390/life14050607

Nyholm, S.V., Stabb, E.V., Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J., 2000. Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 10231–10235. https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10231

O

Ochi, K., Hosaka, T., 2013. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 87–98. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9

Ochsner, U.A., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 1995. Role of the ferric uptake regulator of Pseudomonas aeruginosa in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. J. Bacteriol. 177, 7194–7201.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S., 2008. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism Streptomyces griseus IFO 13350. J. Bacteriol. 190, 4050–4060. https://doi.org/10.1128/jb.00204-08

Oliynyk, M., Samborskyy, M., Lester, J.B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S.F., Leadlay, P.F., 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium Saccharopolyspora erythraea NRRL23338. Nat. Biotechnol. 25, 447–453. https://doi.org/10.1038/nbt1297

Onaka, H., 2017. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. J. Antibiot. (Tokyo) 70, 865–870. https://doi.org/10.1038/ja.2017.51

Oppenheimer-Shaanan, Y., Steinberg, N., Kolodkin-Gal, I., 2013. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. Trends Microbiol. 21, 594–601. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.08.005

O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28, 449–461. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x

P

Pang, C., Chai, J., Zhu, P., Shanklin, J., Liu, Q., 2023. Structural mechanism of intracellular autoregulation of zinc uptake in ZIP transporters. Nat. Commun. 14, 3404. https://doi.org/10.1038/s41467-023-39010-6

Pappenheimer, A.M.Jr., 1977. Diphtheria Toxin. Annu. Rev. Biochem. 46, 69–94. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.000441

Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C., Göker, M., 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 5607–5612. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332

Patel, S.J., Lewis, B.E., Long, J.E., Nambi, S., Sassetti, C.M., Stemmler, T.L., Argüello, J.M., 2016. Fine-tuning of Substrate Affinity Leads to Alternative Roles of Mycobacterium tuberculosis Fe2+-ATPases. J. Biol. Chem. 291, 11529. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718239

Patzer, S.I., Hantke, K., 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 28, 1199–1210. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00883.x

Penen, F., Malherbe, J., Isaure, M.-P., Dobritzsch, D., Bertalan, I., Gontier, E., Le Coustumer, P., Schaumlöffel, D., 2016. Chemical bioimaging for the subcellular localization of trace elements by high contrast TEM, TEM/X-EDS, and NanoSIMS. J. Trace Elem. Med. Biol. Organ Soc. Miner. Trace Elem. GMS 37, 62–68. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.04.014

Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., Muñoz-Dorado, J., 2016. Bacterial predation: 75 years and counting! Environ. Microbiol. 18, 766–779. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13171

Perry, R.D., Bobrov, A.G., Fetherston, J.D., 2015. The Role of Transition Metal Transporters for Iron, Zinc, Manganese, and Copper in the Pathogenesis of Yersinia pestis. Met. Integr. Biometal Sci. 7, 965–978. https://doi.org/10.1039/c4mt00332b

Petrus, M.L.C., Claessen, D., 2014. Pivotal roles for Streptomyces cell surface polymers in morphological differentiation, attachment and mycelial architecture. Antonie Van Leeuwenhoek 106, 127–139. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0157-9

Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J., Dong, M., Besenbacher, F., Meyer, R.L., Kjeldsen, K.U., Schreiber, L., Gorby, Y.A., El-Naggar, M.Y., Leung, K.M., Schramm, A., Risgaard-Petersen, N., Nielsen, L.P., 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. Nature 491, 218–221. https://doi.org/10.1038/nature11586

Pi, H., Helmann, J.D., 2017. Ferrous Iron Efflux Systems in Bacteria. Met. Integr. Biometal Sci. 9, 840–851. https://doi.org/10.1039/c7mt00112f

Pi, H., Sun, R., McBride, J.R., Kruse, A.R.S., Gibson-Corley, K.N., Krystofiak, E.S., Nicholson, M.R., Spraggins, J.M., Zhou, Q., Skaar, E.P., 2023. Clostridioides difficile ferrosome organelles combat nutritional immunity. Nature 623, 1009–1016. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06719-9

Pishchany, G., Sheldon, J.R., Dickson, C.F., Alam, M.T., Read, T.D., Gell, D.A., Heinrichs, D.E., Skaar, E.P., 2014. IsdB-dependent Hemoglobin Binding Is Required for Acquisition of Heme by Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis. 209, 1764–1772. https://doi.org/10.1093/infdis/jit817

Plumptre, C.D., Eijkelkamp, B.A., Morey, J.R., Behr, F., Couñago, R.M., Ogunniyi, A.D., Kobe, B., O'Mara, M.L., Paton, J.C., McDevitt, C.A., 2014. AdcA and AdcAII employ distinct zinc acquisition mechanisms and contribute additively to zinc homeostasis in Streptococcus pneumoniae. Mol. Microbiol. 91, 834–851. https://doi.org/10.1111/mmi.12504

Price, E.E., Boyd, J.M., 2020. Genetic regulation of metal ion homeostasis in Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. 28, 821–831. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.004

Pushie, M.J., Pickering, I.J., Korbas, M., Hackett, M.J., George, G.N., 2014. Elemental and Chemically Specific X-ray Fluorescence Imaging of Biological Systems. Chem. Rev. 114, 8499–8541. https://doi.org/10.1021/cr4007297

R

Rasmussen, B., Fletcher, I.R., Brocks, J.J., Kilburn, M.R., 2008. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. Nature 455, 1101–1104. https://doi.org/10.1038/nature07381

Remy, L., Carrière, M., Derré-Bobillot, A., Martini, C., Sanguinetti, M., Borezée-Durant, E., 2013. The Staphylococcus aureus Opp1 ABC transporter imports nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. Mol. Microbiol. 87, 730–743. https://doi.org/10.1111/mmi.12126

Rey, T., Dumas, B., 2017. Plenty Is No Plague: Streptomyces Symbiosis with Crops. Trends Plant Sci. 22, 30–37. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.008

Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R., Dringen, R., 2004. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. Anal. Biochem. 331, 370–375. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.049

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., Mele, M.C., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms 7, 14. https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014

Risgaard-Petersen, N., Revil, A., Meister, P., Nielsen, L.P., 2012. Sulfur, iron-, and calcium cycling associated with natural electric currents running through marine sediment. Geochim. Cosmochim. Acta 92, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.05.036

Rivera-Calzada, A., Famelis, N., Llorca, O., Geibel, S., 2021. Type VII secretion systems: structure, functions and transport models. Nat. Rev. Microbiol. 19, 567–584. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00560-5

Roberts, C.S., Ni, F., Mitra, B., 2021. The Zinc and Iron Binuclear Transport Center of ZupT, a ZIP Transporter from Escherichia coli. Biochemistry 60, 3738–3752. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00621

Rossetto, D., Mansy, S.S., 2022. Metals Are Integral to Life as We Know It. Front. Cell Dev. Biol. 10, 864830. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.864830

Rudd, B.A.M., Hopwood, D.A., 1979. Genetics of Actinorhodin Biosynthesis by Streptomyces coelicolor A3(2). Microbiology 114, 35–43. https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-35

Runyen-Janecky, L.J., 2013. Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00055

Rutherford, S.T., Bassler, B.L., 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a012427. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427

S

Sabri, M., Léveillé, S., Dozois, C.M., 2006. A SitABCD homologue from an avian pathogenic Escherichia coli strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. Microbiology 152, 745–758. https://doi.org/10.1099/mic.0.28682-0

Sadiki, M., Elabed, S., Barkai, H., Balouiri, M., Nasri, A., Koraichi, S.I., 2017. The modification of cedar wood surface properties for the prevention of fungal adhesion. Int. J. Adhes. Adhes. 75, 40–46. https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2017.01.007

Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F.U., Kučerik, J., Mumtaz, M.Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., Mustafa, A., 2021. Rhizosphere Bacteria

in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. Int. J. Mol. Sci. 22, 10529. https://doi.org/10.3390/ijms221910529

Sahoo, S.K., Crisponi, G., 2019. Recent Advances on Iron(III) Selective Fluorescent Probes with Possible Applications in Bioimaging. Molecules 24, 3267. https://doi.org/10.3390/molecules24183267

Salvatori, N., Moreno, M., Zotti, M., Iuorio, A., Cartenì, F., Bonanomi, G., Mazzoleni, S., Giannino, F., 2023. Process based modelling of plants-fungus interactions explains fairy ring types and dynamics. Sci. Rep. 13, 19918. https://doi.org/10.1038/s41598-023-46006-1

Samatova, E., Daberger, J., Liutkute, M., Rodnina, M.V., 2021. Translational Control by Ribosome Pausing in Bacteria: How a Non-uniform Pace of Translation Affects Protein Production and Folding. Front. Microbiol. 11.

Sankari, S., O'Brian, M.R., 2014. A bacterial iron exporter for maintenance of iron homeostasis. J. Biol. Chem. 289, 16498–16507. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571562

Sayed, A. m., Hassan, M. h. a., Alhadrami, H. a., Hassan, H. m., Goodfellow, M., Rateb, M. e., 2020. Extreme environments: microbiology leading to specialized metabolites. J. Appl. Microbiol. 128, 630–657. https://doi.org/10.1111/jam.14386

Schatz, A., Bugle, E., Waksman, S.A., 1944. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.∗†. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 55, 66–69. https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461

Schultz, T.R., Brady, S.G., 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 5435–5440. https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105

Schumacher, M.A., Gallagher, K.A., Holmes, N.A., Chandra, G., Henderson, M., Kysela, D.T., Brennan, R.G., Buttner, M.J., 2021. Evolution of a σ–(c-di-GMP)–anti-σ switch. Proc. Natl. Acad. Sci. 118, e2105447118. https://doi.org/10.1073/pnas.2105447118

Selim, M.S.M., Abdelhamid, S.A., Mohamed, S.S., 2021. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. J. Genet. Eng. Biotechnol. 19, 72. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9

Shapiro, J.A., 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol. 52, 81–104. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.81

Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S.D., Schwartz, S.A., Bruggemann, L., Aalinkeel, R., 2023. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Microorganisms 11, 1614. https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614

Sharma, S.K., Upadhyay, V., 2020. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. Indian J. Med. Res. 152, 185–226. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_902_20

Shcolnick, S., Keren, N., 2006. Metal Homeostasis in Cyanobacteria and Chloroplasts. Balancing Benefits and Risks to the Photosynthetic Apparatus. Plant Physiol. 141, 805–810. https://doi.org/10.1104/pp.106.079251

Shimkets, L.J., 1999. Intercellular signaling during fruiting-body development of Myxococcus xanthus. Annu. Rev. Microbiol. 53, 525–549. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.525

Simmons, S.L., Edwards, K.J., 2007. Unexpected diversity in populations of the many-celled magnetotactic prokaryote. Environ. Microbiol. 9, 206–215. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01129.x

Sivakala, K.K., Gutiérrez-García, K., Jose, P.A., Thinesh, T., Anandham, R., Barona-Gómez, F., Sivakumar, N., 2021. Desert Environments Facilitate Unique Evolution of Biosynthetic Potential in Streptomyces. Molecules 26, 588. https://doi.org/10.3390/molecules26030588

Soumya, E., Ibnsouda, S.K., Abdellah, H., Hassan, L., 2013. Experimental and theoretical investigations of the adhesion time of Penicillium spores to cedar wood surface. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 33, 1276–1281. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.026

Speziali, C.D., Dale, S.E., Henderson, J.A., Vinés, E.D., Heinrichs, D.E., 2006. Requirement of Staphylococcus aureus ATP-Binding Cassette-ATPase FhuC for Iron-Restricted Growth and Evidence that It Functions with More than One Iron Transporter. J. Bacteriol. 188, 2048–2055. https://doi.org/10.1128/jb.188.6.2048-2055.2006

Stach, E.M., Bull, A.T., 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 87, 3–9. https://doi.org/10.1007/s10482-004-6524-1

Steinberger, R.E., Allen, A.R., Hansma, H.G., Holden, P.A., 2002. Elongation Correlates with Nutrient Deprivation in Pseudomonas aeruginosa-Unsaturated Biofilms. Microb. Ecol. 43, 416–423.

Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 6, 199–210. https://doi.org/10.1038/nrmicro1838

Stockmar, I., Feddersen, H., Cramer, K., Gruber, S., Jung, K., Bramkamp, M., Shin, J.Y., 2018. Optimization of sample preparation and green color imaging using the mNeonGreen fluorescent protein in bacterial cells for photoactivated localization microscopy. Sci. Rep. 8, 10137. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28472-0

Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. 18, 321–336. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-h

Sun, Y.-Y., Chi, H., Sun, L., 2016. Pseudomonas fluorescens Filamentous Hemagglutinin, an Iron-Regulated Protein, Is an Important Virulence Factor that Modulates Bacterial Pathogenicity. Front. Microbiol. 7, 1320. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01320

Suryawati, B., 2018. Zinc homeostasis mechanism and its role in bacterial virulence capacity. Presented at the THE 8TH ANNUAL BASIC SCIENCE INTERNATIONAL CONFERENCE: Coverage of Basic Sciences toward the World's Sustainability Challanges, East Java, Indonesia, p. 070021. https://doi.org/10.1063/1.5062819

Sutherland, I., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiol. Read. Engl. 147, 3–9. https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3

Sutherland, J.B., Blanchette, R.A., Crawford, D.L., Pometto, A.L., 1979. Breakdown of Douglas-fir phloem by a lignocellulose-degradingStreptomyces. Curr. Microbiol. 2, 123–126. https://doi.org/10.1007/BF02603069

T

Taguchi, H., Koike-Takeshita, A., 2023. In vivo client proteins of the chaperonin GroEL-GroES provide insight into the role of chaperones in protein evolution. Front. Mol. Biosci. 10, 1091677. https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1091677

Talbot, N.J., 2003. Aerial Morphogenesis: Enter the Chaplins. Curr. Biol. 13, R696–R698. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.08.040

Tanida-Miyake, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Tanida, I., 2018. Optimization of mNeonGreen for Homo sapiens increases its fluorescent intensity in mammalian cells. PLoS ONE 13, e0191108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191108

Teng, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Pan, H., Xu, J., Huang, H., Xiao, T., Wu, L.-F., 2018. Diversity and Characterization of Multicellular Magnetotactic Prokaryotes From Coral Reef Habitats of the Paracel Islands, South China Sea. Front. Microbiol. 9, 2135. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02135

ter Beek, J., Guskov, A., Slotboom, D.J., 2014. Structural diversity of ABC transporters. J. Gen. Physiol. 143, 419–435. https://doi.org/10.1085/jgp.201411164

Theodoulou, F.L., Kerr, I.D., 2015. ABC transporter research: going strong 40 years on. Biochem. Soc. Trans. 43, 1033–1040.

Thiery, S., Kaimer, C., 2020. The Predation Strategy of Myxococcus xanthus. Front. Microbiol. 11, 2. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00002

Tiwari, K., Gupta, R.K., 2013. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. Crit. Rev. Microbiol. 39, 256–294. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709819

Tomita, K., 2014. Structures and Functions of Qβ Replicase: Translation Factors beyond Protein Synthesis. Int. J. Mol. Sci. 15, 15552–15570. https://doi.org/10.3390/ijms150915552

Torres, A.N., Chamorro-Veloso, N., Costa, P., Cádiz, L., Del Canto, F., Venegas, S.A., López Nitsche, M., Coloma-Rivero, R.F., Montero, D.A., Vidal, R.M., 2020. Deciphering Additional Roles for the EF-Tu, l-Asparaginase II and OmpT Proteins of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. Microorganisms 8, 1184. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081184

Trakhanov, S., Vyas, N.K., Luecke, H., Kristensen, D.M., Ma, J., Quiocho, F.A., 2005. Ligand-Free and -Bound Structures of the Binding Protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC Leucine/Isoleucine/Valine Transport System: Trajectory and Dynamics of the Interdomain Rotation and Ligand Specificity. Biochemistry 44, 6597–6608. https://doi.org/10.1021/bi047302o

U

Udwary, D.W., Zeigler, L., Asolkar, R.N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P.R., Moore, B.S., 2007. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete Salinispora tropica. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 10376–10381. https://doi.org/10.1073/pnas.0700962104

V

van der Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., van Wezel, G.P., 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 41, 392–416. https://doi.org/10.1093/femsre/fux005

Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., Gupta, R.S., van Sinderen, D., 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 91, 351–372. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9122-6

Victor, T.W., Easthon, L.M., Ge, M., O'Toole, K.H., Smith, R.J., Huang, X., Yan, H., Allen, K.N., Chu, Y.S., Miller, L.M., 2018. X-ray Fluorescence Nanotomography of Single Bacteria with a Sub-15 nm Beam. Sci. Rep. 8, 13415. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31461-y

Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., Ruby, E.G., 2000. Vibrio fischeri lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. J. Bacteriol. 182, 4578–4586. https://doi.org/10.1128/JB.182.16.4578-4586.2000

Vos, M., 2021. Myxococcus xanthus. Trends Microbiol. 29, 562–563. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.03.006

W

Wakeman, C.A., Moore, J.L., Noto, M.J., Zhang, Y., Singleton, M.D., Prentice, B.M., Gilston, B.A., Doster, R.S., Gaddy, J.A., Chazin, W.J., Caprioli, R.M., Skaar, E.P., 2016. The innate immune protein calprotectin promotes Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus interaction. Nat. Commun. 7, 11951. https://doi.org/10.1038/ncomms11951

Waksman, S.A., Woodruff, H.B., 1940. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 609–614. https://doi.org/10.3181/00379727-45-11768

Wang, Jiang, Y., Meyering-Voss, M., Sprinzl, M., Sigler, P.B., 1997. Crystal structure of the EF-Tu˙EF-Ts complex from Thermus thermophilus. Nat. Struct. Biol. 4, 650–656. https://doi.org/10.1038/nsb0897-650

Wang, T., Shen, P., He, Y., Zhang, Y., Liu, J., 2023. Spatial transcriptome uncovers rich coordination of metabolism in E. coli K12 biofilm. Nat. Chem. Biol. 19, 940–950. https://doi.org/10.1038/s41589-023-01282-w

Wang, X., Zhang, M., Gao, J., Pu, T., Bilal, M., Wang, Y., Zhang, X., 2018. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. Biol. Control 127, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.007

Watanabe, K., Okuda, T., Yokose, K., Furumai, T., Maruyama, H.B., 1983. ACTINOSYNNEMA MIRUM, A NEW PRODUCER OF NOCARDICIN ANTIBIOTICS. J. Antibiot. (Tokyo) 36, 321–324. https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.321

Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21, 319–346. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

Wedekind, J.E., Dutta, D., Belashov, I.A., Jenkins, J.L., 2017. Metalloriboswitches: RNA-based inorganic ion sensors that regulate genes. J. Biol. Chem. 292, 9441–9450. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.787713

Wei, Y., Perez, L.J., Ng, W.-L., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., 2011. Mechanism of Vibrio cholerae Autoinducer-1 Biosynthesis. ACS Chem. Biol. 6, 356–365. https://doi.org/10.1021/cb1003652

Weigel, M., Varotto, C., Pesaresi, P., Finazzi, G., Rappaport, F., Salamini, F., Leister, D., 2003. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem. 278, 31286–31289. https://doi.org/10.1074/jbc.M302876200

Wharton Jr, R.A., Parker, B.C., Simmons Jr, G.M., 1983. Distribution, species composition and morphology of algal mats in Antarctic dry valley lakes. Phycologia 22, 355–365. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-22-4-355.1

Wilkinson, C.J., Hughes-Thomas, Z.A., Martin, C.J., Böhm, I., Mironenko, T., Deacon, M., Wheatcroft, M., Wirtz, G., Staunton, J., Leadlay, P.F., 2002. Increasing the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 4, 417–426.

Williams, R.J.P., 2012. Iron in evolution. FEBS Lett., Electron/proton coupling in biological energy transduction 586, 479–484. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.068

Wilson, C.J., Apiyo, D., Wittung-Stafshede, P., 2004. Role of cofactors in metalloprotein folding. Q. Rev. Biophys. 37, 285–314. https://doi.org/10.1017/S003358350500404X

World Health Organization, 2023. Global tuberculosis report 2023.

Wright, L.F., Hopwood, D.A., 1976. Identification of the Antibiotic Determined by the SCP1 Plasmid of Streptomyces coelicolora3(2). Microbiology 95, 96–106. https://doi.org/10.1099/00221287-95-1-96

Wu, Y., Kang, Q., Zhang, L.-L., Bai, L., 2020. Subtilisin-Involved Morphology Engineering for Improved Antibiotic Production in Actinomycetes. Biomolecules 10, E851. https://doi.org/10.3390/biom10060851

X

Xiao, Y., Wei, X., Ebright, R., Wall, D., 2011. Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. J. Bacteriol. 193, 4626–4633. https://doi.org/10.1128/JB.05052-11

Xu, B., Liu, L., Song, G., 2022. Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. Front. Mol. Biosci. 8, 816398. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.816398

Y

Yagüe, P., Lopez-Garcia, M.T., Rioseras, B., Sanchez, J., Manteca, A., 2012. New insights on the development of Streptomyces and their relationships with secondary metabolite production. Curr. Trends Microbiol. 8, 65–73.

Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M.T., Rioseras, B., Martín, J.F., Sánchez, J., Manteca, A., 2014. Transcriptomic Analysis of Liquid Non-Sporulating Streptomyces coelicolor Cultures Demonstrates the Existence of a Complex Differentiation Comparable to That Occurring in Solid Sporulating Cultures. PLOS ONE 9, e86296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086296

Yan, N., 2015. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. Annu. Rev. Biophys. 44, 257–283. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901

Yang, W., Willemse, J., Sawyer, E.B., Lou, F., Gong, W., Zhang, H., Gras, S.L., Claessen, D., Perrett, S., 2017. The propensity of the bacterial rodlin protein RdlB to form amyloid fibrils determines its function in Streptomyces coelicolor. Sci. Rep. 7, 42867. https://doi.org/10.1038/srep42867

Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 183, 1113–1123. https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1113-1123.2001

Yong, C.-W., Deng, B., Liu, L.-M., Wang, X.-W., Jiang, H.-B., 2023. Diversity and Evolution of Iron Uptake Pathways in Marine Cyanobacteria from the Perspective of the Coastal Strain Synechococcus sp. Strain PCC 7002. Appl. Environ. Microbiol. 89, e0173222. https://doi.org/10.1128/aem.01732-22

Z

Zacchetti, B., Wösten, H.A.B., Claessen, D., 2018. Multiscale heterogeneity in filamentous microbes. Biotechnol. Adv. 36, 2138–2149. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.002

Zahra, Z., Choo, D.H., Lee, H., Parveen, A., 2020. Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. Environments 7, 13. https://doi.org/10.3390/environments7020013

Zhang, J., Zhao, T., Yang, R., Siridechakorn, I., Wang, S., Guo, Q., Bai, Y., Shen, H.C., Lei, X., 2019. De novo synthesis, structural assignment and biological evaluation of pseudopaline, a metallophore produced by Pseudomonas aeruginosa. Chem. Sci. 10, 6635–6641. https://doi.org/10.1039/C9SC01405E

Zhang, Ren, D., Li, Z., Yue, L., Whitman, W.B., Dong, X., Li, J., 2023. Internal transcription termination widely regulates differential expression of operon-organized genes including ribosomal protein and RNA polymerase genes in an archaeon. Nucleic Acids Res. 51, 7851–7867. https://doi.org/10.1093/nar/gkad575

Zhang, T., Liu, J., Fellner, M., Zhang, C., Sui, D., Hu, J., 2017. Crystal structures of a ZIP zinc transporter reveal a binuclear metal center in the transport pathway. Sci. Adv. 3, e1700344. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700344

Zhao, J., Bertoglio, B.A., Gee, K.R., Kay, A.R., 2008. The zinc indicator FluoZin-3 is not perturbed significantly by physiological levels of calcium or magnesium. Cell Calcium 44, 422–426. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.01.006

Zheng, T., Nolan, E.M., 2012. Siderophore-based detection of Fe(iii) and microbial pathogens. Metallomics 4, 866. https://doi.org/10.1039/c2mt20082a

Zhong, C., Zong, G., Qian, S., Liu, M., Fu, J., Zhang, P., Li, J., Cao, G., 2019. Complete Genome Sequence of Actinosynnema pretiosum X47, An Industrial Strain that Produces the Antibiotic Ansamitocin AP-3. Curr. Microbiol. 76, 954–958. https://doi.org/10.1007/s00284-018-1521-1

Annexe 1

Protéines	Fonction putative
WP_096497128.1	Facteur d ’élongation Tu
WP_012783072.1	Chaperonne GroEL
WP_232520035.1	SBP d’acides aminés à chaine ramifiée (ABC transporteur)
WP_015805227.1	Co-chaperonne GroES
WP_096497035.1	Isocitrate déshydrogénase NADP-dépendant
WP_096496085.1	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
WP_096496584.1	Facteur d’élongation Ts
WP_015803945.1	Facteur hôte d'intégration
WP_177154680.1	BMP family ABC transporter SBP
WP_015805176.1	Malate déshydrogénase
WP_096492061.1	SBP du transporteur ABC du glutamate
WP_015804615.1	Protéine ribosomale 50S L19 rplS
WP_096496665.1	Protéine de liaison à l'ADN de la famille HU
WP_015805312.1	Protéine ribosomale 50S L10 rplJ
WP_015805265.1	Protéine ribosomale 30S S4 rpsD
WP_096497130.1	Protéine ribosomale 30S S7
WP_096490930.1	Peptidylprolyl isomérase
WP_096497123.1	Protéine ribosomale 50S L6
WP_181320591.1	Facteur de transcription du régulateur de réponse
WP_096491083.1	Cold-shock protein

Protéines	Fonction putative
WP_015805280.1	Protéine ribosomale 50S L5
WP_096490969.1	Peroxirédoxine de la famille OsmC
WP_096497129.1	Facteur d’élongation G
WP_096496773.1	Sous-unité alpha F0F1 de l'ATP synthase
WP_096497410.1	Chaperonne DnaK
WP_096497084.1	Chaperonne GroEL
WP_096492447.1	Usp
WP_096491782.1	L-glutamate gamma-semialdéhyde déshydrogénase
WP_218181272.1	Acétyl-CoA C-acétyltransférase
WP_015804827.1	Sous-unité β de FoF1 ATP synthase AtpD
WP_096497474.1	Amidohydrolase
WP_096491982.1	Leucyl aminopeptidase
WP_096491641.1	Glutamate-ammonia ligase
WP_096492409.1	SBP liant les sucres
WP_096491072.1	Transporteur ABC (SBP)
WP_096497598.1	Transporteur ABC (SBP)
WP_096491473.1	Acétyl-CoA C-acétyltransférase
WP_096492106.1	Transporteur ABC (SBP)
WP_096496863.1	Alanine déshydrogénase
WP_096492783.1	YceI

Tableau des 40 protéines les plus abondantes retrouvées parmi les 4 protéomes d’A. pretiosum.

Annexe 2

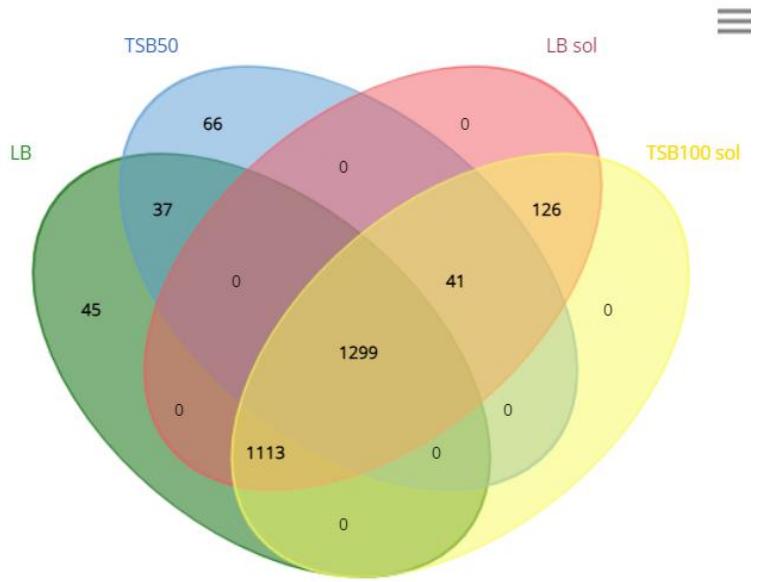


Diagramme de Venn des protéomes totaux d'A. mirum dans les 4 conditions.

1299 protéines sont partagées parmi les 4 conditions. Contrairement à A. pretiosum, nous ne retrouvons aucune protéines propres à la condition solide riche et pauvre. De manière intéressante la répartition des protéines de chaque protéomes est différente de celle observée pour A. pretiosum. Les conditions solides riches et pauvres partagent 126 protéines uniquement entre elles. 1113 protéines sont retrouvées à la fois en condition solide (riche et pauvre) et en condition LB liquide pour A. mirum contre 112 pour A. pretiosum (Figure 81). A l'inverse, aucune protéine n'est retrouvée commune entre les conditions liquide (riche et pauvre) et la condition solide riche alors que 288 protéines le sont pour A. pretiosum (Figure 81).

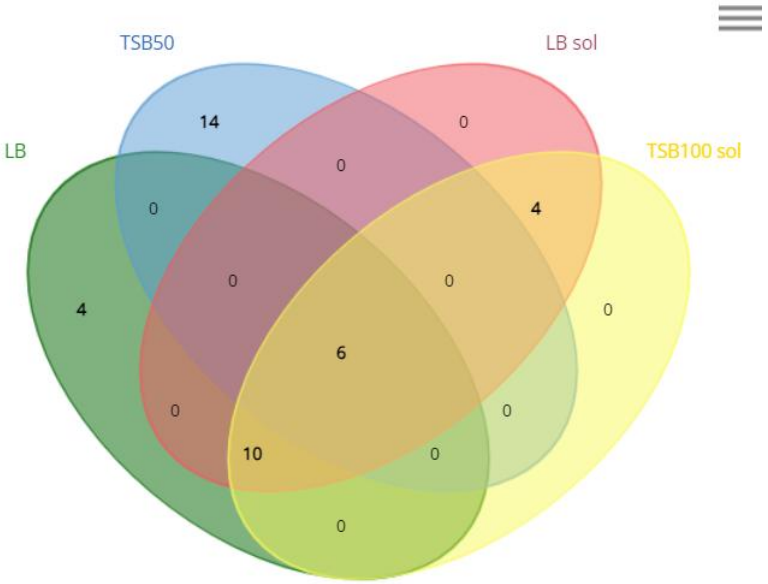


Diagramme de Venn des 20 protéines les plus abondantes d'A. mirum dans les 4 conditions de culture.

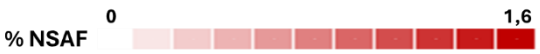
Protéine	Fonction prédite
WP_012783072.1	MULTISPECIES: chaperonin GroEL [Actinosynnema]
WP_012783385.1	MULTISPECIES: ABC transporter family substrate-binding protein [Actinosynnema]
WP_015805227.1	MULTISPECIES: co-chaperone GroES [Actinosynnema]
WP_012783700.1	L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase [Actinosynnema mirum]
WP_015804242.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [Actinosynnema]
WP_015805226.1	MULTISPECIES: chaperonin GroEL [Actinosynnema]

Tableau des 7 protéines communes aux 4 conditions de culture d'A. mirum.

Parmi les 7 protéines les plus abondantes communes aux 4 conditions chez A. mirum, on retrouve les protéines chaperons GroES et GroEL également retrouvées pour A. pretiosum.

Annexe 3

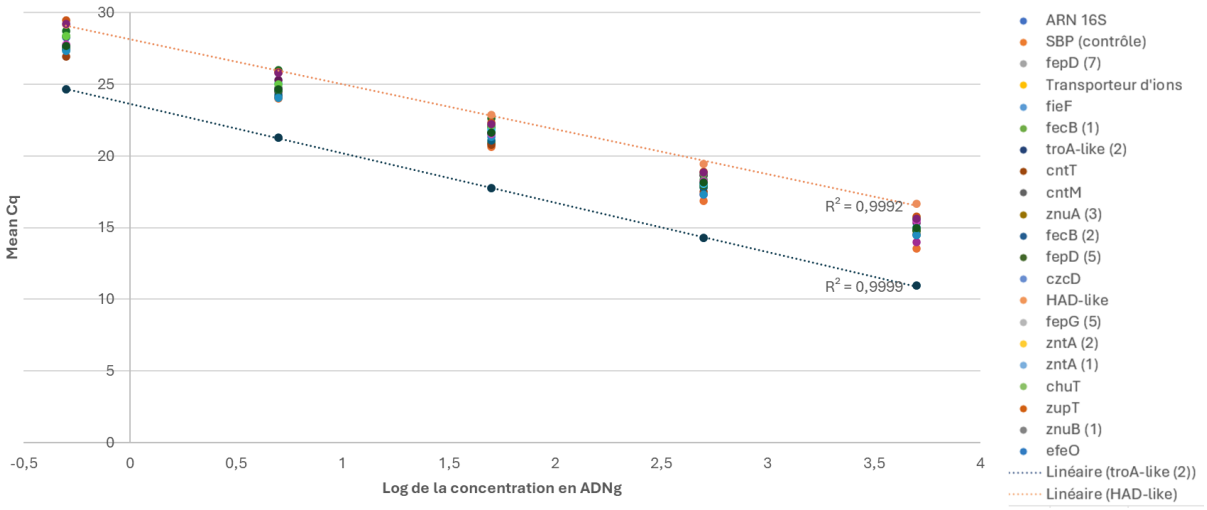
Fonction putatives des opérons	Fonctions putatives des gènes	Domaines conservés	Protéines	LB liquide	LB solide	TSB$^{1/50ème}$ liquide	TSB$^{1/100ème}$ solide
ABC transporteur	SBP	FecB (1)	WP_012782929.1				
ABC transporteur	SBP	Znu	WP_012782983.1				
ABC transporteur	ATPase	FepC (3)	WP_015801544.1				
ABC transporteur	SBP	TroA-like (2)	WP_015801547.1				
ABC transporteur	Réductase	ViuB	WP_015801548.1				
ABC transporteur	Méthyltransferase	CntT	WP_015802671.1				
ABC transporteur	ATPase	CntR	WP_015802672.1				
ABC transporteur	SBP	CntP	WP_187313425.1				
ABC transporteur	MFS transporteur	CntE	WP_015802675.1				
ABC transporteur	Staphylopine	CntM	WP_015802676.1				
ABC transporteur	NAS-like	CntL	WP_015802677.1				
ABC transporteur	Protéine hypothétique	Protéine hypothétique	WP_015802679.1				
ABC transporteur	ATPase	FepC (5)	WP_015803762.1				
ABC transporteur	SBP	FhuD	WP_015803037.1				
Exporteur de Fe/Zn/Co	CDF	FieF	WP_015805008.1				
	SBP contrôle		WP_012783385.1				



Heatmap des protéines impliquées dans le transport du fer ou du zinc détectées en protéomique pour A. mirum.

La moyenne des SAF a été faite puis multipliée par 100 pour obtenir le pourcentage d'abondance dans chaque conditions.

Annexe 4



Courbe d'étalonnage des amorces effectuée pour les qPCR sur des concentrations connues d'ADNg

Annexe 5

5’GAGGGCGCGTCGGCGGCGGTGGTCGTGGTGTCGGACGGGGAGCGCGTGAGCGCGGAG
GTCCGCAACGGCGCGCCCCCGGACCGGGGCTGCGCGGGCCTGCCGAGCGGCTGCCACGG
TCTGGTGGGGCTGCGGGAGCGGGCGGCGCTGCTGCGCGGCCGGTTCCACGCGGGGCCGA
CGGACGACGGCGGTTTCGTGGTGCGCGTGGACTTCCCGCTCGACGCGGGGTGCGACGGG
GCCGAGGGCACGACCGGGGAGGCGGTGACCGGGAGCGATCCGGTGGGCGCGACGGGGC
GGGGGTGA **3’**

Région d’homologie en amont du promoteur ermEP.

5’GCGGGGCGGGCCCGTGGGGTGACAGCGGGACGCGCCGGGGCGGGGGGACGGGCGGGG
CTCGGTGGGGCGGGAGGGTGACAGGCAGGGCTCGGCGGGCAGGGCTCGGCGGGCAGGG
CTCGGCGGGCGCGGCTCGGCGGGCGGGAAGCACTGCGGGAAACCCTTGGTGCGCAACGG
GAATCCGAAGCGCGGCGGGTGCGGTGCGGTCAGTGCGGCCCGGTCGGCGTGGCGCGGCT
GGCGCGGCAGGCGCGACGCGGCCGGTGCGGCGCAACCGGCGCGTGTGGCGCGGCAGCCG
GTGTGGCG **3’**

Région d’homologie en aval du gène mNeonGreen

5’CATGCGAGTGTCCGTTCGAGTGGCGGCTTGCGCCCGATGCTAGTCGCGGTTGAT
CGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTCGATCTTGACGGCTGGCGAGAGGTGCGGGGA
GGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGCACCGCGATGCTGTTGTGGGCACAATC
GTGCCGGTTGGTAGGATCCacatATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCC
TCTCTCCCAGCGACACATGAGTTACACATCTTTGGCTCCATCAACGGTGTGGACTT
TGACATGGTGGGTCAGGGCACCGGCAATCCAAATGATGGTTATGAGGAGTTAAA
CCTGAAGTCCACCAAGGGTGACCTCCAGTTCTCCCCCTGGATTCTGGTCCCTCATA
TCGGGTATGGCTTCCATCAGTACCTGCCCTACCCTGACGGGATGTCGCCTTTCCAG
GCCGCCATGGTAGATGGCTCCGGATACCAAGTCCATCGCACAATGCAGTTTGAAG
ATGGTGCCTCCCTTACTGTTAACTACCGCTACACCTACGAGGGAAGCCACATCAA
AGGAGAGGCCCAGGTGAAGGGGACTGGTTTCCCTGCTGACGGTCCTGTGATGACC
AACTCGCTGACCGCTGCGGACTGGTGCAGGTCGAAGAAGACTTACCCCAACGAC
AAAACCATCATCAGTACCTTTAAGTGGAGTTACACCACTGGAAATGGCAAGCGCT
ACCGGAGCACTGCGCGGACCACCTACACCTTTGCCAAGCCAATGGCGGCTAACTA
TCTGAAGAACCAGCCGATGTACGTGTTCCGTAAGACGGAGCTCAAGCACTCCAAG
ACCGAGCTCAACTTCAAGGAGTGGCAAAAGGCCTTTACCGATGTGATGGGCATG
GACGAGCTGTACAAGTAA **3’**

Séquence du promoteur du gène codant la résistance à l’érythromycine surlignée en jaune et la séquence de la mNeonGreen en vert

5’GTCCGTCCGGCGACTCGTGACCTGGGGACGGGCGCGCCGGGCGGAAACCCGAAGAAA
ACGCGGGTGCTGTCGGCCGGAGGGCCGGGAATACCGGTTCTCCGGAAACGCGGAAAGAT
AGGGGTTTTGCTCACGGAATCGACAGGTGGCCAAATCTTGTGCGGACCGCCGGGCGCTGC

TAACTTCCGCGAAGTCGTTATTCCCTGTTGAGGAGGAATTGAATGCGGTCGAGGTTCCGC
GCGCTCAGCGCCCTGCTCGCCGTTTCCGCCAGTCTCGCCGTTTTCTCCCCCGCCGCGTCCG
CCGACCCGATCCCGGCTCCGCTGCCGCCGAACTGCGGCGTCGCCGACTTCTGCACCTGGT
CCGTCTTCGTGATCCCCGGCGAGCCCTCCGACGCCGTCCCGACCATTCGCACGACCGGCG
ACTGGAGCGGTGAGGCGGTGGCGTTCCGGCTCTACAACAACACCGGTCGCTACGCGCAC
GTGTCGTACGAGGAGAAGCTCGACGACGGCACCATCCGCCGGTACGAGAGCTGCTTCGG
CCCGGTCTGGCGCTACTTCACCCGGCCGTTCACCGTCACCGGCGTGACCTTCCACGACCA
GCCGACCCAGCAGTACTGCTAGTCCGCCGCGGGTCCACGACGGCCGCCGCTCCCACGCCG
GGGGTGGCGGCCGTCGTCGCGAGCTGACTGTGGCGCGCGTCACACTTGTTGCGGCCGGGG
AACTCCCTCGTTCCAGCGTCCGACCCCCTAGCGTGACGAGTTGCTCACGATGCGCTGTCG
CCCCTGGTCGGCGGCGGGACTCAGGAGGGTTCGGTGGGACACGACCTGGCCCGGTCACC
GGGAGGCCCGCCCA **3'**

Séquence de la région promotrice de l'opéron cnt clonée en amont du gène codant la mNeonGreen dans le pIB139.

5'CGGGTGGTCGTCGTCCTCCCAGGTACCCGCCCACCACTCCGCGCGGTTGCGGCCCAGGT
CGAAGGGGCTTTCCCTGGCGGGCCACTCCGACTCGCCAGGGGACCACTCGCGCAGGGGA
AGCAGGCCGCAGTGCGGGCCCGTGCCGCCGTCGCCCAGTTCCAGCAGGAAGCGGCGGTA
CGCCTGCGGGAGGGTGACGCCCTGCTCGCGTTCGAACGCCTCGACCTCGGCTTCCGACGC
CGGTGGGTTCAG **3'**

Séquence de la région promotrice de l'opéron znu1 clonée en amont du gène codant la mNeonGreen dans le pIB139.

5'CGGGTGGTCGTCGTCCTCCCAGGTACCCGCCCACCACTCCGCGCGGTTGCGGCCCAGGT
CGAAGGGGCTTTCCCTGGCGGGCCACTCCGACTCGCCAGGGGACCACTCGCGCAGGGGA
AGCAGGCCGCAGTGCGGGCCCGTGCCGCCGTCGCCCAGTTCCAGCAGGAAGCGGCGGTA
CGCCTGCGGGAGGGTGACGCCCTGCTCGCGTTCGAACGCCTCGACCTCGGCTTCCGACGC
CGGTGGGTTCAGGTGGCCGCGCAGGGCGGTGGGCTTGACGGTCGCGGCGAGGCGCTCGT
CCGCCTGCAGGCGGGCCAGCTTGGTCCTGATCCGGGTGATGGTGTCGTCCACGTGCGCCC
CTCCTCGTGCTGGAGGGATTGCGCACCCGGCGGGTGCTGGGTGGCAGCCCGCGCACCTGG
CCGTTCGTTGAAAATGGTTGTCGTTTGTATTAGCTTCACGGGGGCCCGCCTGCTCAGGTGG
GGCGTCTGGAGGTGTTCGAAGAC **3'**

Séquence de la région promotrice de l'opéron znu3 clonée en amont du gène codant la mNeonGreen dans le pIB139.

Annexe 6

	Nom	Séquence
Vérification du MCS du vecteur pTMW0018 et la présence du gène de résistance	phZ1358comp T3	ATTATTATCATGACATTA AC (20)
	pHZ1358comp T7	TGGAATGAACAATGGAA GTC (20)
	apmRdir	CCACAGGCAGAGCAGAT CA (19)
	apmRrev	TGATCTGCTCTGCCTGT GG (19)
Vérification de la présence de la mNeonGreen	mNeonGreen FW	GTTGGTAGGATCGACATATG
	mNeonGreen Rev	ACTTGTACAGCTCGTCCATG
Amplification de la région promotrice de l'opéron *cnt*	pcnt 1888pb Nsi1 Fw	TGCATGCATATGTCGGTGCCAAGCA AGCT
	pcnt 1888pb Nde1 Rev	GAATTCCCCATATGGGCGGGCCTCC CGGTGAC
Amplification de la région promotrice de l'opéron *znu3*	pZnu3 500pb Nsi1 Fw	TGCATGCATCGGGTGGTCGTCGTCCT CCCA
	pZnu3 500pb Nde1 Rev	GAATTCCCCATATGGTCTTCGAACAC CTCCAGAC
Amplification de la région promotrice de l'opéron *znu1*	pZNU1A 386pb NsI1 FW	TGCATGCATCTGCGCCTGACCGATG A
	pZnu1A 386pb Nde1 Rev	GAATTCCCCATATGTCGTCGATCGG GCCTTGA
Vérification de l'intégration des gènes cibles dans les vecteurs	M13uni-21	CAGGAAACAGCTATGACC
	M13rev 49	GAGCGGATAACAATTTCACACAGG