UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

THÈSE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 7242 - Biotechnologie et Signalisation Cellulaire

Présentée par :

Marion LEMARE

Soutenue le : **15 septembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteure de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Utilisation de microorganismes pour la bioremédiation de déchets amiantés à matrices minérales et organiques

THÈSE dirigée par :

Pr. Valérie GEOFFROY	Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Christophe BORDI	Université d'Aix-Marseille
Dr. Georges AOUAD	Institut Mines Telecom

EXAMINATRICE :

Pr. Anne-Désirée SCHMITT	Université de Strasbourg

MEMBRES INVITÉS :

Dr. Coraline RIGOUIN	Université de Strasbourg
Pr. Mélanie MOREL-ROUHIER	Université de Lorraine
Dr. Dris IHIAWAKRIM	Université de Strasbourg

À Mémée

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement le Pr. Christophe Bordi et le Dr. Georges Aouad d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, pour le temps qu'ils accorderont à la lecture et à l'analyse de ce manuscrit et pour leur participation au jury.

Je souhaite remercier également chaleureusement le Dr. Anne-Désirée Schmitt d'avoir accepté d'examiner mon travail et de participer au jury. Je vous remercie également, avec le Pr. Bordi pour avoir accepté de suivre l'avancement de mon projet lors des Comités de Suivi de Thèse annuels. Merci pour vos nombreux conseils et suggestions qui ont été de précieux atouts pour mener à bien ce projet. Votre enthousiasme a contribué au développement de mes recherches durant ces trois années.

Je remercie également le Dr. Mélanie Morel-Rouhier et le Dr. Dris Ihiawakrim pour les expériences que nous avons mises au point ensemble. Je vous remercie pour ces idées que nous avons explorées et pour votre expertise apportée à mon projet de recherche. Merci de m'avoir accueilli au sein de vos laboratoires et de m'avoir formé à vos méthodes de recherche. Merci pour ces résultats si intéressants et pour toutes les perspectives qu'ils apportent à ce projet.

Je tiens à remercier le Dr. Isabelle Schalk et le Dr. Gaëtan Mislin de m'avoir accepté au sein de l'équipe MMBCA où j'ai eu l'opportunité d'effectuer mon stage de Master et ma thèse. Merci Gaëtan d'avoir toujours répondu à mes (nombreuses) questions de chimie, d'avoir joué au savant fou avec moi pour dissoudre le PVC dans les petits pots pour bébé puis d'avoir passé des heures à essayer de filtrer ce fichu PVC. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tous tes gouters.

Je voudrais particulièrement exprimer mes remerciements au Professeur (et oui c'était l'occasion de l'écrire enfin en toutes lettres) Valérie Geoffroy sans qui tout ce travail n'aurait jamais existé. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir guidé et de m'avoir fait confiance pour porter votre projet durant ces trois années.

Enfin, du plus profond de mon cœur, je remercie le Dr. Coraline Rigouin pour son encadrement durant ma thèse. Merci de m'avoir tant appris, tant conseillé et d'avoir toujours eu les bons mots, parfois accompagnés de cookies ou d'une bière qui réchauffe le cœur après des après-midi entiers de rédaction. Je te remercie pour la sagesse et la bienveillance que tu incarnes. Tu as cette capacité admirable à brancher ton cerveau si rapidement, qu'importe la problématique, qui fait de toi la co-directrice idéale. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme même après le 430ème essai de dosage de ROS. C'était un réel plaisir de travailler et d'évoluer à tes côtés.

Merci à tous les membres de l'équipe, déjà partis ou encore présents. Merci à Seb de m'avoir formé quand je n'étais encore qu'un baby scientifique. Merci pour tous tes conseils et de tout le temps que tu as pu me consacrer afin que je prenne ton relai sur tes expériences de MacGyver. Merci à Anne pour tous tes conseils techniques et ta bonne humeur. Merci à Olivier pour toutes ces questions auxquelles tu as répondu, ces brainstormings et les trop nombreux acharnements sur les violettes de Bloc en stock après le travail. Merci à Françoise, Véronique, Pierre et Régine, Sarah et Gwen pour votre bonne humeur quotidienne. Merci à vous, les djeuns, pour tous ces fous rires, ces apéros, ces discussions à n'en plus finir. Merci pour cet esprit d'équipe mais aussi de compétition pendant ces trop nombreux uno aux règles nulles qui redonnaient quand même la force d'écrire l'après-midi.

Hélène, le sang de la veine, Thibaut, la rue la vraie, je vous dédicace ce paragraphe rien que pour vous. Merci d'avoir été mes compagnons de bureau pendant ces trois ans. Même si on s'insultait souvent et qu'on avait un seuil de tolérance fixé à trois jours consécutifs, je n'aurais pas pu rêver mieux comme collocs. Vous m'avez fait rire aux larmes, boire beaucoup trop de café et écrire n'importe quoi sur un tableau blanc mais vous étiez des chics types. Hélène, merci d'avoir été l'épaule démunie sur laquelle j'ai pu m'appuyer et pleurer (de rire évidemment). A toutes ces soirées conclues par un « oh non j'ai encore trop parlé » et aux lendemains difficiles. Prends soin de ma plante, par pitié. Vous allez tous me manquer, la plante aussi.

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires que j'ai pu encadrer ou qui ont participé à l'avancement de mon projet. Chloé, Cloé, Fanny, Gabriel, Julien, Junge, Océane, Olivia et Sandrine,

je vous remercie pour cette expérience enrichissante qui m'a permis d'avancer dans mon projet de recherche.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude la plus sincère à mes parents et à mon petit frère. Votre soutien indéfectible a été essentiel à l'accomplissement de ce projet. Merci pour cette stabilité que vous m'avez offerte et cette confiance que vous m'avez accordée, me permettant de me concentrer pleinement sur mes études et de mener mon petit bout de chemin. Merci d'avoir toujours été là lors de mes trop nombreux déménagements, de m'avoir conduit à l'autre bout de la France ou de la Suisse, d'être venus me voir dès que l'occasion se présentait. Julien, merci pour tous tes colis de viande pour être sûre que je ne manque de rien dans ma ville. Maman, merci d'avoir toujours su trouver les mots justes ou de m'avoir fait des litres de crème renversée quand tu ne les trouvais pas. A vous trois, merci d'avoir toujours nourris mon deuxième cerveau, c'est le plus beau des cadeaux.

Enfin, je ne serais pas moi si je n'étais pas entourée d'amies si chères, mes sœurs, sans ces moments avec vous rien n'aurait été pareil.

Anne, ma meilleure amie depuis toujours, mon alter-ego, merci d'être la fille géniale que tu es, si naturelle et si bienveillante. Toi qui est si fière de me dire tout le temps « non mais tu ne te rends pas compte de ce que tu fais », sache que je suis encore plus fière de t'avoir dans ma vie.

Dr. Lucile, après avoir été mon rayon de soleil dans le ciel gris de Picardie tu es maintenant mon soleil tout entier dans le ciel de Marseille. Merci de me faire autant rire, chaque virée chez toi était une telle bouffée d'oxygène. Je remercie la vie d'avoir mis dans ma classe une nenette qui mangeait son goûter dans le couloir, à ce moment-là je savais déjà que tu serais ma go sûre. Et bien sûr, puisque je te le dois bien et que tu m'as évité d'hyper ventiler trop souvent, merci d'avoir pris de ton temps et de ton énergie pour relire cette thèse et corriger les paragraphes Brico Dépôt.

Laura, auto-proclamée psychothérapeute de substitution, merci pour toutes ces phrases prononcées d'une seule voix et ces phrases qui n'ont même pas besoin d'être prononcées quand un seul regard suffit. Merci d'avoir mis autant d'highlight dans ma vie.

Marina, même si on s'est bien assagies et que maintenant je repars de chez toi avec des géraniums à 21h30, merci pour toutes ces années, pour moi Strasbourg c'est toi, Strasbourg c'est nous.

Mylène, tu été ma plus belle rencontre durant cette thèse et je suis reconnaissante de partager mon quotidien avec toi. Merci pour ces moments de vie, ces rires, ces commérages, ces trois jours de courbatures quand je veux faire la maligne à te suivre mais surtout merci pour cette passion du voyage que tu as su me transmettre sans t'en rendre compte. Continue de rayonner comme tu le fais.

Maïka, Mélo, Laurette, Océane, merci de faire partie de ma vie, vous êtes merveilleuses.

Enfin, ce manuscrit ne serait rien sans ma contribution personnelle, alors je tiens à exprimer ma gratitude profonde envers l'enfant passionnée de sciences que j'étais, envers la femme accomplie que je suis aujourd'hui et celle que je serai grâce à ce projet. Je souhaite me remercier d'avoir accompli ce travail difficile et de n'avoir jamais renoncé. Je suis reconnaissante pour tout le chemin parcouru et pour être allée au-delà de ce que je pensais possible. Merci pour ce voyage.

Table des matières

Introduction 17

Partie I Synthèse bibliographique 7

Chapitre 1 Contribution des processus biologiques à la gestion des déchets amiantés 9

1. Introduction de la revue 11
2. Contribution des auteurs 12
3. Résumé de la revue 13

Chapitre 2 Les *Pseudomonas* 16

1 Les caractéristiques du genre *Pseudomonas* 18

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* 21

1.2 *Pseudomonas putida* 23

2 L'acquisition du fer chez les *Pseudomonas* 24

2.1 Utilisation de l'hème 25

2.2 Utilisation du fer ferreux 26

2.3 Production et utilisation des sidérophores 26

3 Le système pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* 34

3.1 La biosynthèse de la pyoverdine 34

3.2 Organisation des gènes impliqués dans le système pyoverdine 39

3.3 Régulation du système pyoverdine 40

Chapitre 3 La dégradation des déchets amiantés 46

1. Les principaux types de déchets amiantés 48

1.1 Les matériaux en amiante-ciment 50

1.2 Les dalles vinyles 51

1.3 Le flocage et le calorifugeage 51

2 Nature des matrices retrouvées dans les déchets amiantés 52

2.1 Les matrices minérales 52

2.2 Les matrices organiques plastiques : le cas du PVC 54

3 Dégradation biologique des déchets amiantés à matrices minérales et organiques 55

3.1 Dissolution des matrices minérales par des acides organiques 55

3.2 Altération de la matrice organique de PVC 56

3.3 Altération des fibres amiantées par les *Pseudomonas* producteurs de pyoverdine 60

Partie II Résultats et discussion 62

Chapitre 1 Ingénierie de la voie pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa* 64

1 Introduction de l'article 66

2 Contribution des auteurs 67
3 Résumé des résultats 68
Chapitre 2 Ingénierie de *Pseudomonas putida* pour l'optimisation de la production de pyoverdine 69
1 Modification de la région promotrice de *pvdS* 71
1.1 Construction des mutants PP_P_{BAD} et PP_Pc 71
1.2 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_$_{PBAD}$ 73
1.3 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_Pc 80
2 Délétion du régulateur Fur 83
2.1 Construction du mutant PP_Δ*fur* 83
2.2 Mise au point des conditions de culture du mutant PP_Δ*fur* 84
2.3 Caractérisation du mutant PP_Δ*fur* 91
3 Délétion de la capacité à produire de la pyoverdine 94
3.1 Construction du mutant PP_Δ*pvdA* 94
3.2 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_Δ*pvdA* 95
3.3 Production de sidérophore secondaire 96
4 Matériel et Méthodes 99
4.1 Souches bactériennes 99
4.2 Biologie moléculaire 99
4.3 Microbiologie 107
Chapitre 3 Altération des déchets amiantés à matrice minérale : le flocage 112
1 Caractérisations préliminaires 114
1.1 Caractérisation des déchets de flocage 114
1.2 Etude de la dépendance au magnésium des différentes souches de *Pseudomonas* 115
2 Altération des déchets de flocage par *Pseudomonas putida* 117
2.1 Suivi de l'altération des déchets de flocage 117
2.2 Comparaison de l'altération en milieu minimum citrate 121
2.3 Suivi de l'altération par une souche incapable de produire de la pyoverdine 126
3 Dissolution de la matrice des déchets de flocage en milieux acides 131
3.1 Altération longue durée : comparaison de la dissolution en milieu citrate et en milieu petit lait ensemencé ou non par une bactérie lactique 132
3.2 Optimisation de l'altération en présence de petit lait ensemencé par les bactéries lactiques 136
4 Combinaison des traitements biologiques pour la dégradation des déchets de flocage 143

4.1 Suivi de l'altération en milieu petit lait ensemencé par *Lactobacillus plantarum* puis par *Pseudomonas putida* 143
4.2 Suivi de l'altération en milieu citrate puis par *Pseudomonas putida* 149
4.3 Optimisation de l'altération en milieu petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* ou *L. brevis* puis par PP_Δ*fur* 153
5 Observations des interactions bactéries / fibres par MET *in situ* 159
6 Matériel et Méthodes 160
6.1 Souches bactériennes 160
6.2 Milieux de culture et réactifs 161
6.3 Sécurité des manipulations 161
6.4 Préparation des déchets amiantés 161
6.5 Dosages colorimétriques 162
6.6 Dépendance des souches de *Pseudomonas* au magnésium 163
6.7 Croissance des bactéries lactiques en milieu petit lait 164
6.8 Altération des déchets de flocage 164
6.9 Microscopie Electronique à Transmission 170
Chapitre 4 Altération des déchets amiantés à matrice organique : les dalles vinyles amiantées 172
1 Identification des fibres d'amiante présentes dans les dalles vinyles amiantées 174
2 Dissolution chimique de la matrice 174
2.1 Elimination de la matrice de PVC 174
2.2 Elimination de la matrice inorganique blanche 178
2.1 Caractérisation des éléments résiduels non dissous 186
3 Dissolution thermique 189
4 Dissolution biologique 190
4.1 Altération biologique par voie fongique en milieu liquide 191
4.1 Altération biologique par voie fongique en milieu solide 195
5 Matériel et Méthodes 198
5.1 Sécurité des manipulations 198
5.2 Préparation des déchets de dalles vinyles amiantées 198
5.3 Caractérisation des déchets de dalles vinyles amiantées 199
5.4 Dissolution chimique des dalles vinyles amiantées 199
5.5 Dissolution thermique des dalles vinyles amiantées 202
5.6 Dissolution biologique des dalles vinyles amiantées 202
Partie III Discussion et perspectives 206

Liste des abréviations

ABC transporteur : ATP Binding Cassette = transporteurs à cassettes liant l'ATP

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN(r) : Acide RiboNucléique (régulateur)

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

CAS : Chrome Azurol S

CHR-Gy : Chrysotile-Gypse : déchets de flocage

ECF : Extra-Cytoplasmic Factor = Facteurs sigma *à fonction* extracytoplasmique

Fur : Ferric Uptake Regulator

NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthetase = enzyme de synthèse des peptides non ribosomiques

Opr : Outer membrane porine

Pb : paire de base

PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria = rhizosphere

PVC : PolyChlorure de Vinyle

PVD : pyoverdine

ROS : Reactive Oxygen Species = espèces réactives de l'oxygène

TBDT : TonB dependant transporter

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

Depuis 1997, l'interdiction d'utiliser de l'amiante est à l'origine de campagnes de désamiantage provoquant l'accumulation de millions de tonnes de déchets amiantés. Les fibres amiantées contenues dans les déchets présentent une double toxicité, notamment due à la présence de fer ayant des effets cancérigènes sur l'organisme. Il n'existe actuellement que deux techniques de gestion des déchets amiantés (Damien, 2016 ; Dériot and Godefroy, 2005). La plus utilisée, l'enfouissement, nécessite de grands espaces et ne permet pas de neutraliser la toxicité liée au fer présent dans les fibres d'amiante. L'autre méthode, la vitrification par fusion plasma, permet de convertir l'amiante en un verre stable et non toxique mais nécessite d'importantes quantités d'énergie et présente un coût élevé (Damien, 2016b). La recherche de nouveaux moyens de traitement pouvant répondre aux problèmes de toxicité, de prix, et de coûts énergétique et environnemental représente donc un enjeu majeur pour la société.

Ainsi, l'équipe Métaux Micro-organismes : Biologie, Chimie et Applications (MMBCA) développe des procédés biologiques de détoxification de déchets amiantés basés sur l'utilisation de bactéries du genre *Pseudomonas,* productrices de sidérophores. Les sidérophores sont des métabolites, produits par les bactéries, capables de chélater le fer de l'environnement avec une forte affinité afin de l'utiliser pour leur croissance. Notre équipe a ainsi pu démontrer que l'utilisation de ces bactéries est une stratégie prometteuse pour extraire le fer des fibres d'amiante présentes dans le déchet dans le but de rendre le matériau moins toxique (David *et al.*, 2020a). Toutefois, du fait de la répression de la voie de biosynthèse des sidérophores en présence du fer solubilisé des fibres d'amiante, cette extraction par les bactéries reste très limitée (David *et al.*, 2020b). De plus, afin d'extraire ce fer, les fibres doivent être préalablement libérées de la matrice organique ou minérale (en fonction du type de déchet amianté) dans laquelle elles sont piégées. Les travaux exploratoires ont été principalement menés sur *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie modèle du laboratoire dont les systèmes d'acquisition du fer sont bien connus mais qui est un pathogène opportuniste. Dans l'objectif de trouver un procédé industrialisable, mon travail de thèse s'est focalisé sur *Pseudomonas putida*, bactérie bien connue en bioremédiation. Cette dernière est capable de produire une pyoverdine, mais de structure différente de celle de *P. aeruginosa* et dont la voie de biosynthèse et la régulation sous-jacente sont néanmoins moins connues.

L'objectif à long terme de ce travail de thèse est le développement de procédés de bioremédiation des déchets amiantés à matrice minérale et organique. Ce travail est divisé en trois objectifs principaux :

- **La construction de mutants de *Pseudomonas* dont la production de pyoverdine est dérégulée vis-à-vis de la présence de fer.** Ces mutants permettront de nous focaliser sur le régulateur de la voie pyoverdine dépendant de la présence de fer intracellulaire et de son rôle dans le métabolisme général de *Pseudomonas putida*. L'objectif est de développer une souche optimisée pour la bioremédiation des déchets amiantés.
- **L'optimisation de la dégradation de déchets de flocage, déchet amianté à matrice minérale**. L'objectif est d'évaluer la dissolution de la matrice du déchet dans différents milieux acides : le milieu citrate, le milieu petit lait, le milieu petit lait ensemencé par des bactéries lactiques ainsi que la combinaison du traitement en milieu acide suivi de la dégradation spécifique par les mutants *Pseudomonas* produisant en continue de la pyoverdine.
- **L'exploration de diverses voies d'altération de déchets amiantés à matrice organique**. Dans ce travail, les dalles vinyles amiantées ont été choisies comme déchets compte tenu des tonnages importants répertoriés. Afin d'isoler les fibres amiantées liées au sein de la matrice de PVC, nous avons pour objectifs de tester un traitement chimique de dissolution de la matrice utilisant des solvants et des acides, une voie thermique afin de calciner le PVC ainsi que de tester une alternative biologique fondée sur la dégradation fongique. Aucun travail n'a été décrit à ce jour sur la dégradation des dalles vinyles amiantées.

La **première partie** de ce manuscrit est constituée d'une synthèse bibliographique divisée en quatre chapitres. Le **premier chapitre** est constitué d'une revue soumise dans « Journal of Hazardous Materials » le 21 avril 2023 et actuellement en cours de resoumission dans « Journal of Environmental Management ». Cette revue dresse un historique de l'utilisation de l'amiante dans le monde et répertorie les différents procédés existants, ou en cours de développement, de traitements des fibres d'amiantes mais aussi des déchets amiantés composés de diverses matrices. Cette revue s'intéresse plus particulièrement au développement des traitements biologiques pour détoxifier les

déchets amiantés. Le **deuxième chapitre** s'intéresse aux bactéries du genre *Pseudomonas* et leurs mécanismes d'acquisition du fer, notamment le système pyoverdine qui est l'élément central d'une grande partie des recherches effectuées durant cette thèse. **Le troisième chapitre** fait un état de l'art des connaissances sur les déchets amiantés et les matrices minérales et organiques qui les composent puis se focalise sur la dégradation des matrices mais aussi l'altération des fibres amiantées par les *Pseudomonas* producteurs de pyoverdine.

La **deuxième partie** de ce manuscrit est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus durant cette thèse. Le **premier chapitre** est constitué d'un article scientifique publié en mai 2022 dans « Microbial Biotechnology » et qui décrit l'ingénierie d'une souche de *P. aeruginosa* afin d'obtenir une production de pyoverdine optimisée pour l'altération des déchets amiantés. Le **deuxième chapitre** présente une partie sur l'optimisation de la production de pyoverdine chez *P. putida* et une partie constituée d'une publication scientifique finalisée mais non soumise portant sur la caractérisation du régulateur au fer chez *P. putida*. Le **troisième chapitre** porte sur l'altération de déchets de flocage, déchet amianté à matrice minérale, par des milieux acides et par les *Pseudomonas*. Le **quatrième chapitre** traite de l'altération d'un déchet amianté à matrice organique, les dalles vinyles amiantées par des voies chimique, thermique et biologique. Les méthodes et les protocoles utilisés sont développés à la fin de chaque chapitre.

Enfin, la **troisième partie** du manuscrit est une discussion permettant de mettre en perspectives les résultats obtenus et de dresser un bilan des différents mécanismes d'altération biologique des déchets amiantés à matrices minérales et organiques afin de proposer deux procédés de bioremédiation.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Contribution des processus biologiques à la gestion des déchets amiantés

1. Introduction de la revue

L'amiante est un groupe minéral composé de deux familles, les serpentines, dont l'unique représentant est le chrysotile et les amphiboles regroupant les amosites, les crocidolites, les actinolites, les trémolites et les anthophyllites. Le chrysotile, l'amosite et la crocidolite sont les espèces les plus souvent retrouvées dans les déchets amiantés. En raison des caractéristiques physico-chimiques exceptionnelles de ces fibres de silicate, l'amiante a été largement utilisé dans le monde entier dans de nombreuses exploitations industrielles. Bien que l'amiante ait été reconnu comme toxique, en partie à cause de la présence de fer, il a été continuellement exploité jusqu'à des interdictions successives dont la dernière a eu lieu en 2018 au Canada. Les produits contenant de l'amiante constituent une famille bien connue de matières dangereuses causant des problèmes de santé comme la fibrose ou le cancer (INRS, 2018). Depuis l'interdiction de l'utilisation de l'amiante, les nombreux chantiers de désamiantage ont conduit à une accumulation de millions de tonnes de déchets amiantés au niveau mondial.

Actuellement, les matériaux contenant de l'amiante sont dans 99 % des cas enfouis, entrainant une utilisation non durable des terres afin d'entreposer des déchets demeurants toxiques. L'autre méthode existante, la vitrification par fusion plasma permet d'éliminer la structure fibreuse de l'amiante transformée, après chauffage à 1600 °C, en cofalit^{R}, matériaux inerte et valorisable sous forme de granulats en sous couche routière. La toxicité est neutralisée, mais ce procédé reste actuellement trop coûteux et trop énergivore pour être largement utilisé. Il n'existe par ailleurs qu'une seule usine en Europe (Inertam) située dans le sud-ouest de la France. Il n'existe donc actuellement aucune alternative écologique à l'enfouissement des déchets couramment utilisé qui permettrait d'éliminer la toxicité du produit.

Des traitements physico-chimiques ont été développés pour traiter les déchets amiantés et plusieurs articles sur ces procédés ont déjà été publiées (Spasiano and Pirozzi, 2017). Au début du 21ème siècle, des études de bioremédiation ont mis en évidence l'utilisation de champignons comme acteurs de la détoxification de l'amiante par leur capacité à extraire le fer présent dans les fibres. Au cours des 20 dernières années, d'autres organismes tels que les lichens et les bactéries ont été

identifiés comme impliqués dans l'altération de l'amiante et de nouveaux processus à médiation biologique ont été décrits (David and Geoffroy, 2020; Favero-Longo *et al.*, 2009).

La revue présente un état de l'art des caractéristiques et propriétés des amiantes, de l'utilisation et de la législation des produits à base d'amiante de 5000 avant JC au 20ème siècle. Après un rappel des mécanismes d'altération biologique des minéraux par les plantes, les lichens, les champignons et les bactéries, la revue se focalise sur la dégradation biologique des amiantes natives et des déchets amiantés.

À notre connaissance, cette revue résume, pour la première fois, les différentes approches de bioremédiation qui pourraient conduire au développement d'une technologie durable pour la détoxification et la destruction complète des déchets amiantés.

2. Contribution des auteurs

Dans la revue constituant ce chapitre, j'ai participé à sa rédaction et à sa soumission avec le Pr. Valérie Geoffroy. Le Dr. Sébastien David, ancien doctorant du laboratoire ayant publié les premiers résultats sur la bioremédiation des déchets amiantés par les *Pseudomonas,* a également contribué à la rédaction de cette revue.

Journal of Hazardous Materials

The hazards of asbestos exposure How can biological processes help asbestos waste management?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Review
Keywords:	Asbestos-containing waste; bioremediation; regulation; asbestos description; microorganisms
Corresponding Author:	Valerie A Geoffroy, PhD Universite de Strasbourg Illkirch, FRANCE
First Author:	Marion Lemare
Order of Authors:	Marion Lemare
	Sébastien R. David
	Valerie A Geoffroy, PhD
Abstract:	Asbestos is a soil mineral divided into two families, serpentines asbestos (chrysotile) and amphiboles asbestos (amosite, crocidolite, actinolite, trémolite and anthophyllite). Due to the exceptional physico-chemical characteristics of these silicate fibers, asbestos has been widely used all over the world in many industrial exploitations. Although asbestos has been recognized as toxic, partially due to the presence of iron, it was continuously exploited until successive bans with the last one in 2018 for Canada. Asbestos-containing wastes (ACW) represent a global concern considering the accumulation of millions of tons of products encountered in building, boat and road applications. ACW are typically stored in landfill resulting in unsustainable land use and maintaining the toxicity of waste. To detoxify asbestos fibers and develop an eco-friendly process, many studies have described physical, hydrothermal, mechanical or chemical treatments, which do not completely satisfy the previous environmental and economical requirements. Considering the ability of some organisms to dissolve iron from minerals for their growth requirements, several biological approaches study the faculty of plants, lichens, fungi or bacteria to detoxify ACW. In this review, we will detail the mechanisms involved in asbestos bioweathering that could lead to the development of a sustainable bioremediation process.
Suggested Reviewers:	Stefania DAGHINO University of Turin stefania.daghino@unito.it The research field of Stefania Daghino is on asbestos and fungi weathering.
	Bin LIAN Prof, Chinese Academy of Sciences bin2368@vip.163.com Field research deals with microbe mineral interactions and specifically on the dissolution of asbestos by bacteria
	Shabori Bhattacharya Manipal University Jaipur shaboribhattacharya@gmail.com The research field is on bacteria mineral interaction and specifically

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

The hazards of asbestos exposure: How can biological processes help asbestos waste management?

*Marion Lemare, Sébastien R. David, and Valérie A. Geoffroy**

Université de Strasbourg, CNRS-UMR7242, BSC, ESBS, 300 Bld Sébastien Brant, 67413 Illkirch, Strasbourg, France

*corresponding author

Abstract

Asbestos is a soil mineral divided into two families, serpentines asbestos (chrysotile) and amphiboles asbestos (amosite, crocidolite, actinolite, trémolite and anthophyllite). Due to the exceptional physico-chemical characteristics of these silicate fibers, asbestos has been widely used all over the world in many industrial exploitations. Although asbestos has been recognized as toxic, partially due to the presence of iron, it was continuously exploited until successive bans with the last one in 2018 for Canada. Asbestos-containing wastes (ACW) represent a global concern considering the accumulation of millions of tons of products encountered in building, boat and road applications. ACW are typically stored in landfill resulting in unsustainable land use and maintaining the toxicity of waste. To detoxify asbestos fibers and develop an eco-friendly process, many studies have described physical, hydrothermal, mechanical or chemical treatments, which do not completely satisfy the previous environmental and economical requirements. Considering the ability of some organisms to dissolve iron from minerals for their growth requirements, several biological approaches study the faculty of plants, lichens, fungi or bacteria to detoxify ACW. In this review, we will detail the mechanisms involved in asbestos bioweathering that could lead to the development of a sustainable bioremediation process.

Key Words

Asbestos-containing waste, bioremediation, regulation, asbestos description, microorganisms

1. Introduction

Asbestos is a generic commercial designation referring to a family of naturally occurring minerals for which the use has been known since the Neolithic age. Fibers and asbestos-ceramics were manufactured in Karelia, Finland, and Fennoscandia around 5,000 BC (Røe and Stella, 2015). The first references can be traced to several ancient philosophers and several names were given to define asbestos. Aristotle's student, Theophrastus, probably deserves credit for the original citation of "On Stones" to design asbestos rock around 300 B.C. The Greek physician Dioscorides (ca. 40–90 AD) described the fire resistance of the mineral and referred to it as "*amiantus*", meaning "undefiled". Easy-to-clean tablecloths, as well as many other fire-resistant items, were mentioned in the natural history book of Pliny the Elder (23–79 AD), who referred to it as "*asbestinon*", meaning "unquenchable" (Alleman and Mossman, 1997). Health problems related to asbestos were already described by the Greek geographer Strabo (63/64 BC–ca.24 AD) and Pliny the Elder, who both noted pulmonary damage in Roman slaves who used asbestos for weaving cloth (Dilek, 2003). The emperor Charlemagne intrigued his distinguished guest by throwing tablecloths into the fire to clean them, as they resisted burning due to the asbestos content, and Marco Polo referred to it during his oriental Siberia trip, suggesting that asbestos was mined and also used by other cultures (1254–1324 AD). Canadian asbestos was displayed in 1862 in the international exhibition of London without further interest until the 1880s, when the Quebec central railroad recognized its properties and the Johnson company become the pioneer producer of Canadian asbestos. This "magic mineral" was particularly used to fireproof non-conducting coverings for pipes and all hot surfaces by the English and German navies and industries. The first probable case of asbestos-related death due to pulmonary fibrosis was diagnosed in 1899 by Dr. Henri Montague Murray in London for an asbestos textile worker (Franck, 2006).

From 1900 to the second world war, asbestos production remained relatively low, with the main producer being Canada, which has many mines, particularly of chrysotile. The use of asbestos increased tremendously after 1945 to reach a peak of production worldwide from 1975 to 1980 (Virta, 2002), resulting in the widespread exposition of workers to asbestos dust, of which the inhalation caused the now well-known associated respiratory diseases. In 1945, the French government recognized the pulmonary fibrosis related to asbestos dust inhalation as an occupational disease. It was not until several years later that an epidemiological study linked mesothelioma to asbestos exposure for South African mine workers and people living in the crocidolite mine area (Wagner et al., 1960). An epidemiological study in Britain extended these

conclusions to asbestos factory workers and showed that construction workers should also be included as mesothelioma victims (Peto et al., 1995). A number of etiological studies from other countries (USA, Europe, Australia, Japan) later confirmed the association of asbestos inhalation with mesothelioma (Røe and Stella, 2015). Three decades later (1976), mesothelioma and lung cancer were finally recognized in France and added to the list of occupational diseases. In 1977, all types of asbestos were classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as class I carcinogens (International Agency for Research on Cancer, 2012). In particular, Iceland (1983), Norway (1984), Denmark (1986), Sweden (1986), Austria (1990), the Netherlands (1991), Finland (1992), Italy (1992), and Germany (1993) were the first countries to restrict and ban the use of asbestos (Kazan-Allen, 2003; Spasiano and Pirozzi, 2017), followed by France (1997) (Kazan-Allen, 2003), Australia (2003) (Jamrozik et al., 2011), and Canada (2018) (Ruff, 2017). In 1999, a directive of the European Union mandated that all member states ban asbestos from 2005. On the contrary, two no-ban countries, Kazakhstan and the Russian Federation, have both used and mined asbestos in recent years. The Directive does not require existing asbestos in buildings to be removed. The risk to health from asbestos in buildings is generally very low if it remains undisturbed (Comission directive, 1999). Asbestos toxicity is related to the inhalation of fibers and their ability to translocate from the lungs to other body compartments. Inhaled fibers can pass the alveolar barrier to the lung interstitium and reach the pleura or be eliminated by pulmonary lymph flow, from where they can reach the bloodstream and be subsequently distributed throughout the body (Miserocchi et al., 2008). Asbestos exposure can induce various benign or malignant diseases (Figure 1).

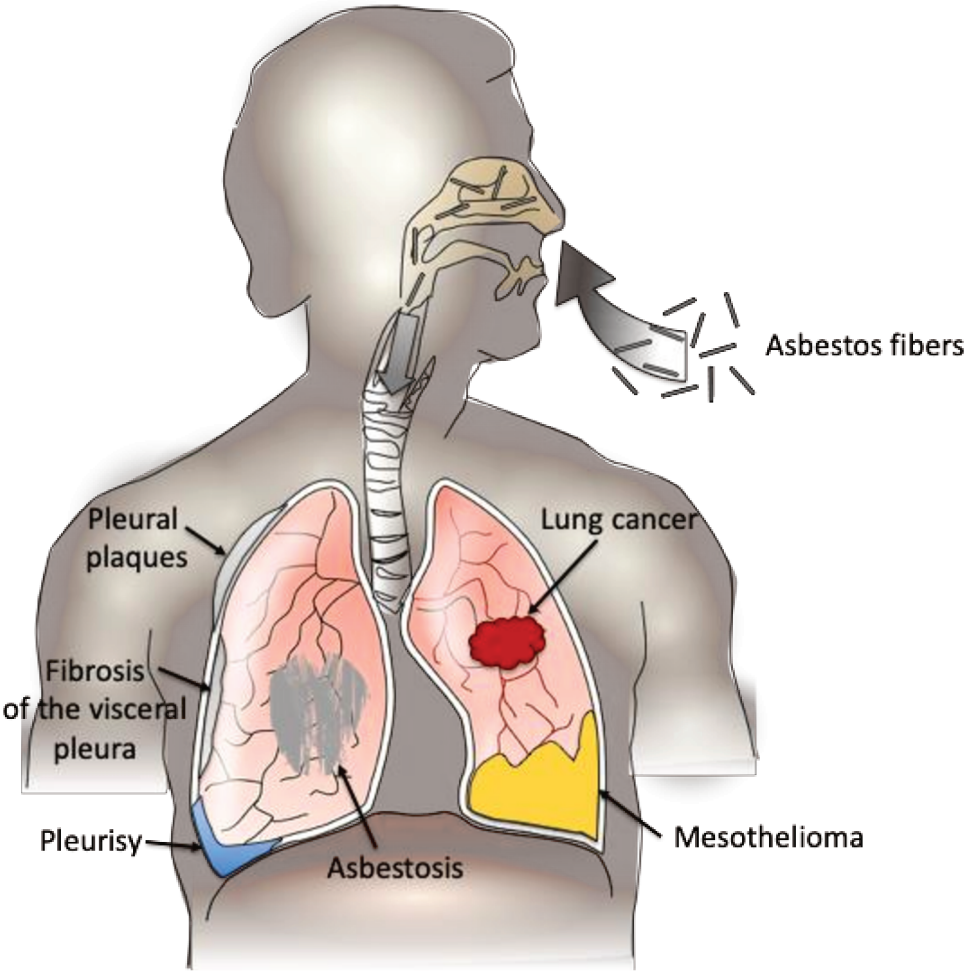


Figure 1. Lungs showing asbestos-related diseases, including lung cancer and mesothelioma among malignant diseases and pleural plaques, fibrosis of the visceral pleura, pleurisy, and asbestosis among benign diseases.

Among noncancerous pathologies, asbestos can affect various parts of the respiratory system:

- Pleural plaques, consisting of fibrosis of the parietal pleura, which are the most common manifestation and usually appear 15 or more years after initial exposure to asbestos fibers.
- Asbestosis, consisting of fibrosis of the lung parenchyma, which occurs 10 to 20 years after exposure.
- Pleurisy, a condition in which excess fluid builds up in the pleural space, which can appear after 30 years or earlier.
- Fibrosis of the visceral pleura, which has the same latency period as pleurisy and may be a consequence of this disease.

In addition to benign diseases, asbestos exposure has been found to be carcinogenic, with two main cancers described. Their occurrence can vary from 20 years after exposure for bronchopulmonary cancer to 50 years after exposure for malignant mesothelioma. A dose-response pattern of asbestos exposure for mesothelioma and lung cancer is well known. More recently, a link between exposure to asbestos fibers and the occurrence of larynx, ovary, and digestive system cancers has also been shown (Røe and Stella, 2015).

Three mechanisms for asbestos-induced carcinogenesis have been proposed: i) the chromosome tangling hypothesis, based on chromosome damage caused by asbestos fibers during cell division, ii) preferential adsorption of specific proteins and carcinogenic chemicals by asbestos fibers, and iii) the oxidative stress induced by free radical production due to asbestos absorption by phagocytic cells (Toyokuni et al., 2011). Iron generates hydroxyl radicals via the Fenton reaction, causing DNA damage. Carcinogenesis is a relatively complex process, but it is recognized that catalytic iron plays a significant role. Together with oxidative stress, the bio-persistence of asbestos fibers can influence the evolution of the disease. Indeed, physical and chemical parameters play an important role in asbestos-induced cancer. Fiber size and durability have been cited as examples of physical parameters, while the composition of asbestos fibers is linked to the presence of iron (Valko et al., 2016).

2. Structure and properties of asbestos fibers

Asbestos consists of fibrous silicate minerals organized into two mineralogic groups, serpentine and amphibole. The unique asbestiform variety of the serpentine group is chrysotile, whereas the amphibole mineral group includes five asbestiform members: crocidolite, amosite, anthophyllite, tremolite, and actinolite.

1. Geological origins

Asbestiform minerals can be found in many places in the world in several types of bedrock: i) mafic and ultramafic rocks, ii) dolostone and dolomitic limestone, iii) banded iron formations, and iv) alkalic intrusions and carbonatites (Van Gosen, 2007; Virta, 2002). In addition to bedrock composition, various processes are necessary for asbestos formation. Indeed, asbestiform and non-asbestiform minerals have the same chemical composition, but originate from different crystallization processes (Table 1). Two major geological phenomena drive the formation of asbestiform rocks depending on the physicochemical parameters; i) metamorphism, which is a process that changes preexisting rocks into new forms because of increases in temperature, pressure, and chemically active fluids, and metasomatism, which is a

metamorphism process involving modification of the chemical composition, and ii) magmatic hydrothermal systems, leading to tectonic stress and facilitating hydrothermal fluid circulation (Van Gosen, 2007).

2. Crystalline structure

As for all silicate minerals, asbestos consists of silicon (Si) and oxygen (O) organized in silicate tetrahedra (SiO_4), the basic building blocks of asbestos fibers. The number of tetrahedra, fiber morphology, and elements combined with the silicate tetrahedra determine the type of asbestos (Table 1). In chrysotile, the tetrahedral silicates are arranged in sheets, whereas they occur as double chains in the amphibole group (Virta, 2002). The color of the fibers varies depending on the type of asbestos and the presence of metallic elements. In general, asbestos containing iron has a green to blue color, depending on the amount of iron present. The most colorful type of asbestos is the lavender blue crocidolite, which contains iron and sodium. Pure chrysotile and tremolite tend to be white, together with actinolite and anthophyllite, and are grouped together as "white asbestos". When iron is substituted by magnesium in tremolite, a light green color can be observed (Table 1).

Table 1 : Characteristics of asbestos species and their resulting classification (adapted from International Agency for Research on Cancer, 2012)

Group of minerals	Asbestos name	Non-asbestisform mineral analogue	Theoretical chemical composition	Color	Silicate structure
Serpentine	Chrysotile	Lizardite Antogorite	$Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$	White to greyish green	Curled sheet
Amphiboles	Crocidolite	Riebeckite	$Na_2(Fe^{3+})_2(Fe^{2+})_3Si_8O_{22}(OH)_2$	Gray-blue to leek blue	Double chain
	Amosite	Grunerite	$(Fe, Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	Brown	Double chain
	Anthophyllite	Anthophyllite	$(Mg, Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	White to greyish green	Double chain
	Actinolite	Actinolite	$Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$	Green	Double chain
	Tremolite	Tremolite	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$	White to pale green	Double chain

1. Chrysotile

The composition of chrysotile is a hydrated magnesium silicate with the theoretical composition $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ (Table 1). The crystalline features of chrysotile consist of inner tetrahedral silicate layers and outer octahedral magnesium hydroxide layers (brucite). The silicate layer is covalently bound to the brucite layer by oxygen atoms, in which two of every

three hydroxyls from the magnesium hydroxide octahedra are replaced by apical oxygens of the silica tetrahedra (Berstein et al., 2013). Mismatching of the O-O distances induces a layered structure wrapped around itself to form a tubular fiber structure. The concentric sheets, composed of approximately 12-20 layers, form a hollow cylinder with an average diameter of approximately 25 nm, called fibrils (Virta, 2002; Bernstein et al., 2013). These structures aggregate to form a flexible curved fibers of chrysotile with a total diameter estimated to be from 0.1 to 1 µm and a length ranging from millimeters to several centimeters (Figure 2) (Dériot and Godefroy, 2005; INRS, 2018; Virta, 2002).

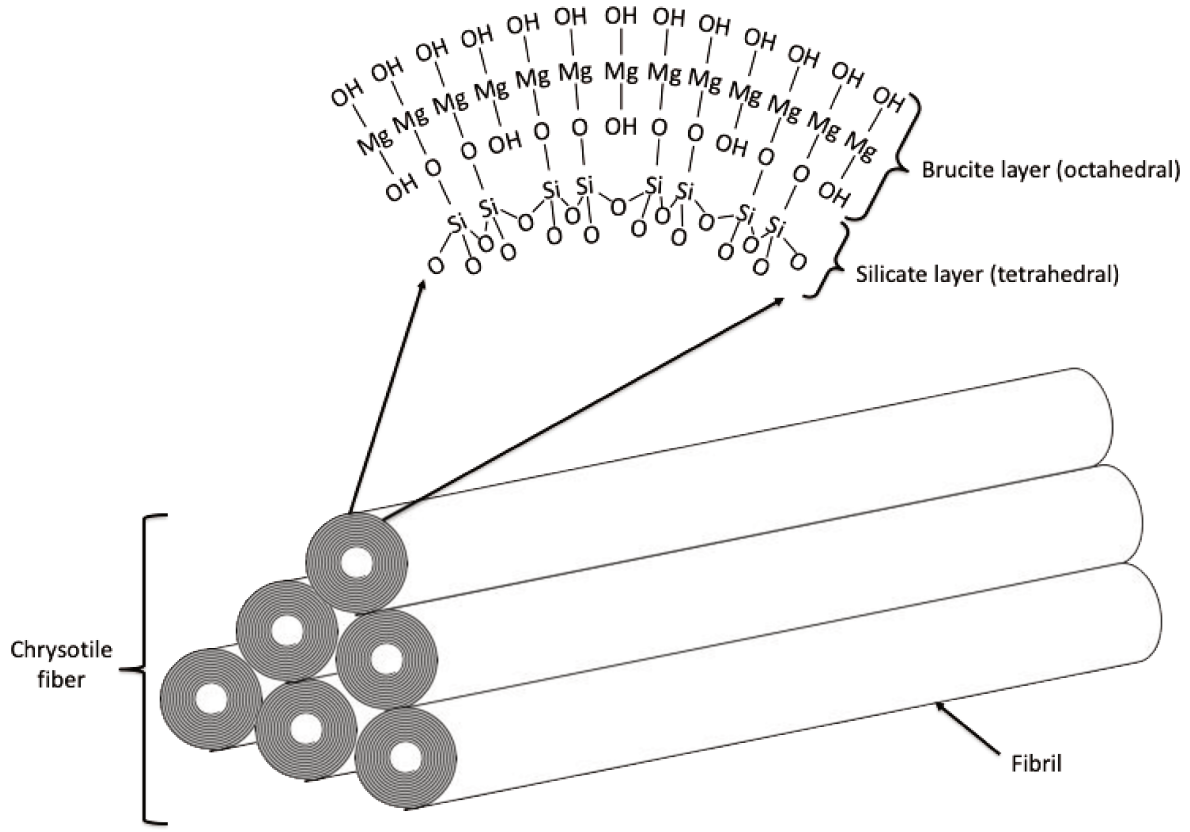


Figure 2. Crystalline structure of a chrysotile fiber composed of fibrils showing the internal silicate layer covered by the external brucite layer.

2. Amphibole

The common crystal structure of amphiboles consists of two simple chains of silicate tetrahedra that alternately share two or three oxygen atoms to produce a silicon to oxygen ratio of 4:11 and form a double chain that extends along the c crystallographic axis, the direction of crystal elongation (Figure 3). The double silicate chains repeat at intervals of approximately 5.3 angstroms, corresponding to the c axis of the unit cell (Simmons, 2016).

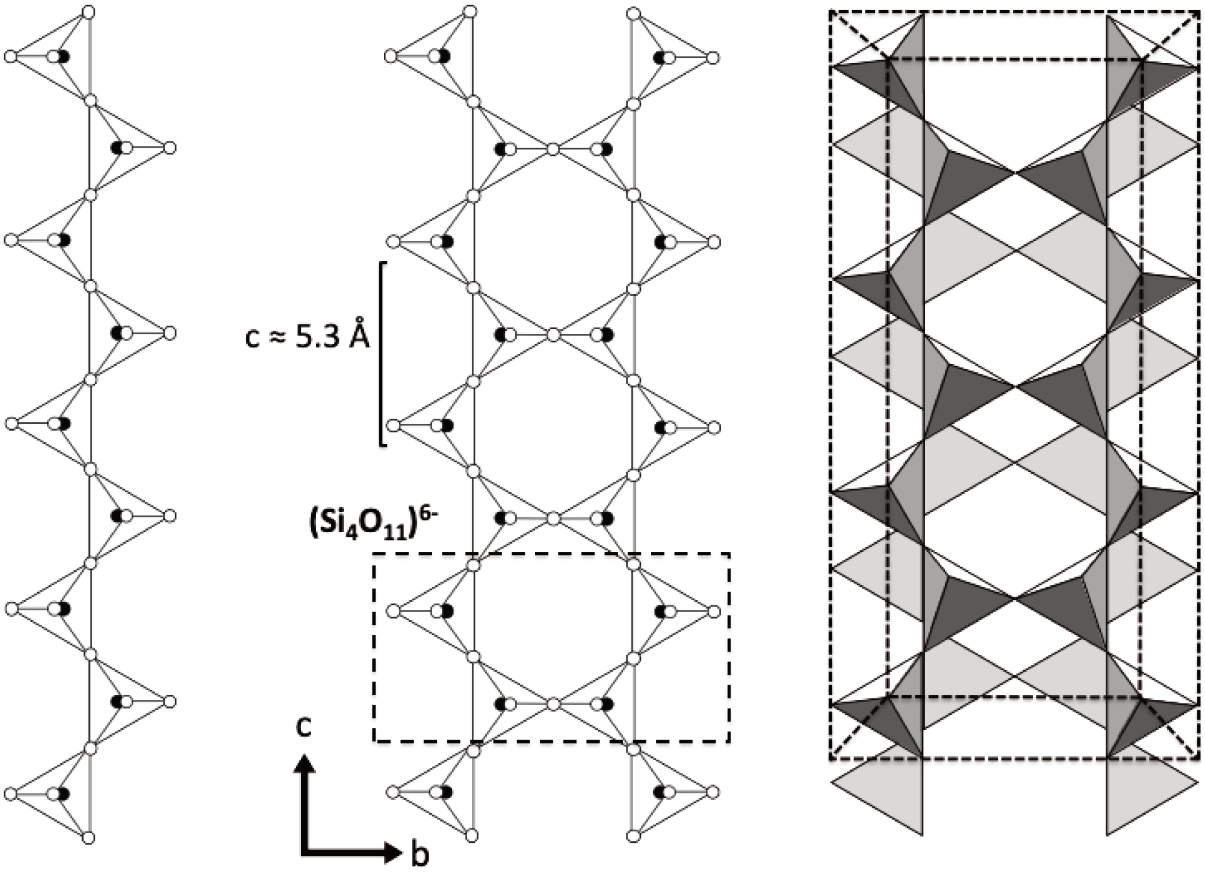


Figure 3. Crystalline structure of A) a simple chain of tetrahedral silicate composed of a silicon (black dots) to oxygen (white dots) ratio of 4:11, B) an amphibole fiber formed by a double chain of tetrahedral silicate, and C), a 3D-representation of an amphibole fiber (adapted from Simmons, 2016).

Cations and hydroxyl ions, which form octahedral strips, bind the double chains laterally and separate them from the other double chains. The amphibole structure contains cationic sites that can be labeled A, M4, M3, M2, and M1. The A site is usually empty for the asbestiform habit but for the other amphiboles, this site can contain large alkali ions, such as sodium or potassium and is bound to 10 to 12 oxygen and hydroxyl ions. The octahedral sites M1, M2, and M3 can contain Mg^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Ti^{4+}, Zn^{2+}, or Cr^{3+}, whereas the M4 site can accommodate the cations Na^{+}, Zn^{2+}, Li^{+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, or Mg^{2+}. M1 and M3 bind to four oxygen atoms and two hydroxyl anions. M2 is coordinated by six oxygen atoms and M4 by six to eight oxygen atoms. The amphibole unit cell contains seven octahedral cations with two each of the M1, M2, and M4 sites and one M3 site (Figure 4) (Simmons, 2016).

The structure of the amphibole viewed down through the c crystallographic axis (Figure 4) shows the tetrahedral-octahedral-tetrahedral strips, also called I beams. The characteristic 56°

and 124° amphibole cleavage angles are produced level with the structure ruptures around the stronger I beams (Simmons, 2016).

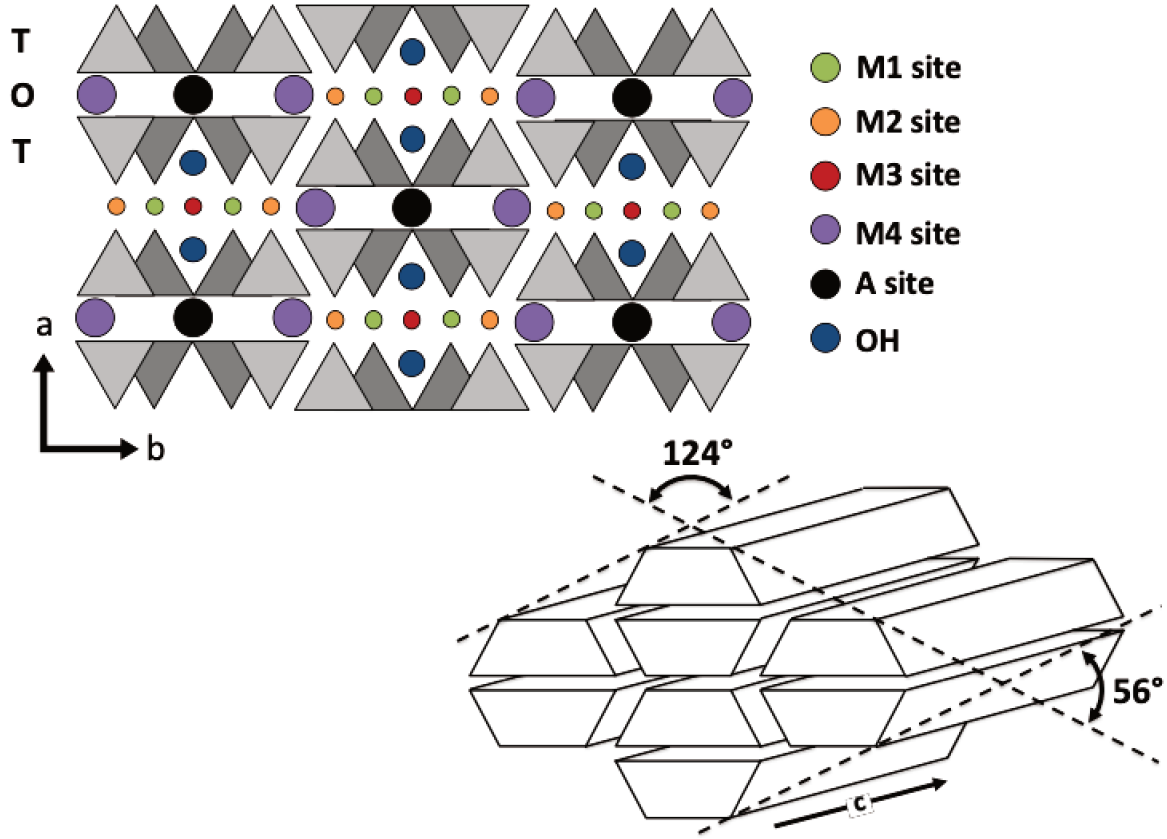


Figure 4. Representation of an amphibole fiber showing A) cationic sites (M1, M2, M3, M4, and A) and B) the amphibole cleavage angle (adapted from Simmons, 2016).

Amphibole fibers are straight and often appear individually rather than in fiber bundles, in contrast to chrysotile fibers. The length of the fibers is in the range of several millimeters and the diameter varies depending on the amphibole type and mineral deposit. For example, the diameter ranges from 0.06 to 1.2 µm for crocidolite fibers and from 0.15 to 1.5 µm for amosite fibers (Douguet et al., 1997).

3. Asbestos properties

1. Chemical composition

Asbestos minerals have an idealized chemical composition, as shown in Table 1. In natural samples, the composition varies according to major and trace elements encountered in the deposit. Indeed, chrysotile has an idealized chemical formula of $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$, but element substitutions can occur within the fibers, such as with magnesium and silicon. In the brucite

layer, magnesium can be substituted by Fe^{2+}, Mn^{2+}, or Ni^{2+}, whereas in the tetrahedral layer, silicon can be replaced by Cr^{3+}, Al^{3+} or Fe^{3+}. Aside from substitutions, mineral contamination can occur together with chrysotile formation during the geothermal processes, with the co-deposition of various minerals, such as brucite, magnetite, calcite, dolomite, chlorite, and talc. In addition, iron-containing minerals can also be present in chrysotile, for example, pyroaurite, brugnatellite, and pyroxenes (Virta, 2002). On the other hand, certain amphiboles, such as tremolite, although having essentially no industrial application, can be found as contaminants. The chemical composition of amphiboles can vary widely depending on the elements found in the cationic sites, which can be progressively replaced with another. Therefore, amphibole fibers can be viewed as a series of minerals. For example, tremolite forms a series with actinolite, as magnesium is partially replaced by iron in tremolite to yield actinolite (Virta, 2002). As previously described in the introduction, iron content is a parameter involved in the toxicity of asbestos. Fibers of the amphibole group containing more iron are considered to be more carcinogenic than those of the serpentine group.

2. Physical properties

Asbestos has remarkable physical properties, including heat, mechanical, and electric resistance. However, the behavior of asbestos varies according to the mineralogic group, serpentine or amphibole. Concerning heat resistance, asbestos fibers consist of hydrated silicates and their thermal behavior is related to dehydroxylation reactions. Indeed, the chrysotile crystalline structure is stable up to approximately 550°C, beyond which the dehydroxylation of the brucite layer begins and is completed near 750°C. The thermal behavior of amphiboles is similar to that observed for chrysotile, but the temperatures are different. Dehydroxylation begins between 400 and 600°C, depending on the amphibole variety and is completed at about 1000°C (Douguet et al., 1997; Virta, 2002). The tensile strength of asbestos has been described, based on the strength of the Si-O-Si bonds in the silicate chain and the iron content. Indeed, iron-oxygen bonds in the fibers, in particular with Fe^{3+}, show high tensile strength. Thus, the mechanical resistance differs depending on the amphibole type, with an intermediate tensile strength for chrysotile. The typical tensile strength of asbestos fibers follows the order: crocidolite > chrysotile > amosite > anthophyllite > tremolite > actinolite (Virta, 2002). Other physical properties have also been described, such as low thermal, sound, and electrical conductivity (Lahondère et al., 2014; Ruffié and Margery, 2007; Virta, 2002). The high electrical resistivity of asbestos fibers is well known and has been widely used in

many industrial applications. Generally, chrysotile has lower resistivity than amphiboles, especially in humid environments, due to the availability of soluble ions (Virta, 2002).

3. Chemical properties

Aside from the well-known resistance properties of asbestos, fibers can be solubilized under various conditions of pH and temperature depending on their structure and chemical composition.

At neutral pH, the dissolution kinetics of chrysotile are very slow, whereas acidic conditions favor strong leaching of magnesium ions. Thus, a low pH leads to rapid dissolution of the brucite layer, resulting in magnesium release and a residual fiber structured by the tetrahedral silicates, together with a pH increase of the solution. Amphiboles show variable resistance to acids due to the sequestration of metallic cations in the silica layers, but it is still clearly superior to that of chrysotile (Douguet et al., 1997; INRS, 2018; Virta, 2002). The acid solubility of amphiboles range, in decreasing order, from the insoluble, anthophyllite, tremolite, crocidolite, and amosite to the slightly soluble, actinolite. In contrast to acidic environments, all types of asbestos show high resistance to strong alkalis, except at temperatures over 100°C (Virta, 2002). Under these conditions, amphiboles are particularly affected due to the double silicate chains, which are sensitive to high pH at high temperatures. The specific surface area also varies depending on the asbestos species. The specific surface areas reported for amphiboles are known to be lower than that of chrysotile, with values ranging from 3-15 m^2/g for crocidolite, as an example, to 30-50 m^2/g for chrysotile (Douguet et al., 1997).

3. Asbestos use and regulations

1. Main producers and consumers

From 1920 to the second world war, the production of asbestos remained relatively stable and the major producing country was Canada, with numerous asbestos mines, particularly with chrysotile deposits. After this period, asbestos production continually grew to reach a worldwide peak of production of 4.8 million tons in 1977 (Figure 5). During this period, 80% of all chrysotile was produced by Canada and Russia, whereas crocidolite and amosite originated from South Africa. During the 20th century, 174 million tons were produced. In 2018, the world production of asbestos was still high, at 1.15 million tons, with Russia (710 000 tons), Kazakhstan (205 000 tons), China (125 000 tons), and Brazil (110 000 tons) as the

main asbestos producers, as Canada stopped asbestos mining in 2011 (Douguet et al., 1997; Kenneth, 2018; Virta, 2002).

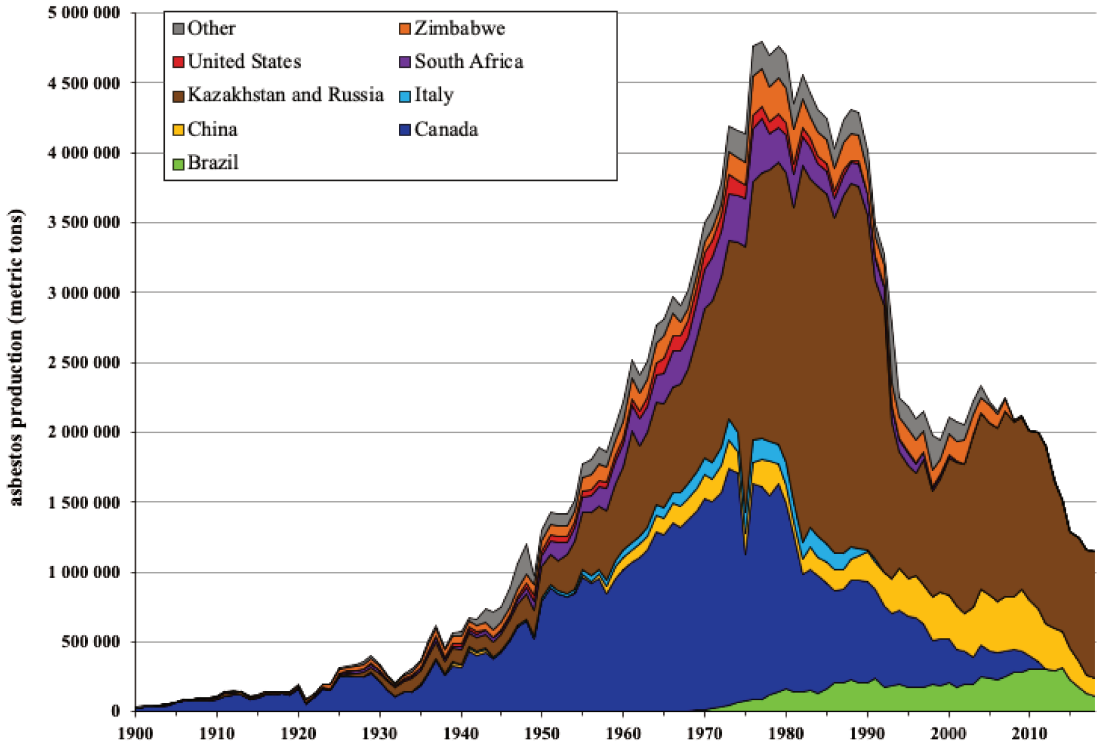


Figure 5. World asbestos production in metric tons from 1900 to 2018 (adapted from (Flanagan and Van Gosen, 2022; Virta, 2006)).

The world's asbestos consumption has changed drastically over the past century. Indeed, the use of asbestos significantly increased from the 1920s to the 1980s, especially in Europe, Asia, and the Middle East (Stayner et al., 2013). Following the ban of asbestos-containing products by many industrialized countries due to its carcinogenic properties, asbestos consumption decreased in the beginning of the 80's. In Europe, the use of asbestos is now almost non-existent, except in Russia. However, asbestos continues to be irreplaceable in many countries in Asia, the Middle East, and South America. Thus, 10 countries account for 90% of the world's asbestos consumption: China, Russia, India, Brazil, Thailand, Kazakhstan, Indonesia, Vietnam, Uzbekistan, and Turkmenistan, with 60% of the world's annual consumption for the first three alone (Allen et al., 2018).

2. Industrial use

Due to its particular physical properties, asbestos has been widely used in various fields for many years since the 20th century. It has a higher tensile strength than steel and shows thermal

and electrical resistance. Such resistance makes it a fibrous flame-retardant material and chemically neutral thermal and electrical insulation. In addition, asbestos can be mixed with various materials or matrices (i.e. cement, plastic, gypsum, or resins) to obtain materials with multiple properties (Barbalace, 2004). Chrysotile, the only asbestiform species of serpentines, is considered to be less dangerous than amosite and crocidolite and accounts for 95% of the industrial use of asbestos. The remaining 5% is represented by two amphibole species, amosite and crocidolite, which are considered to be extremely dangerous (INRS, 2018; Lahondère et al., 2014). The other species of asbestos, anthophyllite, tremolite, and actinolite, have been rarely used. Ninety percent of asbestos production is devoted to the construction and public works sector, with the remainder divided between the rail, air, and maritime sectors (Gautier et al., 2017). Asbestos can have different applications depending on its characteristics. For example, the longest fibers were used in textile production or for electrical insulation, the average length fibers for asbestos-containing cement pipes and sheets or for friction materials, and the shortest to reinforce plastics, floors, and roofs. At the peak of asbestos use, there were over 3,000 products containing asbestos (Bordebeure, 2017). The main asbestos-based products are:

- Cement asbestos: representing approximately 80% of asbestos production, mainly used for building roofs or pipes (INRS, 2018; Lahondère et al., 2014).
- Raw asbestos: used for thermal or phonic insulation using the flocking process (Dériot and Godefroy, 2005)
- Plastic-based asbestos: used in floor tiles and electrical cables (Dériot and Godefroy, 2005; INRS, 2018)
- Textiles: used in fire protection clothing, ropes, braids, and sealing joints (Dériot and Godefroy, 2005; INRS, 2018; Lahondère et al., 2014)
- Friction materials: used in mechanical components, such as brakes, clutches, elevators, and motors (INRS, 2018; Lahondère et al., 2014)
- Paper, cardboard, felt: for thermal or electrical insulation (Dériot and Godefroy, 2005; INRS, 2018; Lahondère et al., 2014)
- Various additives: used in paints, glues, or bitumen (Dériot and Godefroy, 2005; Lahondère et al., 2014)

3. Regulations

Although asbestos had been commonly used since the 1860s, its dangerousness was only suspected in 1906 (Dériot and Godefroy, 2005). Thus, by 1997, around 10 countries had already

banned the use of all asbestos species. Today, more than 60 countries have banned asbestos and 100 no longer use it. For example, Europe (excluding Russia), Africa, and Oceania no longer use asbestos, but certain American countries, such as Brazil and Cuba, are still dependent on it and there is no law prohibiting the use of asbestos in the United States. Finally, the asbestos trade only persists in about 10 countries in the world, particularly in South and East Asia (China, India, Thailand, etc.). Currently, asbestos regulations are specific for each country. Public health regulations have been created to define a value for the limit of occupational exposure to protect workers and provide a legal framework for the dangers of asbestos. Although this value varies between countries, it leads to obligatory asbestos removal when it is exceeded (INRS, 2018). The occupational exposure limits for several countries are presented in Table 2.

Table 2 : Asbestos fibers occupational exposure limits depending on local legislation (adapted from INRS, 2018)

Country	Occupational exposure limit value
European Union	0.1 fibers/cm^3 in 8 hours (= 100 fibers/L)
France, Germany, Netherlands, Switzerland	10 fibers/L in 8 hours
United States of America	0.1 fibers/cm^3 in 8 hours (= 100 fibers/L)
Japan	0.15 fibers/cm^3 in 8 hours (= 150 fibers/L)
Quebec	1 fibers/cm^3 in 8 hours (= 1000 fibers/L)

The asbestos fiber-detection method is different for each country. For example, France uses analytical transmission electron microscopy (ATEM), whereas Germany uses analytical scanning electron microscopy (ASEM). In addition, the analyzed environment also influences the method used:

- The identification of fibers in a material is carried out using polarized light optical microscopy (PLOM) and then by ATEM if no result is obtained by PLOM.
- For the analysis of fibers present in the atmosphere, a pump sucks them from the air and deposits them onto a filtering membrane, which is then analyzed by ATEM.

Determination of the concentration of asbestos fibers in the environment by the previous method is based solely on fibers with a length > 5 µM, a diameter < 3 µM, and a length/diameter ratio > 3. Thus, shorter fibers, which can be just as dangerous as the longer ones, are never analyzed but a recent report recommends setting a threshold of 50 short

fibers/L of air (INRS, 2018). However, there is currently no standard for the maximum quantity of fibers allowed on surfaces.

4. Tons of waste to treat

The ban of the use of asbestos has led to numerous asbestos removal sites, leading to the accumulation of millions of tons of asbestos waste. Such waste is highly diverse and comes mainly from the fields of construction and public works. The three main types of waste, in terms of tonnage, from the construction sector are:

- Cement asbestos, representing 24 million tons (Bordebeure, 2017; Gautier et al., 2017), composed of 10% asbestos chrysotile fibers (sometimes amphiboles can be found), trapped in 90% of a cement matrix
- Vinyl tiles, representing 390,000 tons (Gautier et al., 2017), containing a maximum of 15% asbestos chrysotile fibers, trapped in a plastic matrix
- Flocking asbestos and thermal insulation, which are the least represented, with an estimated quantity of approximately 200,000 tons (Gautier et al., 2017). Flocking asbestos is divided into two categories, thick, with a low density, and thin, with a higher density, each which contains a different percentage of asbestos, 50 to 90% and 5 to 30%, respectively.

This diversity, in terms of the matrix and percentage and type of fibers used, complicates the treatment of asbestos waste.

4. Developed treatments and their cost

1. Current treatments

Currently, only two methods are used to manage asbestos waste, landfills and vitrification (Bordebeure, 2017; Damien, 2016). The most common method consists of storage in specialized landfills, due to its lower cost, which accounts for 99% of asbestos waste (Spasiano and Pirozzi, 2017). Such waste is stored in two different locations depending on its integrity. When asbestos is bound, that is, it retains its integrity, the waste can be stored in specific non-hazardous storage lockers at a cost of 100 to 150 € per ton. Otherwise, waste is vitrified or stored in more costly facilities (450 to 700 € per ton) dedicated to hazardous waste. Plasma fusion vitrification consists of heating asbestos to very high temperatures (1200-1600°C) using a plasma torch to fuse the waste into stable silicate glass. This method, although very expensive (1000-2500 € per ton) and costly in terms of energy, has many advantages, such as reducing

394 the volume of waste or the possible recovery of cofalit®, the resulting inert material (Spasiano
395 and Pirozzi, 2017). However, only 1% of asbestos waste is destroyed by such treatment.

396 2. Alternative treatments in development

397 Because current treatment (landfills and vitrification) does not neutralize waste or is too
398 expensive, many alternative treatments are being developed. The first treatments under
399 development are solidification and stabilization for unbound fibers. Solidification traps asbestos
400 fibers in a matrix, reducing their release, the exposed surface, and the porosity of the waste.
401 Stabilization, similar to solidification, uses adjuvants to reduce fiber mobility. These processes
402 are simple and limit the toxicity associated with the inhalation of fibers, but the asbestos remains
403 toxic and the final product is not recyclable (Paolini et al., 2019; Spasiano and Pirozzi, 2017).
404 These processes could therefore be used as a pretreatment before adding the waste to a landfill
405 or, as a precaution, injected directly into buildings to avoid removing undamaged asbestos-
406 containing material. However, this method is not sustainable because asbestos remains in the
407 buildings and regular inspections of the buildings are required to detect any deterioration of the
408 encapsulation. A cheaper strategy is thermal treatment, as asbestos fibers are known to become
409 unstable at high temperatures. The destructuring of fibers, linked to the modification of the
410 crystalline structure, can be separated into three main steps: evaporation of adsorbed water,
411 removal of structural OH groups present in the crystalline structure, and crystallization of
412 amorphous materials and the growth of new crystalline structures (Paolini et al., 2019).
413 Chrysotile loses its OH groups between 500 and 600°C and becomes forsterite, which
414 crystallizes at 820°C. For amphiboles, the crystallization of tremolite to diopside and enstatite
415 occurs at 1050°C (Spasiano and Pirozzi, 2017). This process is sufficient for pure asbestos but
416 may be different for asbestos waste due to the nature of the matrix, especially for fiber cement,
417 which requires a temperature of approximately 1200°C. Additional treatments are being
418 developed to reduce the required temperature and time. For example, hydrothermal treatment
419 can help the conversion of chrysotile to forsterite, with a temperature between 500 and 700°C
420 and a pressure between 1.75 and 7.40 MPa. In addition, microwaves act directly on the structure
421 of the fibers and allow a rapid and uniform increase in temperature, unlike a plasma torch
422 (Spasiano and Pirozzi, 2017). Although these treatments are less costly than current treatments,
423 they consume a considerable amount of energy and release toxic gas loaded with asbestos fibers
424 that still need to be treated (Paolini et al., 2019; Spasiano and Pirozzi, 2017). Another solution
425 is the use of mechanical forces, such as grinding, to destroy the molecular bonds and destabilize
426 the crystalline structure of asbestos fibers. This strategy has been proven for raw asbestos and

fiber cement and leads to a non-toxic amorphous material that can be recycled (Spasiano and Pirozzi, 2017). Finally, the use of acidic treatments dissolves metals from the crystalline structure of fibers. For example, magnesium, especially from chrysotile, can be dissolved using an acid solution, with faster dissolution at lower pH (Spasiano and Pirozzi, 2017). The dissolution of amphiboles is more difficult because of the protective outer layer of silica (INRS, 2018). Several acid attacks have been described for raw asbestos, *i.e.*, fluorosulfuric acid, which is dissolved in water in sulfuric acid, which attacks magnesium and brucite, and hydrofluoric acid, which attacks the silicate layer. As this acid is expensive and toxic, other more harmless acids have been tested, such as organic (oxic, acetic, and formic acid) or inorganic acids (sulphuric, nitric, and hydrochloric acid). These treatments can be combined with the previously cited mechanical treatments to improve alteration of the asbestos. For example, the combined use of oxalic acid and ultrasound can deform the brucite layer of chrysotile (Paolini et al., 2019; Spasiano and Pirozzi, 2017). Moreover, when acidic dissolution is required for waste such as fiber cement, more acid is needed because the cement may interact with it (Paolini et al., 2019; Spasiano and Pirozzi, 2017). A process using sulfuric acid at 100°C, which transformed asbestos cement into a harmless final product, has been described. However, because silica is acid-resistant, a strong base treatment (i.e. pressure-heated caustic soda) is required to hydrolyze the silico-oxygen bonds (Paolini et al., 2019). Recently, a process using nitric acid to attack chrysotile and caustic soda in hydrothermal conditions to dissolve amphiboles has been proposed. This process makes it possible to reuse the degradation products by ion precipitation and the synthesis of zeolite from silica (Talbi et al., 2019).

5. Biological alteration of minerals and asbestos waste

1. Mechanism of biological weathering of minerals

Microorganisms are found in natural environments. Thus, there is abundant literature about the mechanisms involved in microbe-mineral interactions in soil (Figure 6). Concerning the role of microorganisms in bioweathering, physical interactions and biochemical processes that include oxidation-reduction reactions and inorganic acid or organic compounds, such as siderophores or organic acids, have been described. Although there is evidence of mineral dissolution by microorganisms, the impact of directly attached or unattached microorganisms on microbial bioweathering is still not completely understood. Attachment via extrapolymeric substances creates a microenvironment that influences the reactivity, porosity, and permeability of the mineral surface (Ahmed and Holmström, 2015). Greater dissolution of minerals by attached cells than unattached cells, which dilutes their chelating agents in the bulk environment, has

been shown, (Ahmed and Holmström, 2015; Fowle et al., n.d.; Roberts, 2004). Attachment depends both on the charge of the mineral surface and the functional groups on the cell wall of the microorganisms (Fein et al., 2005).

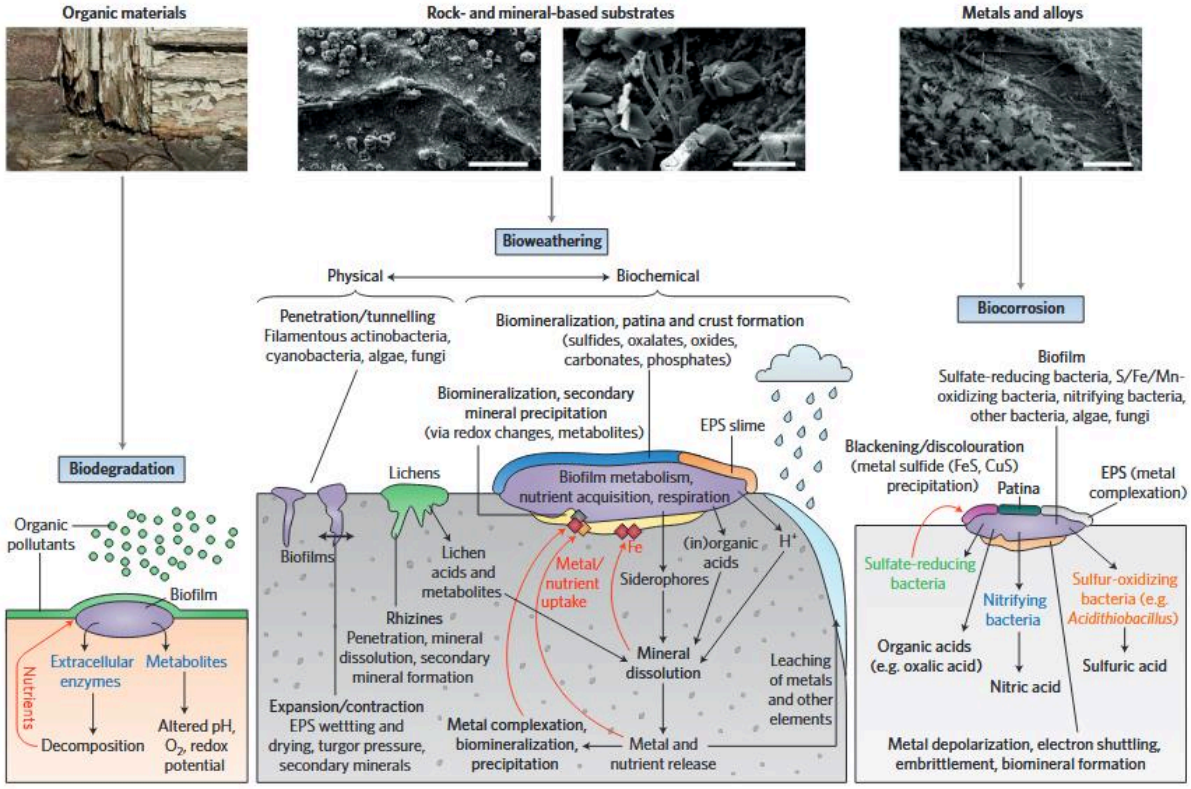


Figure 6. Some of the main influences and effects of microorganisms on components of the built environment and human-made structures. There can be many dynamic interactions between the multitude of physical and biochemical mechanisms associated with the biodeterioration of rock- and mineral-based substrates. Biophysical mechanisms include penetration and boring, secondary mineral formation, exopolymeric substance (EPS) or biomass swelling or contraction, removal of lichen thalli and adhering substratum by animals and the weather, cell turgor pressure, and physical and chemical effects caused by microbial alteration of habitat geochemistry (for example, changes in pH, redox potential, porosity, water retention, and aerobic/anaerobic transitions). Biochemical mechanisms include metabolite excretion (for example, H^+, CO_2); organic acids (for example, citric, oxalic); inorganic acids (for example, sulfuric, nitric, and carbonic acid); the production of metal-complexing EPS, solvents, and emulsifying agents; Fe(III)-coordinating siderophores; redox transformation by oxidation or reduction, bioaccumulation of solubilized metal and anionic species, biomineralization and formation of carbonates, phosphates, sulfides, oxides and oxalates; and alteration of habitat geochemistry by metabolism, affecting metal and anionic speciation and

mobility. Biodegradation of organic substances can be achieved by extracellular enzymatic attack, which affects many organic substrates, including wood, plastics, paint, leather, paper, glues, resins, waxes, and protective coatings. Biocorrosion of metals and alloys can include sulfate reduction and metal sulfide precipitation; acid effects; redox transformations; formation of localized corrosion cells; metal complexation by exopolymers, organic acids, and other metabolites; and secondary mineral formation. Micrograph scale bars, 50 µM (Adapted from Gadd, 2017).

1. Lichens

Lichens play an important role in mineral weathering through biogeophysical and geobiochemical processes and can therefore colonize almost any environment. Their ability to dissolve minerals, such as biotite, feldspars, or phyllosilicates, lead to the synthesis of biominerals that contribute to the nutrient cycle. Chemical alteration regroups both organic acid excretion, *e.g.* oxalic acid, citric acid, or lactic acid, and a phenolic compound called fumaric acid, previously called lichenic acid (Adamo and Violante, 2000). The main processes involved in mechanical alteration include penetration of the mineral by the fungal hyphae to locate and exploit new substrates (Adamo and Violante, 2000) and expansion / contraction of the thallus during the wet and dry phases. Lichens are also important in the biogeochemical cycle through the retention and repartition of nutritive elements and oligo-elements (Gadd, 2017).

2. Fungi

Apart from lichens, fungi are also able to develop the same mechanical mechanisms due to their filamentous morphology and potential extracellular mucilaginous substances that lead to biofilms on the mineral surface. Swelling and shrinking of this biofilm leads to alteration of the minerals (Warscheid and Braams, 2000). The growth of the fungi depends on thigmotropism and chemotropism. Consequently, biological alteration depends on the presence of minerals and their chemical composition (Gadd, 2007). Chemical dissolution can also be mediated by organic acids, *e.g.* oxalic, acetic, citric, and fumaric acid, of which the production can be influenced by the presence of toxic metals from dissolution of the mineral (Sterflinger, 2000). Fungal siderophores are efficient Fe(III) chelating agents for which the role has already been described in iron-oxide dissolution (Kraemer, 2004; Rosling et al., 2009). More than 150 structures are known, such as ferrichromes, coprogenes, fusiranines, and polycarboxylates (Winkelmann, 2007).

3. Bacteria

Biochemical weathering is considered to be the most important process in rock dissolution relative to mechanical weathering (Gadd, 2010, 2007). Minerals can contain metals, which can be used as electron donors or final electron acceptors during microbial respiration when oxygen is lacking. Iron and manganese oxides are important final electron acceptors in soil. As a consequence, the oxidation of organic (acetate) or inorganic (hydrogen) compounds and the reduction of metals can result in instability and dissolution of the mineral, influencing several biogeochemical cycles (carbon, nitrogen, and sulfur) (Gadd, 2017; Ng et al., 2016). Other metabolites, such as phenazines, produced by *Pseudomonas chlororaphis*, can enhance the dissolution of iron and manganese oxides (Hernandez et al., 2004). The second major mechanism involved in mineral bioweathering is acidification (Lazo et al., 2017). The release of nitric or sulfuric acid by bacteria solubilizes minerals, *e.g.* calcium carbonate (Warscheid and Braams, 2000). The greatest solubilization is due to the production of organic acids resulting from microbial metabolism, such as gluconic acid, which influences phosphate dissolution (Dong, 2010). Certain organic acids are metal-chelating agents, as well as siderophores, which are widely distributed in soil (Bossier et al., 1988). Siderophores are small molecules produced by plants, fungi, and many bacteria that are able to complex with certain metals, such as the iron, manganese, or zinc present in the mineral, contributing to its dissolution. Although not completely understood, the proposed mechanism is that the siderophore-iron complex is formed at the surface of the mineral and then transferred in solution for absorption by the microorganism or plant (Ahmed and Holmström, 2014). Siderophores may have a greater impact on the alteration of minerals in the soil than organic acids due to the formation of a more stable complex with iron (the affinity constant of the Fe(III)-siderophore complex is between $K = 10^{-30}$ and $K = 10^{-52}$ versus only $K = 10^{-12}$ with citric acid) (Ahmed and Holmström, 2014). Moreover, a synergistic effect has been described between complexes of the organic acids with the most available metals in the first phases of growth and those of siderophores with the least bioavailable metals within the minerals (Ahmed and Holmström, 2014). Like organic acids and siderophores, microbes can attach to mineral surfaces in both aqueous and soil environments to form a biofilm or subaerial biofilm, which is a microbial community that develops on solid mineral surfaces exposed to the atmosphere (Gorbushina, 2007; Jones and Bennett, 2014). Bacterial biofilms induce two weathering mechanisms. In the first, the growth of bacteria or desiccation/hydration cycles of the biofilm matrix cause the separation of mineral grains. In the second, dissolution of the rock particles occurs due to the

impact of the accumulation of respiratory CO_2, H^+, organic acids, EPS matrix, etc., as well as a redox attack on the mineral constituents (*e.g.*, iron, manganese and sulfides) (Gorbushina, 2007). However, unlike most bacterial biofilms, some, such as those produced by *Pseudomonas aeruginosa*, have been shown to slow the rate of mineral alteration by blocking cation liberation sites or forming surface precipitates (Aouad et al., 2006).

2. Bioweathering of asbestos fibers

1. Bioweathering of raw asbestos

The efficiency of low-molecular-weight chelators is well known for their ability to chelate iron from asbestos fibers. The weathering of iron from fibers appears to be a complex mechanism that depends on the iron content, surface area, crystalline structure, and nature of the chelator (Lund and Aust, 1990). Early studies focused on the involvement of organic acid dissolution of iron from asbestos, together with elements such as magnesium and silicon. The incubation of crocidolite in the presence of ascorbate, ADP, or citrate resulted in iron mobilization (Lund and Aust, 1990). Moreover, citrate also solubilizes iron from amosite and chrysotile. In addition to iron, citrate is also able to mobilize magnesium and silicon from crocidolite, determined by the evolution of Fe:Si and Mg:Si cation ratios (Werner et al., 1995). However, the study of Mohanty et al. showed that the concentration of organic acid may be an important factor for iron extraction. Indeed, an organic exudate of 100 µM oxalic, malonic, or citric acid had no effect in iron release from asbestos (Mohanty et al., 2018).

The treatment of chrysotile fibers with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* was shown to induce leaching of the brucite layer due to the production of metabolites that led to acidic conditions, mostly due to the presence of lactic acid (Stanik et al., 2006). Moreover, the use of milky whey without bacteria led to destructuring of the brucite layer of chrysotile, likely because of the presence of the same metabolites produced by the lactic bacteria during the fermentation process (Balducci, 2012). Green tea extract, which contains polyphenolic constituents such as catechins, has been shown to confer a protective effect against asbestos-induced injury related to their ability to scavenge superoxide anions and chelate iron (Kostyuk et al., 2000). As low-molecular-weight metabolites, siderophores are commonly secreted by fungi or bacteria to scavenge iron from soil minerals. Ferrichrome and desferrioxamine, fungal and bacterial siderophores, respectively, remove iron from chrysotile fibers with the same efficiency at naturally occurring concentrations (Mohanty et al., 2018). Ferrichrome is also effective in iron removal from crocidolite (Werner et al., 1995). Deferoxamine treatment was

shown to decrease toxicity, together with genetic damage, due to its iron-chelating capacity for all asbestos fibers tested (chrysotile, crocidolite, and amosite) (Chao and Aust, 1994; Gold et al., 1997; Poser et al., 2004). As an iron-bearing mineral, asbestos can be colonized by bioremediators. Indeed, fungi, such as *Aspergillus tubingenesis* and *Coemansia reversa*, and Gram positive and Gram negative bacteria have been isolated from Indian asbestos mines (Bhattacharya et al., 2016b, 2016a). These isolates are able to reduce the iron content of asbestos fibers by siderophore-mediated dissolution (Bhattacharya et al., 2015). Over the last decade, many studies have focused on the involvement of fungi for bioremediation via direct adsorption or metabolite production, such as that of organic acids or siderophores. Various genera of saprophytic and mycorrhizal fungi that inhabit chrysotile asbestos mines are involved in mineral weathering. Despite the potential of soil fungi as interesting tools for the bioremediation of asbestos, some genera, such as *Geomyces pannorum var. vinaceus* and var. *pannorum* and *Oidiodendron maius*, are unable to extract iron. However, the efficiency of iron mobilization appears to be strain dependent for *O. maius*, suggesting that the mechanism involved is still not completely understood (Martino et al., 2004). *Fusarium oxysporum*, *Mortierella hyalina*, *O. maius*, and *Oidiodendron griseum* show an ability to bind to crocidolite fibers and extract a significant amount of iron by direct contact between the crystalline structure of the crocidolite fibers and hyphae, leading to transformation of the fiber surface. As a consequence, the iron ions exposed at the surface catalyze oxidative reactions that cause a reduction in the fungi biomass in relation to the toxicity of the asbestos (Martino et al., 2004). In response to such iron toxicity, some fungi species, *i.e., F. oxysporum* and *G. pannorum*, are able to produce melanin pigment on the cell wall or release it into the medium, which protects them from metal toxicity and, therefore, the related oxidative stress. Iron-mediated extraction may thus be related to the production of melanin, siderophores, or nonspecific chelators, such as organic acids. *Verticillium leptobactrum* was shown to be the most efficient at extracting iron from chrysotile fibers relative to *Paecylomyces lilacinus*, *Aspergillus fumigatus*, and *F. oxysporum*, which all showed equivalent efficiency (Daghino et al., 2008). Interestingly, biological weathering does not appear to depend on the asbestos species, as *F. oxysporum* and *V. leptobactrum* can extract iron from chrysotile, crocidolite, and amosite fibers. Moreover, concomitant dissolution of magnesium from chrysotile fibers was described for *V. leptobactrum* and *F. oxysporum*, with supplemental silicon extraction for *V. leptobactrum* (Daghino et al., 2005, 2010, 2009). Iron and magnesium extraction not only correlates with fungal activity, but also with the physicochemical characteristics of the asbestos fibers, *i.e*., the surface area and the amount of bioavailable ions (Daghino et al., 2010). This phenomenon also occurs with

plants and lichens, a symbiotic organism consisting of algae and a fungus. Asbestos can be toxic for certain plants, whereas others are able to develop and grow in the presence of asbestos (Trivedi and Ahmad, 2011). Serpentinic soils are well known to be rich in toxic heavy metals such as Ni (Chardot-Jacques et al., 2013). Plant colonization, such as by *Oryza sativa* and *Zea mays,* at an abandoned mine in India led to the extraction of a significant amount of Cr, Ni, and Pb (Kumar and Maiti, 2014). The growth of *Leptoplax emarginata* on serpentinic soil contaminated by Ni allows not only extraction of the heavy metal but also the dissolution of magnesium from the chrysotile (Chardot-Jacques et al., 2013). Studies conducted in the Italian Balangero mine showed that plants, such as *Minuartia laricifolia, Thymus cfr. Humifusus,* and *T. alpestris*, are pioneer species that can form a layer over rocks (Favero-Longo et al., 2006). Phytic acid, an organic acid produced by plants, was shown to contribute to a decrease in ROS production via iron complexation and thus reduce the toxicity of the three commonly found asbestos species (crocidolite, amosite, and chrysotile) (Kamp et al., 1995). Early stages of asbestos colonization are not necessarily regulated by the chemical properties of serpentines but more often by the stability and morphology of the rocks. The pioneer lichen colonizers show good tolerance to high metal concentrations but because of their typically slow growth, they do not have a covering function like plants. Because lichens can find optimal habitats on fiber-rich surfaces, they can directly colonize serpentinic blocks that plants cannot (Favero-Longo et al., 2004). A secondary benefit of lichen colonization is the reduction of fiber dispersion in the surrounding environment. In addition, certain lichens, such as *Scoliciosporum umbrinum, Candelariella vitellina*, and *Xanthoparmelia tinctina*, have been shown to produce oxalic, pulvinic, and norstictic acid, which are involved in iron extraction and dissolution of the brucite-magnesium (Favero-Longo et al., 2007, 2005; Turci et al., 2007). In conclusion, plants and lichens can be considered as complementary bioremediators in the extraction of iron from serpentinic soil, leading to reduced asbestos toxicity illustrated by a diminution in ROS.

The ability of bacteria to colonize certain iron-bearing minerals is well known, as described earlier. However, little research has been devoted to the study of the importance of bacterial weathering of asbestos. The telluric bacterium *Bacillus mucilaginous* was shown to promote magnesium dissolution from serpentine asbestos, concomitantly with a decrease in pH and the secretion of organic acids and ligands. As a consequence of bioweathering, minerals tend to reduce the crystallinity of the asbestos fiber to amorphous mineral (Yao et al., 2013). More recently, bacterial siderophores produced by the fluorescent *Pseudomonas aeruginosa*, pyoverdine and pyochelin, were shown to be involved in iron dissolution from raw asbestos,

chrysotile, crocidolite, and amosite. Pyoverdine appeared to be the most efficient siderophore in removing iron from chrysotile and, in particular, crocidolite. Because of the iron repression of siderophore biosynthesis, pyoverdine-containing supernatants extracted more iron than the bacterial cells in direct contact with the asbestos. Indeed, this bacterium is also known to be an efficient biofilm producer, rapidly leading to the production of a complex matrix composed of fibers, exopolysaccharides, and bacteria in which the siderophores are embedded, resulting in a complex mechanism for mineral dissolution (David et al., 2020b).

2. Bioweathering of asbestos waste

a. Microbial degradation

Many studies have focused on asbestos rocks to investigate the denaturation of asbestos fibers or their conversion to non-harmful materials. Various bioweathering mechanisms have been demonstrated on raw fibers as already discussed, but only a few studies have transposed these findings to asbestos-containing waste due to the complexity of the matrices in which the fibers are embedded. Thus far, certain fungi, lichens, and bacteria, particularly siderophore-producing- or inorganic or organic acid-producing-bacteria, have been studied for their ability to degrade asbestos cement and flocking asbestos waste. A major concern with asbestos waste is the difficulty of matrix dissolution to release the asbestos fibers to be treated. Fiber cement and flocking asbestos waste, the two major types of asbestos waste, contain 20 and 80% chrysotile fibers, respectively, together with several amphibole species, depending on the waste. The most commonly found asbestos species, chrysotile, can be easily dissolved in acidic conditions, which are also favorable for the dissolution of mineral matrices, such as cement or gypsum. The recent study of Borges et al. (Borges et al., 2022) demonstrated that the incubation of asbestos cement tiles with *Aspergillus brasiliensis* (formely called *Aspergillus niger*) led to two-step release, dissolution of the cement matrix, with solubilization of 70% of the calcium, followed by 100% magnesium solubilization, corresponding to dissolution of the brucite layer of the chrysotile fiber. The same results were observed with treatment with *Acidithiobacillus thiooxidans*, except Ca solubilization occurred to a lesser extent (60%). Organic acids known to be produced by this fungus, such as gluconic acid, citric acid, and oxalic acid, as well as sulfuric acid produced by acid-producing bacteria, confirmed the acid-production-mediated mechanisms. Dissolution by oxalic acid, a well-known secreted metabolite produced by lichens, and bioweathering by the lichen *Candelariella vitellina* was shown on asbestos cement roofs due to magnesium extraction from the brucite layer, which was completely colonized by *C. vitellina* hyphae. The resulting asbestos waste became amorphous and non-toxic (Favero-

Longo et al., 2005). Further studies demonstrated that lichen coverage of 25% modifies the physical and chemical properties of asbestos-cement layers containing both chrysotile and crocidolite species, leading to 30% fiber loss, enhancing the interest of these organisms for biocovering and bioweathering. Contrary to the suggested role of oxalic acid in this alteration process, pulvinic acid, a metabolite of *C. vitellina*, was shown to be possibly involved in the dissolution of asbestos waste, as no oxalate was produced by this lichen species in the tested conditions (Favero-Longo et al., 2009)

Early studies in the late 1980's explored the use of nitrifying bacteria, such as *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp., as nitrous and nitric acid producers for the degradation of asbestos-cement roofs, as they are a natural habitat. Such deterioration implies production of the metabolites NH_4NO_2 and NH_4NO_3, which react with the cement matrix of the asbestos cement, leading to the formation of highly soluble calcium salts, with the resulting weakening of the asbestos cement roof (Wasserbauer et al., 1988). Another metabolic pathway has been used, consisting of the combination of dark fermentation and a hydrothermal process, to denature cement-asbestos composites. The production of volatile fatty acids during the dark fermentation pretreatment promotes the subsequent hydrothermal attack, resulting in chrysotile fiber destruction. The residual organic acids in the hydrothermally treated effluents can be converted by mesophilic anaerobic digestion into a biogas (methane or H2) that can be used in the hydrothermal stage (Spasiano et al., 2019; Trancone et al., 2022). For decades, asbestos has been highly present in cement pipes of drinking-water distribution systems, representing a favorable habitat for microbe colonization. Indeed, bacterial growth can be enhanced by the persistent presence of water and the 20% asbestos fiber representing a nutrient source, more specifically an iron source, as stated in the study of Wang et al. (Wang and Cullimore, 2010). A section of cement pipes from a Canadian water distribution system colonized by a black slime revealed the presence of slime-forming bacteria and heterotrophic aerobic bacteria, together with acid-producing, denitrifying, and sulfate-reducing bacteria. Interestingly, iron oxides were trapped in the slime, probably resulting from dissolution of the cement pipes, leading to changes in the weight of the pipe.

b. Siderophores and organic acids

Bacterial mechanisms of asbestos degradation are mediated by biochemical activities involving low-molecular-weight organic acids and/or siderophore release that contribute to bioweathering. As already discussed, asbestos waste can be colonized by diverse

709 microorganisms that interact with iron-bearing minerals that sustain bacterial growth. As the
710 inhibition of toxicity requires iron removal from asbestos fibers, David et al. (David et al.,
711 2020c) investigated the role of the major siderophore produced by *Pseudomonas* species, the
712 pyoverdines, known to be excellent iron chelators, in the bioweathering of asbestos waste. At
713 least 63 structurally different pyoverdines have been identified, each characterized by a
714 different peptide component of the molecule and by a very narrow specificity as an iron
715 transporter for *Pseudomonas* species (Meyer, 2010). The efficacy of nine pyoverdines was
716 tested for the alteration of flocking asbestos waste (FAW) containing chrysotile-gypsum or
717 amosite-gypsum. Iron was efficiently dissolved by all the tested pyoverdines, with the
718 best extraction for the pyoverdines produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas*
719 *mandelii* for chrysotile-gypsum and *Pseudomonas fluorescens* for amosite-gypsum from the
720 first hour of contact. Long-term kinetic experiments studying alteration cycles showed a gradual
721 decrease in the amount of iron dissolved over the cycles, without reaching an extraction limit
722 after 18 renewal cycles. These results are close to the conclusion of Monhanty et al. (Mohanty
723 et al., 2018), who concluded that short renewal cycles appear to result in the release of iron
724 from the brucite layer of the matrix and leaching of the asbestos fiber surface, potentially
725 providing access to iron from the internal silica layer (David et al., 2020c). Moreover,
726 increasing the pyoverdine concentration in long-term alteration cycles did not improve iron
727 extraction, suggesting that iron availability appears to be the limiting factor of the alteration, as
728 it is trapped in the internal layer. The most common waste, asbestos cement (AC), can also be
729 altered using pyoverdines. Among 10 tested pyoverdines, those from *P. aeruginosa* and *P.*
730 *syringae* efficiently extracted iron with the same ratio and with a higher alteration rate for AC
731 than FAW. Indeed, the grinding of AC particles allowed for a better capacity of surface
732 exchange, which enhances iron accessibility and extraction. Although FAW contains more iron
733 than AC, 90% and 10% chrysotile respectively, a higher quantity of iron can be extracted from
734 AC (34%) than FAW (12%) using the pyoverdine from *P. aeruginosa*. The pyoverdine
735 produced by *P. syringae* alters AC less effectively than that of *P. aeruginosa* (27%), whereas
736 it is just as effective for FAW. Thus, the iron removal by pyoverdines lowers the fiber iron
737 content of asbestos waste and is thus a promising strategy that could be optimized for
738 bioremediation. Fungi are also siderophore producers but none has yet been tested on asbestos
739 waste.

740 c. Siderophore-producing bacteria

Bacteria require a number of essential elements, such as magnesium and iron, for their growth, and their role in the bioweathering of asbestos is no longer questioned. Based on these two facts, David et al. (David et al., 2020a) started to investigate the role of siderophore-producing bacteria in the biodeterioration of asbestos waste. Indeed, when *Pseudomonas* species are grown with FAW, the number of bacteria tends to decrease during the first hours of contact, surely related to the adsorption of the bacteria on the fiber surface, leading to the formation of a microenvironment that can protect them from the hostile environment (Beveridge et al., 1997; Liermann et al., 2000; Ojeda et al., 2006). However, after a few hours of contact, the presence of FAW stimulates bacterial growth in correlation with an increase in the amount of iron and magnesium extracted from the fibers, showing that bacteria are able to use FAW as a source of nutrients. During this phase of iron and magnesium-promoted growth, both the pyoverdine and pyochelin pathways are expressed and involved in iron extraction (David et al., 2020a). The same results were obtained using asbestos cement. The same study also showed that the absence of one of these siderophores significantly decreases iron extraction and that none of them is directly involved in magnesium extraction. This result confirms that the release of magnesium is due to dissolution of the matrix by the bacteria for their own requirements, leading to accessibility to the iron of the fibers for the siderophores. By combining these mechanisms, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 has been shown to be the most effective strain thus far for extracting iron from fibers over the long term, without reaching an extraction limit after 20 renewal cycles. However, when the bacteria's iron requirements are met by its supply via siderophores, siderophore production is repressed by the released iron (David et al., 2021). Indeed, siderophore pathways are tightly regulated by the presence of iron. To overcome this limitation, Lemare et al. (Lemare et al., 2022) engineered a *P. aeruginosa* strain in which pyoverdine production is no longer regulated by iron. Due to its inducible production, this mutant produces seven times more pyoverdine than the wildtype strain, leading to greater iron and magnesium extraction from FAW. Fiber analysis of FAW showed iron deprivation in certain parts of the fiber (Figure 7).

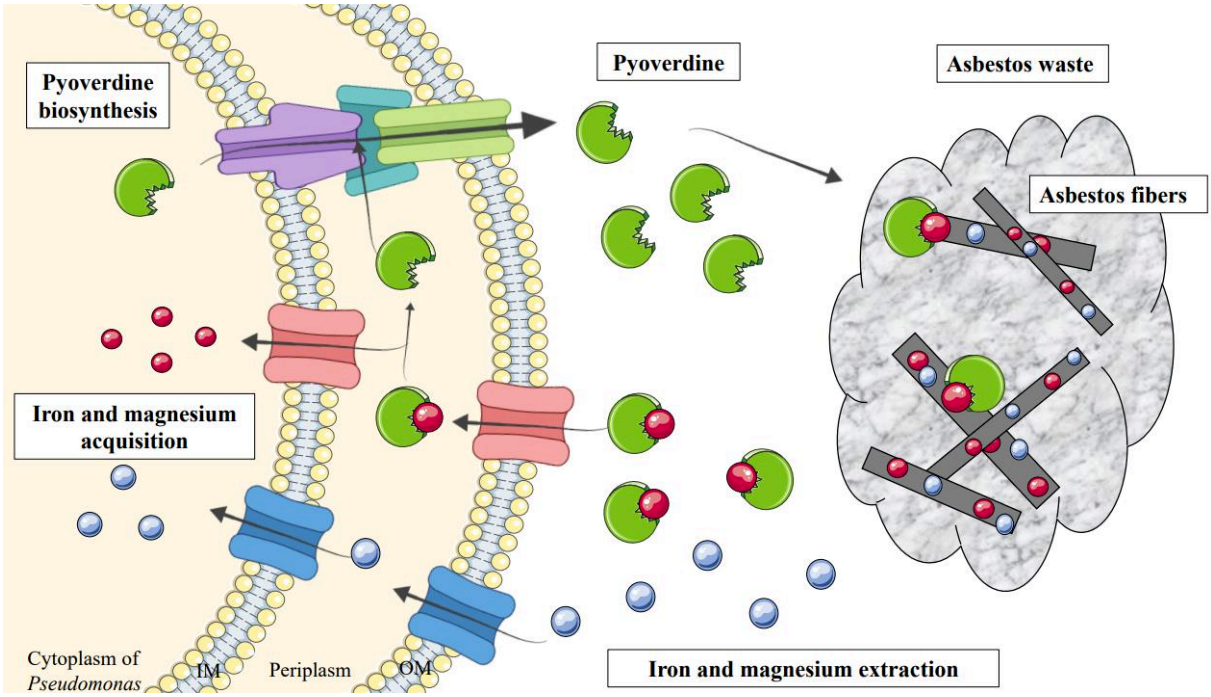


Figure 7. Schematic representation of the engineered pyoverdine-producing *P. aeruginosa* in order to extract iron from asbestos fibers as an ecofriendly way to remove asbestos toxicity. The illustration show the bacterial cell composed of cytoplasm, inner membrane (IM), periplasm and outer membrane (OM). The pyoverdine biosynthesis occurs in the cytoplasm before being secreted in extracellular medium in order to extract iron from asbestos fibers of asbestos waste. The ferri-pyoverdine complex is internalized into the periplasm through specific TonB-dependant transporter to be dissociated. The apo-pyoverdine is recycled in the extracellular medium and the iron is transported in the cytoplasm to sustain bacterial requirements. Red dots represent iron, blue dots represent magnesium, grey bars represent asbestos fibers trapped in a matrix to form the asbestos waste.

8. Conclusions and future research

A decade after the EU parliament decision to promote research for sustainable alternatives to limit ACW landfilling, ACW can be efficiently treated by costly thermal denaturation or physical treatments, such as with microwaves or by grinding, which require, however, high energy consumption. Current chemical processes are efficient in detoxifying ACW, with the disadvantage that it is necessary to identify the asbestos species before treatment, as chrysotile is sensitive to acidic conditions, whereas amphibole species are dissolved in alkaline conditions. Identification of the asbestos species involves an unavoidable extra step, leading to longer

processing times and higher costs. Bioremediation represents a reliable strategy for various pollutants, with the disadvantages of being slow and poorly efficient. Here, we have reviewed biological strategies for the treatment of native asbestos fibers and ACW. These processes do not use costly resources and are respectful to the environment. As for chemical treatment, bioremediation processes result in valuable by-products that can be extracted, such as silicon fibers for reuse in industry as chemical catalysts or magnesium required for agricultural use. Although this biological approach has mostly focused on the weathering activity of fungi over the last 20 years, current research has focused more on the importance of bacteria in bioremediation. These prokaryotic organisms have a generation time that is much shorter than that of fungi and consequently a higher alteration rate under tested conditions. The various biological strategies detailed in this review are based on the degradation of fibers by lactic bacteria, with the production of organic acids. Dark fermentation and nitrifying bacteria are efficient solely on chrysotile-containing waste. In the context of removing iron from ACW, microbial metabolites, such as the low molecular weight organic ligands and siderophores synthesized by fungi, plants, and bacteria, can specifically chelate iron from asbestos fibers, as microbes have evolved highly efficient iron pathways as an adaption to low iron availability in most environments. These newly described microbial pathways are potentially useful, as they can be applied to the alteration of chrysotile and the main amphibole species found in waste (crocidolite, amosite) with no prior fiber identification required. The true advantages of such an approach are the use of low-cost and basal nutrients for bacterial growth for the process and the absence of the generation of toxic byproducts that need to be managed. Further research is however required to understand the weathering mechanisms involved in iron dissolution. Aside from the high iron-specific affinity and specificity of siderophores, no data are currently available concerning ligand-controlled dissolution. Among various mechanisms, the specific-surface adsorption of siderophores to fibers, the direct contact of bacteria with a particular membrane site, and the role of exopolysaccharides matrices encountered in biofilms in the bioweathering process need to be further investigated. These low-energy strategies based on mechanisms naturally found in the ecosystem need to be optimized for industrial application to develop a sustainable bioremediation technology for the complete destruction and detoxification of ACW.

References

Adamo, P., Violante, P., 2000. Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. Appl. Clay Sci. 16, 229–256. https://doi.org/10.1016/S0169-1317(99)00056-3

Ahmed, E., Holmström, S.J.M., 2015. Microbe–mineral interactions: The impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms. Chem. Geol. 403, 13–23. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.03.009

Ahmed, E., Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microb. Biotechnol. 7, 196–208. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117

Alleman, J.E., Mossman, B.T., 1997. Asbestos Revisited. Sci. Am. 277, 70–75. https://doi.org/10.1038/scientificamerican0797-70

Allen, L.P., Baez, J., Stern, M.E.C., Takahashi, K., George, F., 2018. Trends and the Economic Effect of Asbestos Bans and Decline in Asbestos Consumption and Production Worldwide. Int. J. Environ. Res. Public. Health 15, 531. https://doi.org/10.3390/ijerph15030531

Aouad, G., Crovisier, J., Geoffroy, V., Meyer, J., Stille, P., 2006. Microbially-mediated glass dissolution and sorption of metals by Pseudomonas aeruginosa cells and biofilm. J. Hazard. Mater. 136, 889–895. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.026

Balducci, G., 2012. Process for treating an asbestos containing material. 2428254A1.

Barbalace, R.C., 2004. Asbestos, its Chemical and Physical Properties: Second in a series of articles on asbestos: Its history, chemical and physical properties, uses, health hazards and the legal implications of asbestosis & mesothelioma. (EnvironmentalChemistry.com) [WWW Document]. URL https://environmentalchemistry.com/yogi/environmental/asbestosproperties2004.html (accessed 11.16.22).

Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., Li, Z., 1997. Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol. Rev. 20, 291–303. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x

Bhattacharya, S., John, P.J., Ledwani, L., 2016a. Fungal weathering of asbestos in semi arid regions of India. Ecotoxicol. Environ. Saf. 124, 186–192. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.022

Bhattacharya, S., John, P.J., Ledwani, L., 2015. Bacterial Weathering of Asbestos. Silicon 7, 419–431. https://doi.org/10.1007/s12633-014-9260-9

Bhattacharya, S., Ledwani, L., John, P.J., 2016b. Siderophores, the answer for micro to nanosized asbestos fibre related health hazard. Presented at the 5TH NATIONAL CONFERENCE ON THERMOPHYSICAL PROPERTIES: (NCTP-09), Baroda (India), p. 020102. https://doi.org/10.1063/1.4945222

Bordebeure, S., 2017. Déchets amiantés. ADEME 9.

Borges, R., Klaic, R., Farinas, C.S., Ribeiro, C., 2022. Biological treatment of asbestos cement wastes by Aspergillus niger and Acidithiobacillus thiooxidans. Appl. Clay Sci. 216, 106375. https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106375

Bossier, P., Hofte, M., Verstraete, W., 1988. Ecological Significance of Siderophores in Soil. Adv. Microb. Ecol. 10, 385–434.

Chao, C.C., Aust, A.E., 1994. Effect of Long-Term Removal of Iron from Asbestos by Desferrioxamine B on Subsequent Mobilization by Other Chelators and Induction of DNA Single-Strand Breaks. Arch. Biochem. Biophys. 308, 64–69. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1009

Chardot-Jacques, V., Calvaruso, C., Simon, B., Turpault, M.-P., Echevarria, G., Morel, J.-L., 2013. Chrysotile Dissolution in the Rhizosphere of the Nickel Hyperaccumulator *Leptoplax emarginata*. Environ. Sci. Technol. 47, 2612–2620. https://doi.org/10.1021/es301229m

Comission directive, 1999. Adapting to technical progress for the sixth time Annex I to Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (asbestos). Off. J. Eur. Communities 207, 18–20.

Daghino et al., S., 2005. Inorganic Materials and Living Organisms: Surface Modifications and Fungal Responses to Various Asbestos Forms [WWW Document]. https://doi.org/10.1002/chem.200500046

Daghino, S., Martino, E., Perotto, S., 2010. Fungal weathering and implications in the solubilization of metals from soil and from asbestos fibres 11.

Daghino, S., Martino, E., Vurro, E., Tomatis, M., Girlanda, M., Fubini, B., Perotto, S., 2008. Bioweathering of chrysotile by fungi isolated in ophiolitic sites. FEMS Microbiol. Lett. 285, 242–249. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01239.x

Daghino, S., Turci, F., Tomatis, M., Girlanda, M., Fubini, B., Perotto, S., 2009. Weathering of chrysotile asbestos by the serpentine rock-inhabiting fungus Verticillium leptobactrum: Weathering of chrysotile by Verticillium leptobactrum. FEMS Microbiol. Ecol. 69, 132–141. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00695.x

Damien, A., 2016. Guide du traitement des déchets - Réglementation et choix des procédés, Dunod. ed, Technique et ingénierie.

David, S.R., Fritsch, S., Forster, A., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., 2020a. Flocking asbestos waste, an iron and magnesium source for Pseudomonas. Sci. Total Environ. 709, 135936. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135936

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., Geoffroy, V.A., 2020b. Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing Pseudomonas. J. Hazard. Mater. 385, 121563. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121563

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., Geoffroy, V.A., 2020c. Efficiency of pyoverdines in iron removal from flocking asbestos waste: An innovative bacterial bioremediation strategy. J. Hazard. Mater. 394, 122532. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122532

David, S.R., Jaouen, A., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., 2021. Biodeterioration of asbestos cement by siderophore-producing Pseudomonas. J. Hazard. Mater. 403, 123699. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123699

Dériot, G., Godefroy, J.-P., 2005. Le drame de l'amiante en France. Sénat.

Dilek, Y., 2003. Ophiolite concept and its evolution, in: Ophiolite Concept and the Evolution of Geological Thought: Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 373. pp. 1–16. https://doi.org/10.1130/0-8137-2373-6.1

Dong, H., 2010. Mineral-microbe interactions: a review. Front. Earth Sci. China 4, 127–147. https://doi.org/10.1007/s11707-010-0022-8

Douguet, D., Carteron, H., Janiaud, P., Pinhas, N., 1997. Effets sur la santé des principaux types d'exposition à l'amiante 451.

Favero-Longo, S.E., Castelli, D., Fubini, B., Piervittori, R., 2009. Lichens on asbestos–cement roofs: Bioweathering and biocovering effects. J. Hazard. Mater. 162, 1300–1308. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.060

Favero-Longo, S.E., Girlanda, M., Honegger, R., Fubini, B., Piervittori, R., 2007. Interactions of sterile-cultured lichen-forming ascomycetes with asbestos fibres. Mycol. Res. 111, 473–481. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.01.013

Favero-Longo, S.E., Isocrono, D., Piervittori, R., 2004. Lichens and ultramafic rocks: a review. The Lichenologist 36, 391–404. https://doi.org/10.1017/S0024282904014215
Favero-Longo, S.E., Siniscalco, C., Piervittori, R., 2006. Plant and lichen colonization in an asbestos mine: Spontaneous bioattenuation limits air dispersion of fibres. Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol. 140, 190–205. https://doi.org/10.1080/11263500600756546
Favero-Longo, S.E., Turci, F., Tomatis, M., Castelli, D., Bonfante, P., Hochella, M.F., Piervittori, R., Fubini, B., 2005. Chrysotile asbestos is progressively converted into a non-fibrous amorphous material by the chelating action of lichen metabolites. J. Environ. Monit. 7, 764–766. https://doi.org/10.1039/B507569F
Fein, J.B., Boily, J.F., Yee, N., Gorman-Lewis, D., Turner, B.F., 2005. Potentiometric titrations of Bacillus subtilis cells to low pH and a comparison of modeling approaches. Geochim. Cosmochim. Acta 69, 1123–1132. https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.07.033
Fowle, D.A., Kulczycki, E., Roberts, J.A., n.d. Linking bacteria-metal interactions to mineral attachment: A role for outer sphere complexation of cations? 4.
Franck, A.L., 2006. The history of the extraction and uses of asbestos, in: Asbestos: Risk Assessment, Epidemiology, and Health Effects. CRC Press, p. 441.
Gadd, G.M., 2017. Geomicrobiology of the built environment. Nat. Microbiol. 2, 16275. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.275
Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156, 609–643. https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0
Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol. Res. 111, 3–49. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001
Gautier, A.L., Michel, P., Montfort-Climent, D., Lahondère, D., 2017. Recueil de données chiffrées sur les gisements de déchets d'amiante au regard des filières de traitement disponibles (BRGM).
Gold, J., Amandusson, H., Krozer, A., Kasemo, B., Ericsson, T., Zanetti, G., Fubini, B., 1997. Chemical characterization and reactivity of iron chelator-treated amphibole asbestos. Environ. Health Perspect. 105, 1021–1030. https://doi.org/10.1289/ehp.97105s51021
Gorbushina, A.A., 2007. Life on the rocks. Environ. Microbiol. 9, 1613–1631. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x
Hernandez, M.E., Kappler, A., Newman, D.K., 2004. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. Appl. Environ. Microbiol. 70, 921–928. https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.921-928.2004
INRS, 2018. Amiante Fiche Toxicologique n°145.
International Agency for Research on Cancer (Ed.), 2012. Asbestos (chrysotile, amosite, crocidolite, tremolite, actinolite and anthophyllite), in: A Review of Human Carcinogens, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International agency for research on cancer, Lyon, p. 469.
Jamrozik, E., de Klerk, N., Musk, A.W., 2011. Asbestos-related disease. Intern. Med. J. 41, 372–380. https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02451.x
Jones, A.A., Bennett, P.C., 2014. Mineral Microniches Control the Diversity of Subsurface Microbial Populations. Geomicrobiol. J. 31, 246–261. https://doi.org/10.1080/01490451.2013.809174
Kamp, D.W., Israbian, V.A., Yeldandi, A.V., Panos, R.J., Graceffa, P., Weitzman, S.A., 1995. Phytic Acid, an Iron Chelator, Attenuates Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Rats after Intratracheal Instillation of Asbestos. Toxicol. Pathol. 23, 689–695. https://doi.org/10.1177/019262339502300606

Kazan-Allen, L., 2003. The asbestos war 173–193.
Kenneth, C.C., 2018. Mineral Yearbook, U.S. Geological Survey. ed.
Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Vladykovskaya, E.N., Hiramatsu, M., 2000. Protective Effects of Green Tea Catechins against Asbestos-Induced Cell Injury. Planta Med. 66, 762–764. https://doi.org/10.1055/s-2000-9567
Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquat. Sci. - Res. Boundaries 66, 3–18. https://doi.org/10.1007/s00027-003-0690-5
Kumar, A., Maiti, S.K., 2014. Translocation and Bioaccumulation of Metals in Oryza sativa and Zea mays Growing in Chromite-Asbestos Contaminated Agricultural Fields, Jharkhand, India. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 434–441. https://doi.org/10.1007/s00128-014-1339-x
Lahondère, D., Misseri, M., Roy, X., 2014. Comprendre l'amiante par la géologie. Rev. Générale Routes Aménage.
Lazo, D.E., Dyer, L.G., Alorro, R.D., 2017. Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. Miner. Eng. 100, 115–123. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.10.013
Lemare, M., Puja, H., David, S.R., Mathieu, S., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., Rigouin, C., 2022. Engineering siderophore production in *Pseudomonas* to improve asbestos weathering. Microb. Biotechnol. 15, 2351–2363. https://doi.org/10.1111/1751-7915.14099
Liermann, L.J., Barnes, A.S., Kalinowski, B.E., Zhou, X., Brantley, S.L., 2000. Microenvironments of pH in biofilms grown on dissolving silicate surfaces. Chem. Geol. 171, 1–16. https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00202-3
Lund, L.G., Aust, A.E., 1990. Iron mobilization from asbestos by chelators and ascorbic acid. Arch. Biochem. Biophys. 278, 60–64. https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90231-M
Martino, E., Cerminara, S.T., Prandi, L., Fubini, B., Perotto, S., 2004. Physical and biochemical interactions of soil fungi with asbestos fibers. Environ. Toxicol. Chem. 23, 938–944. https://doi.org/10.1897/03-266
Meyer, J.-M., 2010. Pyoverdine Siderophores as Taxonomic and Phylogenic Markers, in: Ramos, J.L., Filloux, A. (Eds.), Pseudomonas: Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–233. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3909-5_7
Miserocchi, G., Sancini, G., Mantegazza, F., Chiappino, G., 2008. Translocation pathways for inhaled asbestos fibers. Environ. Health 7, 4. https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-4
Mohanty, S.K., Gonneau, C., Salamatipour, A., Pietrofesa, R.A., Casper, B., Christofidou-Solomidou, M., Willenbring, J.K., 2018. Siderophore-mediated iron removal from chrysotile: Implications for asbestos toxicity reduction and bioremediation. J. Hazard. Mater. 341, 290–296. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.033
Ng, D.H.P., Kumar, A., Cao, B., 2016. Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 6935–6946. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7678-2
Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R., Winge, D.R., 2006. Role of Glutaredoxin-3 and Glutaredoxin-4 in the Iron Regulation of the Aft1 Transcriptional Activator in Saccharomyces cerevisiae* | Elsevier Enhanced Reader. J. Biol. Chem. 281, 17661–17669. https://doi.org/10.1074/jbc.M602165200
Paolini, V., Tomassetti, L., Segreto, M., Borin, D., Liotta, F., Torre, M., Petracchini, F., 2019. Asbestos treatment technologies. J. Mater. Cycles Waste Manag. 21, 205–226. https://doi.org/10.1007/s10163-018-0793-7

Peto, J., Matthews, F.E., Hodgson, J.T., Jones, J.R., 1995. Continuing increase in mesothelioma mortality in Britain. The Lancet 345, 535–539. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90462-X

Poser, I., Rahman, Q., Lohani, M., Yadav, S., Becker, H.-H., Weiss, D.G., Schiffmann, D., Dopp, E., 2004. Modulation of genotoxic effects in asbestos-exposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 559, 19–27. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.006

Roberts, J.A., 2004. Inhibition and enhancement of microbial surface colonization: the role of silicate composition. Chem. Geol., Bacteria and Geochemical Speciation of Metals 212, 313–327. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2004.08.021

Røe, O.D., Stella, G.M., 2015. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. Eur. Respir. Rev. 24, 115–131. https://doi.org/10.1183/09059180.00007014

Rosling, A., Roose, T., Herrmann, A.M., Davidson, F.A., Finlay, R.D., Gadd, G.M., 2009. Approaches to modelling mineral weathering by fungi. Fungal Biol. Rev., Geomycology 23, 138–144. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.09.003

Ruff, K., 2017. How Canada Changed from Exporting Asbestos to Banning Asbestos: The Challenges That Had to Be Overcome. Int. J. Environ. Res. Public. Health 14, 1135. https://doi.org/10.3390/ijerph14101135

Ruffié, P., Margery, J., 2007. Cancer et environnement: le cas de l'amiante. Oncologie 9, 335–339. https://doi.org/10.1007/s10269-007-0641-1

Simmons, W.B., 2016. Amphibole [WWW Document]. Encycl. Br. URL https://www.britannica.com/science/amphibole (accessed 11.21.22).

Spasiano, D., Luongo, V., Race, M., Petrella, A., Fiore, S., Apollonio, C., Pirozzi, F., Fratino, U., Piccinni, A.F., 2019. Sustainable bio-hydrothermal sequencing treatment for asbestos-cement wastes. J. Hazard. Mater. 364, 256–263. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.025

Spasiano, D., Pirozzi, F., 2017. Treatments of asbestos containing wastes. J. Environ. Manage. 204, 82–91. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.038

Stanik, I.A., Cedzynska, K., Zakowska, Z., 2006. Destruction of chrysotile asbestos structure with a population of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum 644–648.

Stayner, L., Welch, L.S., Lemen, R., 2013. The Worldwide Pandemic of Asbestos-Related Diseases. Annu. Rev. Public Health 34, 205–216. https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124704

Sterflinger, K., 2000. Fungi as Geologic Agents. Geomicrobiol. J. 17, 97–124. https://doi.org/10.1080/01490450050023791

Talbi, G., Cambon, M., Cambon, O., 2019. Virtuous cycle of destruction and total recycling of pure asbestos and asbestos-containing waste. J. Mater. Cycles Waste Manag. 21, 1167–1176.

Toyokuni, S., Jiang, L., Hu, Q., Nagai, H., Okazaki, Y., Akatsuka, S., Yamashita, Y., 2011. Mechanisms of Asbestos-Induced Carcinogenesis. Nippon Eiseigaku Zasshi 66, 562–567. https://doi.org/10.1265/jjh.66.562

Trancone, G., Spasiano, D., Race, M., Luongo, V., Petrella, A., Pirozzi, F., Fratino, U., Piccinni, A.F., 2022. A combined system for asbestos-cement waste degradation by dark fermentation and resulting supernatant valorization in anaerobic digestion. Chemosphere 300, 134500. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134500

Trivedi, A.K., Ahmad, I., 2011. Effects of Chrysotile Asbestos Contaminated Soil on Crop Plants. Soil Sediment Contam. Int. J. 20, 767–776. https://doi.org/10.1080/15320383.2011.609197

Turci, F., Favero-Longo, S.E., Tomatis, M., Martra, G., Castelli, D., Piervittori, R., Fubini, B., 2007. A Biomimetic Approach to the Chemical Inactivation of Chrysotile Fibres by Lichen Metabolites. Chem. – Eur. J. 13, 4081–4093. https://doi.org/10.1002/chem.200600991

Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K., Musílek, K., 2016. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. Arch. Toxicol. 90, 1–37. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1579-5

Van Gosen, B.S., 2007. The Geology of Asbestos in the United States and Its Practical Applications. Environ. Eng. Geosci. 13, 55–68. https://doi.org/10.2113/gseegeosci.13.1.55

Virta, R.L., 2002. Asbestos: Geology, Mineralogy, Mining, and Uses (U.S. Geological Survey Open-File Report), Open-File Report.

Wagner, J.C., Sleggs, C.A., Marchand, P., 1960. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western cape province. Br. J. Ind. Med. 12.

Wang, D., Cullimore, D.R., 2010. Bacteriological challenges to asbestos cement water distribution pipelines. J. Environ. Sci. 22, 1203–1208. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60239-4

Warscheid, Th., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. Int. Biodeterior. Biodegrad. 46, 343–368. https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8

Wasserbauer, R., Zadák, Z., Novotný, J., 1988. Nitrifying bacteria on the asbestos-cement roofs of stable buildings. Int. Biodeterior. 24, 153–165. https://doi.org/10.1016/0265-3036(88)90045-0

Werner, A.J., Hochella, M.F., Guthrie, G.D., Hardy, J.A., Aust, A.E., Rimstidt, J.D., 1995. Crocidolite dissolution in the presence of Fe chelators; implications for mineral-induced disease. Am. Mineral. 80, 1093–1103. https://doi.org/10.2138/am-1995-11-1201

Winkelmann, G., 2007. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. BioMetals 20, 379. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9076-1

Yao, M., Lian, B., Teng, H.H., Tian, Y., Yang, X., 2013. Serpentine Dissolution in the Presence of Bacteria Bacillus mucilaginosus. Geomicrobiol. J. 30, 72–80. https://doi.org/10.1080/01490451.2011.653087

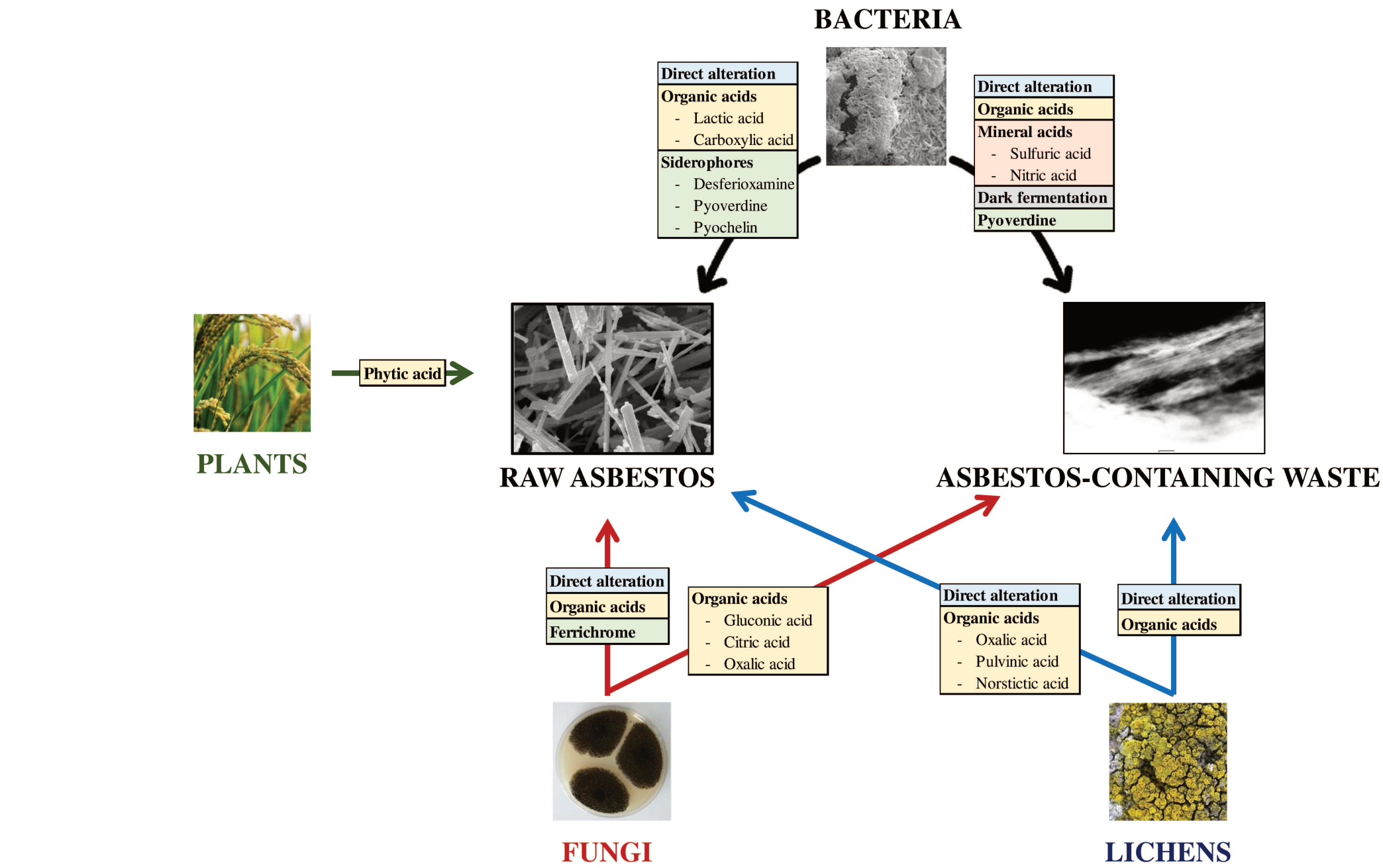
Credit authors statement

Marion LEMARE performed the writing and conception of tables and graphs

Sébastien DAVID performed the writing and conception of graphs

Valérie GEOFFROY performed writing, review and editing and was responsible for funding acquisition

Graphical Abstract



3. Résumé de la revue

Une décennie après la décision du Parlement Européen de promouvoir la recherche d'alternatives durables pour limiter la mise en décharge des déchets amiantés, ceux-ci peuvent être traités efficacement par dénaturation thermique ou traitements physiques coûteux tels que les micro-ondes ou le broyage, nécessitant cependant une forte consommation d'énergie. Les procédés chimiques actuels sont efficaces, bien qu'il soit nécessaire d'identifier les espèces d'amiante préalablement au traitement. En effet, le chrysotile est sensible aux conditions acides alors que les amphiboles sont dissoutes en conditions alcalines. L'identification des espèces d'amiante implique une étape supplémentaire inévitable, entraînant des délais de traitement plus longs et des coûts plus élevés. La bioremédiation représente une stratégie fiable pour divers polluants, mais reste cependant plus lente et moins efficace.

Ce chapitre passe en revue les stratégies biologiques pour le traitement des fibres d'amiante natives et les déchets amiantés qui n'utilisent pas de ressources coûteuses et sont respectueuses de l'environnement. Tout comme les traitements chimiques, les procédés de bioremédiation aboutissent à des sous-produits qui peuvent être valorisables, tels que des fibres de silice, réutilisées dans l'industrie comme catalyseurs chimiques ou le magnésium pouvant être utilisé dans le domaine agricole. Bien que cette approche biologique se soit principalement concentrée sur les capacités d'altération des champignons, la recherche actuelle s'est davantage concentrée sur l'importance des bactéries dans la bioremédiation. Ces organismes procaryotes ont un temps de génération beaucoup plus court que celui des champignons et par conséquent pourrait conduire à un taux d'altération plus élevé si la croissance est un facteur déterminant. Les différentes stratégies biologiques détaillées dans cette revue reposent, entre autre, sur la dégradation des fibres par les bactéries lactiques via la production d'acides organiques, la « dark fermentation » et les bactéries nitrifiantes. En complément, dans le contexte de l'élimination du fer des déchets amiantés, les métabolites microbiens tels que les ligands organiques de faible poids moléculaire ou les sidérophores synthétisés par les champignons, les plantes et les bactéries, se révèlent être des alliés efficaces. En effet, ces microorganismes se développant dans des environnements présentant une faible biodisponibilité en fer, ils ont développé des stratégies d'acquisition du fer très efficaces,

notamment *via* des chélateurs spécifiques. Ces voies bactériennes nouvellement étudiées dans un contexte de bioremédiation sont particulièrement utiles car elles peuvent être appliquées à la fois à l'altération du chrysotile mais aussi des principales espèces d'amphiboles présentes dans les déchets (crocidolite, amosite) sans identification préalable des fibres. Les avantages d'une telle approche sont l'utilisation de nutriments peu onéreux pour la croissance bactérienne et l'absence de génération de sous-produits toxiques qui devraient être gérés. Ces stratégies à faible consommation d'énergie basées sur des mécanismes naturellement présents dans l'écosystème, doivent être optimisées pour une application industrielle. Cela permettrait de développer un procédé durable pour la destruction et la détoxification complète de tous les déchets amiantés.

Chapitre 2

Les *Pseudomonas*

1 Les caractéristiques du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont définies comme des bacilles aérobies strictes et mobiles par ciliature polaire (Migula, 1894) ou péritriche (Yang *et al.*, 2013), appartenant à la classe des γ-protéobactéries. Les *Pseudomonas* représentent le genre bactérien regroupant le plus d'espèces au sein des bactéries à coloration de Gram négative. Ce genre n'a cessé d'évoluer depuis le premier isolement de *Pseudomonas aeruginosa* en 1882 par Carle Gessard, un pharmacien militaire, qui l'appelle alors Bacille pyocyanique et le décrit dans son article « Sur les colorations bleues et vertes des linges à pansements ». Comme le montre la **Figure 1**, le nombre d'espèces décrites est en constante augmentation depuis sa première description. En 2023, sur la base de données « Prokaryotic Names with standing in the Nomenclature », le genre *Pseudomonas* regroupe 531 taxons dont seulement 313 ont un nom validé, publié et ne présentant aucun synonyme (https://www.bacterio.net/. Consulté le 26/05/2023) (Parte *et al.*, 2020). D'un point de vue des espèces, environ 270 sont actuellement décrites, cependant, en 2020, 33 espèces précédemment décrites comme des *Pseudomonas* ont été transférées dans d'autres genres grâce aux différentes techniques de biologie moléculaire permettant une identification précise des organismes.

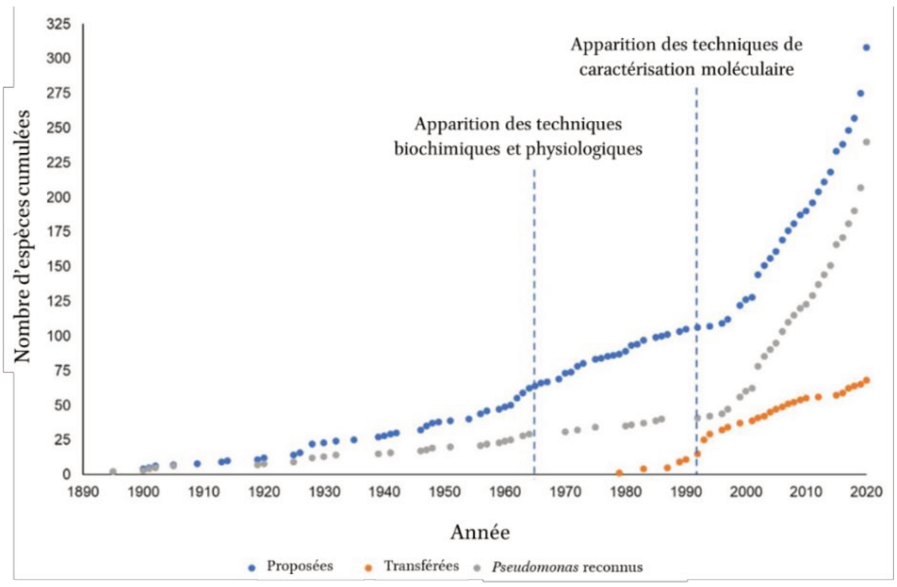


Figure 1 : Nombre cumulé d'espèces bactériennes de *Pseudomonas* recensé depuis leur première description. Les espèces proposées sont indiquées en bleu, les espèces transférées dans un autre genre sont indiquées en orange et les espèces acceptées comme *Pseudomonas* sont en gris (d'après Lalucat *et al.*, 2022).

Tout d'abord classées d'après leur morphologie, leur motilité ou encore leur métabolisme (Palleroni, 1984), puis par la comparaison de leur gène codant pour l'ARNr 16S, les différentes espèces sont aujourd'hui regroupées grâce à la taxonomie polyphasique regroupant les données phénotypiques mais aussi génétiques (Lalucat *et al.*, 2022). En 2015, Gomila *et al.* ont ainsi prouvé la robustesse de l'analyse par Four-gene Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) combinées à celle de l'ARNr 16S des gènes de ménage *gyrB*, *rpoB* et *rpoD*, proposée par Mulet *et al.* comme analyse d'ADN de référence (Gomila *et al.*, 2015; Mulet *et al.*, 2010). Grâce au développement des techniques de séquençage de génomes entiers, ces derniers peuvent être comparés entre eux afin de définir le core génome, composé de 794 gènes chez les *Pseudomonas*. L'alignement de séquences protéiques issues de 100 de ces gènes orthologues chez 166 souches références de *Pseudomonas* a permis d'identifier 13 groupes phylogénétiques comprenant entre 2 et 66 espèces chacun (Hesse *et al.*, 2018). L'arbre phylogénique du genre *Pseudomonas* obtenu par MLSA en 2016 est représenté en **Figure 2** (Garrido-Sanz *et al.*, 2016). Cet arbre permet ainsi d'illustrer la diversité des *Pseudomonas* et plus particulièrement les liens de parenté entre *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* qui sont les deux espèces étudiées dans ce travail, encadrées en rouge sur la **Figure 2.**

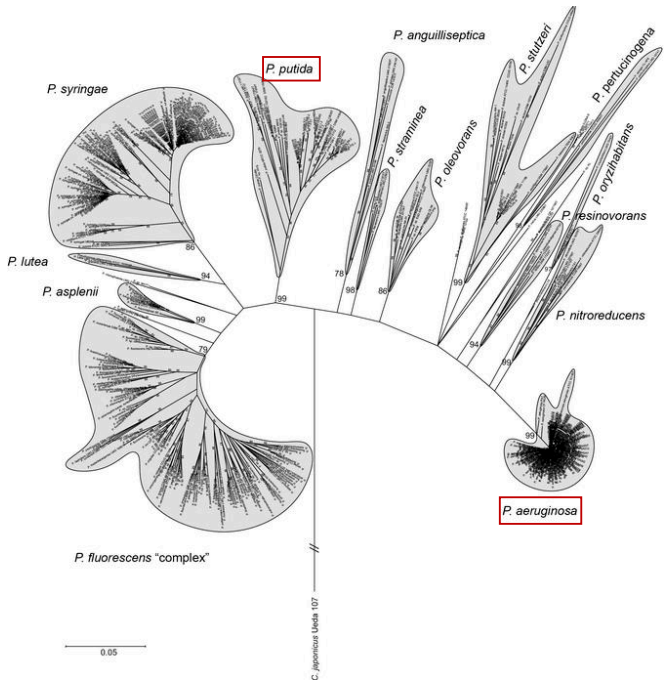


Figure 2 : Phylogénie du genre *Pseudomonas* obtenue par MLSA. L'arbre phylogénétique a été obtenu grâce à 451 souches de *Pseudomonas* et *Cellvibrio japonicum* Ueda 107 a été utilisé pour ancrer les différents groupes. Les souches d'intérêt dans le cadre de mon travail de thèse sont encadrées en rouge (Garrido-Sanz *et al.*, 2016)

Les *Pseudomonas* sont dits ubiquitaires car retrouvés dans la majorité des habitats terrestres, du sable à la rhizosphère de graminées en passant par des sols forestiers, mais également aquatiques, comme l'eau minérale ou en milieu marin (Silby *et al.*, 2011). Les nombreuses fonctions biologiques des *Pseudomonas* leur confèrent une grande capacité d'adaptation à différents environnements. En effet, de nombreux *Pseudomonas* interagissent avec des plantes et certaines espèces sont capables de contribuer à leur bonne santé en stimulant leur croissance ou leur résistance comme c'est le cas des rhizobactéries (ou PGPR pour plant growth-promoting rhizobacteria). Des espèces peuvent aussi agir comme antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Certaines espèces peuvent ainsi produire des métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne comme la syringomycine, les phénazines ou encore la thioquinolobactine. Des insecticides peuvent être aussi produits comme la Pf-5 Fit produite par *P. fluorescens,* dirigée contre le sphinx du tabac ou des toxines contre les drosophiles produites par *P. entomophila* mais encore non identifiées à l'heure actuelle (Silby *et al.*, 2011).

De plus, certains *Pseudomonas* sont des pathogènes de plantes, notamment *P. syringae* (Gardan, 2002), d'animaux comme les poissons (Nishimori *et al.*, 2000) ou les singes (Vela *et al.*, 2006) mais aussi d'humains comme *P. aeruginosa*, majoritairement retrouvé dans des cas de patients atteints de mucoviscidose ou en surinfection chez les grands brulés (Lyczak *et al.*, 2000).

Enfin, certaines espèces possèdent, de par leur métabolisme très versatile, la capacité de dégrader des composés complexes, parfois néfastes pour la biodiversité, et peuvent donc être retrouvés dans des environnements contaminés. C'est le cas de *P. putida* dont de nombreuses études ont démontré ses capacités à utiliser de nombreuses sources de carbone, simples ou complexes comme des composés aromatiques (Nelson *et al.*, 2002). L'ensemble des fonctions biologiques exercées par les *Pseudomonas* dans leurs habitats respectifs sont représentées sur la **Figure 3.**

Parmi ces nombreuses espèces de *Pseudomonas*, ce travail de thèse s'articule autour de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1*,* ATCC 15692, souche pathogène opportuniste modèle du laboratoire et *Pseudomonas putida* KT2440, ATCC 47054, bactérie reconnue pour ses capacités de bioremédiation.

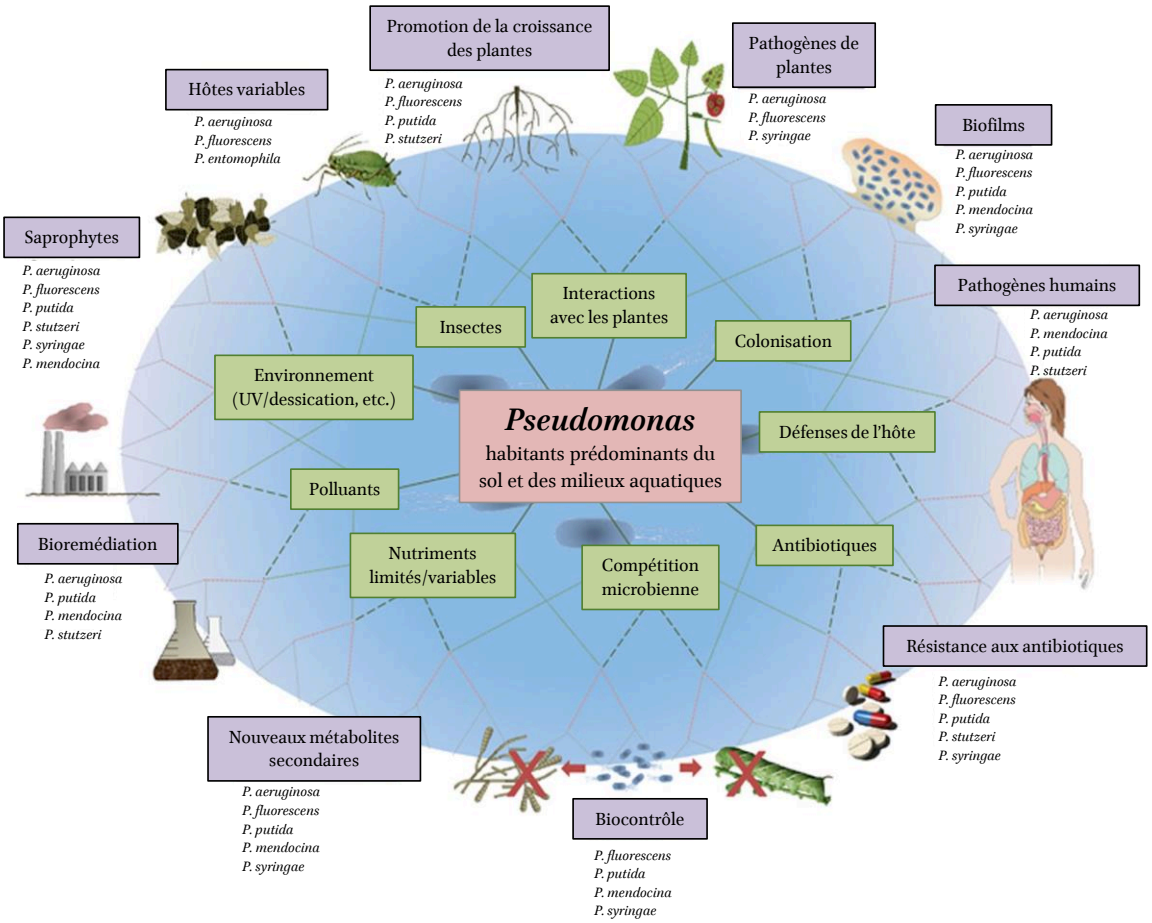


Figure 3 : Fonctions biologiques exercées par les *Pseudomonas* dans leurs différents habitats (d'après Silby *et al.*, 2011)

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative à réservoir ubiquitaire car capable de se développer dans le sol, les eaux et les habitats marins côtiers, ainsi que sur les tissus végétaux ou animaux. Ce travail de thèse s'intéresse plus particulière à la souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, nommée PAO1 dans la suite du manuscrit, souche de référence étudiée au laboratoire. Il s'agit d'un organisme non sporulé, non fermentatif, aérobie stricte et se développant dans une gamme de température très large, allant de 10 à 42 °C avec un optimum à 37 °C, notamment dans un cadre infectieux. La souche possède un métabolisme oxydatif et est caractérisable grâce à sa production de cytochrome c oxydase, d'une nitrate et d'une nitrite réductases ainsi que d'une arginine désaminase (Jeannot and Guillard, 2019).

Son génome, entièrement séquencé en 2000, est un des plus gros du monde procaryote avec 6,3 millions de paires de bases (pb), reflétant sa versatilité et sa complexité (Silby *et al.*, 2011; Stover *et al.*, 2000). Son génome exhibe une forte proportion de protéines régulatrices (521) et 150 gènes sont prédits comme codants pour des protéines de membrane externe, incluant les porines OprD, les protéines TonB impliquées dans l'acquisition du fer par les sidérophores ainsi que les protéines d'efflux ou de sécrétion OprM. La souche possède environ 300 systèmes de transports membranaires dont deux tiers permettent l'import de nutriments ou d'autres molécules en fonctions des conditions environnementales (Stover *et al.*, 2000).

Bien que retrouvé dans un grand nombre d'environnements, *P. aeruginosa* est majoritairement retrouvé près des zones à activité humaine (Crone *et al.*, 2020). Cette souche est capable de former des biofilms sur des surfaces humides diverses et variées telles que les roches, les sols mais aussi les cathéters médicaux. Sa haute résistance naturelle aux antibiotiques est principalement due à l'imperméabilité de sa membrane externe et à la production d'enzymes inhibitrices comme les β-lactamases mais également à la présence de quatre pompes d'efflux actif et à sa capacité à former des biofilms, intervenant notamment dans les infections chroniques (Hirakata *et al.*, 2002; Mah *et al.*, 2003; Stover *et al.*, 2000). De plus la souche est capable de développer diverses formes de résistance, notamment par l'acquisition de matériel génétique étranger *via* des plasmides ou des transposons (Jeannot and Guillard, 2019). Elle est à l'origine aujourd'hui de bactériémie chez les grands brûlés, d'infections des voies urinaires chez les patients portant un cathéter et mais surtout de pneumonie nosocomiale chez les patients sous respirateurs (Stover *et al.*, 2000). C'est également le principal agent contribuant à la mortalité associée à la mucoviscidose, causant des infections pulmonaires chroniques (Davies, 2002). La virulence de la PAO1 est ainsi classifiée de multifactorielle combinatoire et ce pathogène opportuniste est responsable des infections nosocomiales les plus répandues et les plus difficiles à traiter (Weinstein *et al.*, 2005). De plus, de par ses mécanismes de résistance naturels mais également la mauvaise utilisation des antibiotiques, nous avons vu émerger, et se propager, au cours du siècle dernier, de nombreuses souches antibiorésistantes. Elle fait partie du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* and *Enterobacter* species) dont les bactéries sont responsables d'infections nosocomiales et sont multi-résistantes aux

antibiotiques. La souche est capable de produire de nombreux facteurs de virulence participant à la pathogénicité par des actions complémentaires, sans qu'aucun d'entre eux ne soit décisif dans la pathologie. On peut ainsi citer le système de sécrétion de type III permettant l'injection des exotoxines dans le cytoplasme de la cellule hôte, les rhamnolipides permettant de lyser les érythrocytes et les leucocytes ou encore l'élastase LasB capable de dégrader les peptides antimicrobiens de l'hôte (Jeannot and Guillard, 2019). Enfin, le sidérophore pyoverdine est considérée comme un facteur de virulence, soit par son action cytotoxique directe, soit par la stimulation de la production de facteurs de virulence impliqués dans l'apoptose cellulaire ou la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (Dell'Anno *et al.*, 2022).

1.2 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida est une souche environnementale saprophyte retrouvée dans la plupart des sols et eaux tempérées mais tout particulièrement dans les sols pollués. En effet, de par ses activités métaboliques, la souche est capable d'utiliser un grand nombre de sources de carbone différentes, comme des sucres simples ou des composés aromatiques et est capable de dégrader notamment des dérivés de la lignine (Nikel *et al.*, 2016). Grâce à ces activités, elle est décrite comme participant au maintien de la qualité de l'environnement (Timmis, 2002). La souche présente un métabolisme versatile, se développe en aérobiose et ne forme pas de spore. Sa température optimale de croissance est située entre 25 et 30 °C.

Il existe de nombreuses souches de *P. putida* dans l'environnement, possédant toutes un génome de plus de 6 millions de pb. *P. putida* KT2440 possède par exemple, 5592 séquences codantes (CDS) annotées mais dont 1/5ème code pour des protéines non caractérisées ou de fonction inconnue (Belda *et al.*, 2016). Ce travail de thèse porte sur la souche *P. putida* KT2440, nommée KT2440 dans le reste du manuscrit, qui est une souche dérivée de la souche *P. putida* mt-2 (Williams and Murray, 1974), précédemment nommée *P. arvilla* mt-2. Contrairement à la souche mt-2, la souche KT2440 ne possède plus le plasmide TOL pWWO conférant une capacité à dégrader le toluène.

La comparaison du génome de KT2440 à celui de PAO1 indique que 85 % des séquences codantes sont similaires (Nelson *et al.*, 2002). Cependant, en comparaison avec les génomes de PAO1 et celui de *P. syringae*, KT2440 ne possède aucun gène codant pour une pathogénicité envers les plantes ou

les animaux. Par exemple, les gènes de PAO1 codant pour les facteurs de virulence ne sont pas retrouvés chez KT2440 (Silby *et al.*, 2011). Ainsi, cette souche est la première souche issue du sol à être qualifiée, en 1982, comme sans danger par le Recombinant DNA Advisory Committee, faisant d'elle une souche de choix pour l'analyse, le clonage et l'expression de gènes chez les bactéries à Gram négatif (Timmis, 2002). La souche est présente également au niveau de la rhizosphère de nombreuses plantes, comme le maïs, le blé, la fraise ou la canne à sucre et est ainsi utilisée pour développer de nouveaux biopesticides (Timmis, 2002). De plus, grâce à ses 350 transporteurs de membrane externe et cytoplasmiques (15 % de plus que PAO1) dédiés à l'absorption et l'efflux d'une large gamme de substrats ainsi que ses nombreux gènes potentiellement dédiés à la transformation de composés aromatiques non impliqués dans son métabolisme, KT2440 est une souche très intéressante pour le développement de procédés de bioremédiation. Elle est notamment impliquée dans le développement de nombreuses applications biotechnologiques comme la production d'intermédiaires pour la synthèse chimique, le développement de nouvelles voie d'élimination des polluants ou encore l'amélioration de la qualité des combustibles fossiles par désulfuration (Nelson *et al.*, 2002; Nikel *et al.*, 2016; Silby *et al.*, 2011; Timmis, 2002). C'est notamment grâce à ces caractéristiques remarquables que nous avons décidé de nous intéresser à KT2440 pour le développement de notre procédé de bioremédiation de déchets amiantés.

2 L'acquisition du fer chez les *Pseudomonas*

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croute terrestre, s'imposant ainsi comme essentiel à la survie et à la croissance de nombreux organismes dont les bactéries, à l'exception des lactobacilles ou encore de *Borrelia burgdorferi* (Posey and Gherardini, 2000; Weber *et al.*, 2006; Weinberg, 1997). Cet élément a la particularité de pouvoir changer d'état d'oxydation, pouvant aller de l'état (0) jusqu'au Fe(VI), ce qui en fait un métal de choix dans les processus utilisant le transfert d'électrons (Sánchez *et al.*, 2017). Il est ainsi impliqué dans la respiration cellulaire, la photosynthèse et l'activité des cytochromes. Des enzymes impliqués dans la synthèse ou la réparation de l'ADN comme les ribonucléotides réductases, les hélicases ou les nucléases utilisent le fer comme cofacteur (Puig *et al.*, 2017). Paradoxalement, malgré le rôle majeur joué par le fer dans les processus

biologiques, à pH neutre et en condition aérobie, le fer ferreux Fe(II) est très peu biodisponible puisqu'oxydé en fer ferrique Fe(III) qui, en présence d'eau, forme des hydroxydes de Fe(III) insolubles. Le Fe(II), plus facilement assimilable pour les organismes, n'est alors soluble qu'en condition anaérobie et en milieu réducteur.

De plus, cet élément présente une toxicité non négligeable pour les organismes puisqu'il catalyse la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\cdot$) entrainant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS vont alors interagir avec l'ADN, entrainant l'apparition de diverses mutations qui vont causer des dommages cellulaires irréversibles (Winterbourn, 1995). Les ROS peuvent aussi altérer les protéines *via* une oxydation des chaines latérales ou de la chaîne polypeptidique des acides aminés (Cabiscol *et al.*, 2000). Les lipides peuvent également être la cible des ROS qui vont alors entrainer une importante peroxydation, affectant la dynamique et la fluidité de la membrane (Zhang *et al.*, 2020).

Sachant que la croissance optimale des microorganismes, dont les *Pseudomonas*, nécessite une concentration en fer de l'ordre de 10^{-6} M et que la concentration en fer bio-disponible est d'environ 10^{-18} M, ces derniers ont dû développer des mécanismes d'acquisition du fer diversifiés pour subvenir à leurs besoins (Braun and Killmann, 1999; Raymond and Carrano, 1979). Ces différents mécanismes sont présentés ci-dessous.

2.1 Utilisation de l'hème

L'hème, molécule indispensable au bon fonctionnement des cellules, représente une des sources de fer les plus abondantes dans le corps humain (Worwood, 2012). L'utilisation de l'hème est donc une stratégie développée par les bactéries, plutôt dans un cadre infectieux, notamment celui de la mucoviscidose (Nguyen *et al.*, 2014). Ainsi ce paragraphe traitera uniquement des systèmes d'acquisition de l'hème chez *P. aeruginosa.*

Deux des systèmes sont définis par une acquisition directe de l'hème *via* deux transporteurs externes indépendants de la famille des transporteurs TonB-dépendants (TBDT) puis *via* un transporteur ABC commun situé sur la membrane interne (Cornelis and Bodilis, 2009; Ochsner *et al.*, 2000; Smith and Wilks, 2015). Afin d'exploiter l'hème dans l'environnement extracellulaire, *P. aeruginosa* est également capable de produire des hémophores, protéines capables de se lier à

l'hème de l'hôte puis d'être reconnues par un TBDT qui va extraire l'hème du complexe et permettre son passage dans le périplasme puis dans le cytoplasme (O'Neill and Wilks, 2013; Smith and Wilks, 2015). A ma connaissance, aucun de ces trois systèmes n'a été décrit chez *P. putida.*

2.2 Utilisation du fer ferreux

Bien que peu présent dans les milieux extracellulaires, le Fe(II) représente tout de même une source accessible de fer pour les microorganismes. Cependant l'acquisition du Fe(II) n'est que peu décrite dans la littérature à ce jour. Le système le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif est le système FeoABC découvert chez *Escherichia coli* K12 (Caza and Kronstad, 2013; Hantke, 1987). Le Fe(II) diffuserait à travers la membrane externe à l'aide d'une porine puis serait transporté vers le cytoplasme à travers la membrane interne via la protéine FeoB, le tout régulé par la protéine FeoC (Lau *et al.*, 2016). Il n'existe pas, actuellement, de preuve expérimentale de l'existence de ce système chez *P. aeruginosa* ni chez *P. putida.* Cependant, on sait que *P. aeruginosa* est capable de sécréter des phénazines, telle que la pyocyanine, afin de réduire le fer ferrique en fer ferreux, le rendant ainsi plus accessible (Cornelis and Dingemans, 2013).

2.3 Production et utilisation des sidérophores

Afin de contourner ce problème de biodisponibilité du fer dans les différents environnements, les organismes sont capables de produire, d'excréter et d'utiliser des sidérophores, sidéro signifiant fer et phore signifiant transport en grec. Les sidérophores sont une classe de métallophores spécifiques du fer. Plus précisément, ce sont de petites molécules organiques de faible poids moléculaire (< 2500 Da) possédant une très forte affinité pour le fer ferrique, allant de 10^{23} à 10^{52} M^{-1} (Kraemer, 2004). Ces molécules sont produites par les microorganismes comme les champignons ou les bactéries mais aussi les plantes pour chélater le fer mais également d'autres métaux du milieu extracellulaire (Hider and Kong, 2010 ; Schalk *et al.*, 2011). Les premiers sidérophores, le ferrichrome chez les champignons ou la mycobactine chez les bactéries, furent identifiés dès les années 1950 (Francis *et al.*, 1953, 1949) et caractérisés quelques années plus tard (Garibaldi and Neilands, 1956). Plus de 70 ans plus tard, plus de 500 sidérophores de structures différentes ont été décrits

(Hider and Kong, 2010). Ces différents chélateurs sont ainsi produits par la cellule puis sécrétés dans le milieu extracellulaire où ils pourront chélater le Fe(III) libre ou lié à des molécules de moindre affinité comme l'illustre la **Figure 4**.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif telles que les *Pseudomonas*, les complexes ferri-sidérophores sont reconnus à leur surface par des transporteurs TonB dépendant (TBDT) spécifiques à chaque sidérophore. Une fois dans le périplasme, les complexes peuvent y délivrer le fer ou être transportés à travers la membrane interne pour libérer le fer dans le cytoplasme. Dans le premier cas de figure illustré en **Figure 4A**, le complexe peut être dissocié par réduction du Fe(III) en Fe(II) additionné ou non d'une modification enzymatique du sidérophore, permettant au Fe(II) libre d'être dégradé ou de rejoindre le cytoplasme et au sidérophore d'être dégradé ou recyclé *via* une pompe à efflux pour réaliser un nouveau cycle de chélation du Fe(III) (Hannauer *et al.*, 2010; Josts *et al.*, 2021; Perraud *et al.*, 2018). Le complexe ferri-sidérophore peut également être internalisé dans le cytoplasme via un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) (**Figure 4B**) ou une perméase (**Figure 4C**). Le complexe sera alors dissocié dans le cytoplasme, conduisant à la formation de fer (II) biodisponible pour la cellule (Schalk *et al.*, 2011).

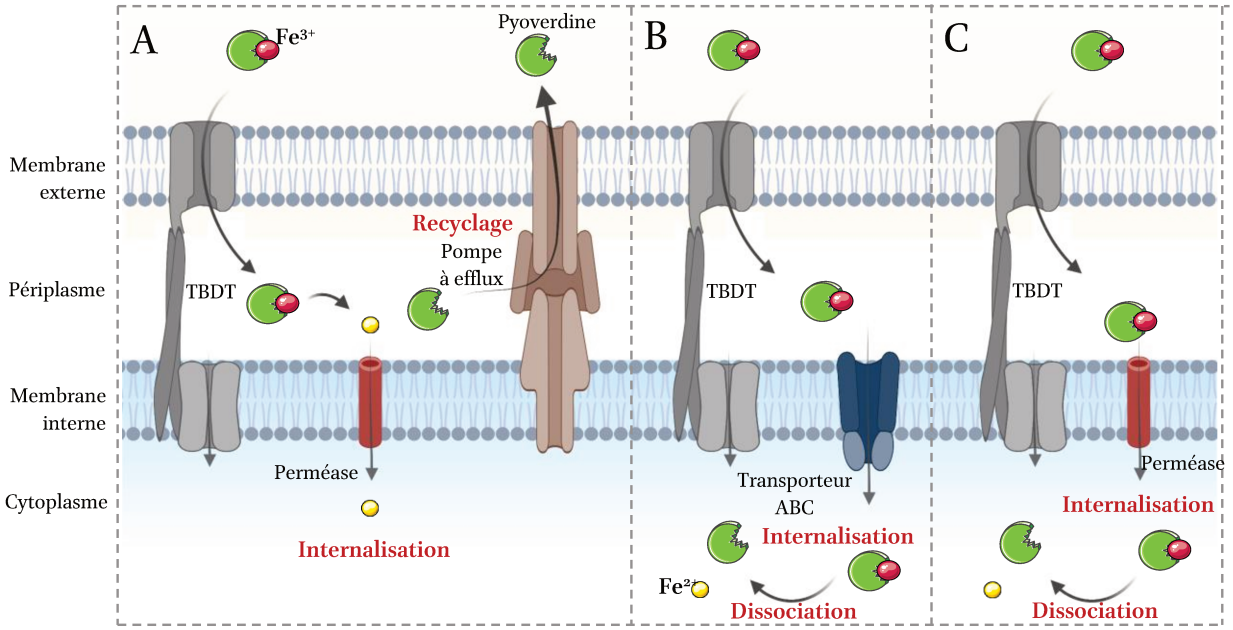


Figure 4 : Représentation schématique des différentes voies d'acquisition des sidérophores. Le sidérophore est représenté en vert, le Fe(III) en rouge et le Fe(II) en jaune (d'après Schalk *et al.*, 2011).

Les sidérophores sont classés en quatre catégories en fonction de leur groupement chélateurs du Fe(III) : les catécholates, les hydroxamates, les α-hydroxy-carboxylates et les 2-hydroxyphenyl-thia(oxa)zoline (Puja *et al.*, 2023). Pour illustrer la diversité, la **Figure 5** présente les différents groupements chélateurs dans lesquels deux sidérophores de chaque classe sont représentés.

En sidérophore de type α-hydroxy-carboxylates, nous pouvons citer l'achromobactine, produite par *Achromobacter*, ou encore le citrate. Parmi les hydroxamates, on trouve la desferrioxamine-E ou le ferrichrome par exemple, produit par des champignons du genre *Aspergillus* ou *Penicillium*. Parmi les sidérophores à groupement catécholate, on peut citer l'entérobactine produite par *Escherichia coli* ou *Salmonella thyphimurium*. Enfin, la classe des 2-hydroxyphenyl-thia(oxa)zoline contient, entre autre, la pyochéline produite par *P. aeruginosa* ou encore la yersiniabactine produite par certaines espèces de *Yersinia*. Un dernier groupe est composé de sidérophores mixtes comme c'est le cas de la pyoverdine produite par de nombreuses espèces de *Pseudomonas*.

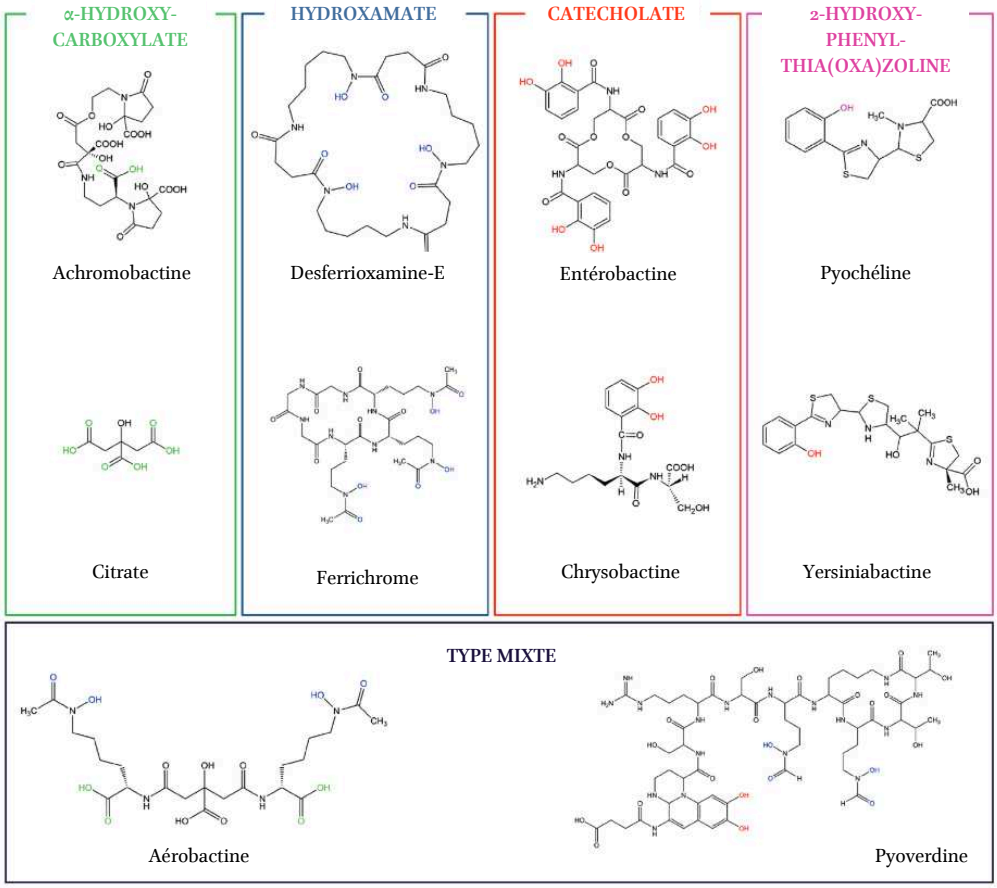


Figure 5 : Structures des sidérophores et groupements fonctionnels impliqués dans la chélation du fer. Chaque sidérophore est synthétisé par un ou plusieurs microorganismes bactérien ou fongique. Les groupements chélateurs sont en couleur (d'après Aznar and Dellagi, 2015).

La majorité des sidérophores représentés dans la **Figure 5** possède une structure hexadentate, c'est-à-dire que leur coordination optimale avec un atome de fer central se fait grâce à 6 liaisons. La **Figure 6** permet d'illustrer cette coordination grâce à la complexation du fer par les trois fonctions chélatrices bien que cette structure ne permette pas d'observer la courbure que prendrait naturellement la pyoverdine lors de la réaction. D'autres structures de coordination peuvent également exister comme les tridentate (pyochéline) ou encore les tétradentate (yersiniabactine) (Hider and Kong, 2010).

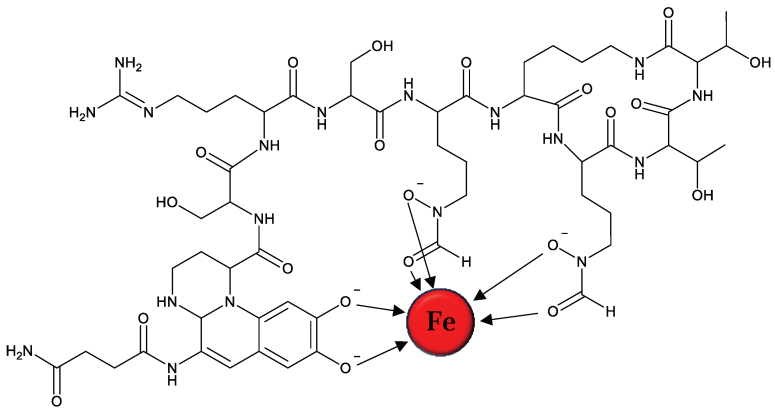


Figure 6 : Coordination hexadentate de la pyoverdine de PAOI avec un atome de fer

2.3.1 Les sidérophores endogènes

Nous allons désormais nous intéresser aux différents sidérophores produits par les *Pseudomonas,* et notamment à la pyoverdine, sidérophore commun à *P. aeruginosa* et à *P. putida.*

2.3.1.1 Les pyoverdines produites par les *Pseudomonas*

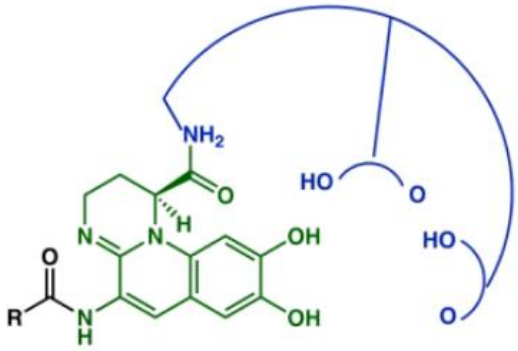
Les pyoverdines (PVD) au sens large représentent une famille de pigments produits par les *Pseudomonas* fluorescents dont font partie *P. aeruginosa* et *P. putida*. Décrites dès 1892 sous le nom de fluorescines, elles furent renommées pyoverdine en 1941 mais ne furent réellement caractérisées que dans la fin des années 1970. Deux études ont en effet permis de mettre en évidence leur capacité de chélation du fer et leur importance dans son acquisition par les cellules à travers un mécanisme énergie-dépendant (Meyer and Abdallah, 1978; Meyer and Hornsperger, 1978; Schalk *et al.*, 2020).

Les PVDs sont composées de 3 parties, illustrées en **Figure 7 :**

- un chromophore dérivé de la quinolone qui reste identique la plupart du temps d'une PVD à l'autre et confère la couleur jaune/verte et la fluorescence caractéristique

- une chaîne peptidique de séquence et de longueur variables (entre 6 et 12 acides aminés), spécifique à chaque espèce et ainsi responsable de leur sélectivité vis-à-vis des TBDT. La chaîne peptidique est liée à la position C1 du chromophore

- une chaîne latérale en position C3 du chromophore, composée d'un diacide variable provenant du cycle de Krebs, par exemple le succinamide, le succinate, le malate, le glutamate ou encore l'α-cetoglutarate



succinamide : R = $CH_2CH_2CONH_2$
succinique : R = CH_2CH_2COOH
α- cetoglutarique : R = $CO\text{-}CH_2CH_2COOH$

Figure 7 : Structure générale des pyoverdines. Le chromophore est représenté en vert, la chaine latérale en noir et la chaîne peptidique en bleu (d'après Schalk *et al.*, 2020)

Cette diversité a conduit au développement du sidérotypage, une méthode de classification des *Pseudomonas* basée sur la séquence des chaines peptidiques et la nature de la chaîne latérale des PVD qu'ils produisent (Meyer *et al.*, 2008). Cette différence a pour conséquence de conférer aux PVDs des points isoélectriques différents, permettant de les séparer par focalisation isoélectrique. Cette technique a ensuite permis d'identifier une centaine de PVDs produites par les *Pseudomonas* fluorescents (Meyer, 2010).

Les PVDs possèdent une très forte affinité pour le fer ferrique (10^{24} M^{-1} pour la pyoverdine PVDI produite par PAO1) qu'elles chélatent avec une stœchiométrie de 1. Chez *P. aeruginosa*, 4 types de PVD (PVDI à PVDIV) ont été décrits, caractérisés par des chaînes peptidiques différentes (Meyer *et al.*, 1997; Ruangviriyachai *et al.*, 2001). Ce manuscrit ne s'intéressant qu'à la souche *P. aeruginosa* PAO1, ce paragraphe ne concerne que la PVDI produite par PAO1, dont la séquence de la chaîne

peptidique est Ser-Arg-Ser-FoOHOrn-[Lys-FoOHOrn-Thr-Thr] et dont la structure est illustrée en **Figure 8A** (Schalk *et al.*, 2020).

En 2008, grâce à la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse, Meyer *et al.* publient un article faisant un inventaire des différentes PVDs des *Pseudomonas* (Meyer *et al.*, 2008), cependant, le nombre de publications dédiées à l'étude de la diversité des PVDs produites par *P. putida* est beaucoup plus réduit. En 1997, deux isoformes de PVD (G4R et G4RA) sont identifiés chez *P. putida* G4R (Salah El Din *et al.*, 1997). En 2009, Matthijs *et al.* affirment que la souche KT2440 ne produit qu'une seule forme de PVD dont la séquence peptidique est la suivante : Asp–Orn–(OHAsp-Dab)–Gly–Ser–cOHOrn (Matthijs *et al.*, 2009). Cependant, en 2017, l'équipe de Baune *et al.* analyse de nouveau le surnageant de culture de KT2440 et met en avant la présence des deux isoformes identifiées par Salah El Din, avec un isoforme majoritaire correspondant à la forme identifiée par Matthijs (Baune *et al.*, 2017). La différence entre les deux isoformes serait uniquement due au groupement R de la chaîne radicale qui varierait selon les conditions de culture. La structure de la PVD de KT2440 est représentée en **Figure 8B**.

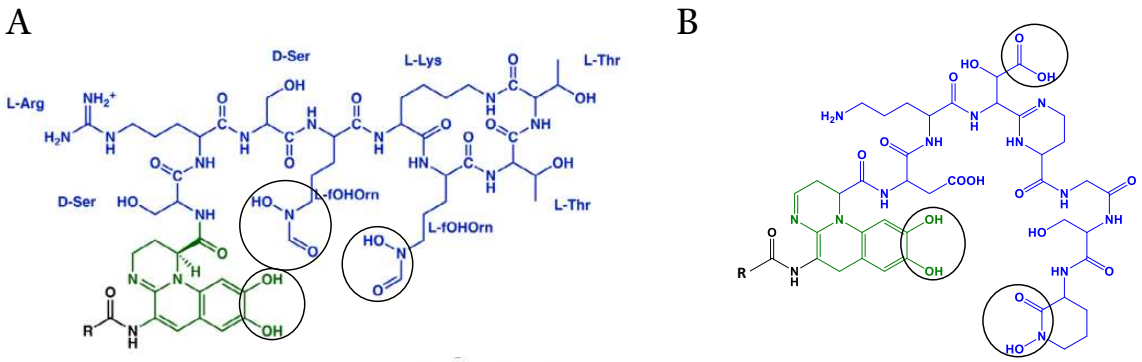


Figure 8 : Structure des pyoverdines produites par PAO1 (A) et KT2440 (B). Le chromophore est représenté en vert, la chaîne peptidique en bleu et la chaîne radicale en noire. Les groupements chélateurs sont entourés en noir (d'après Schalk *et al.*, 2020 (A) et Baune *et al.*, 2017 (B))

Les groupements chélateurs de la PVD permettent une coordination hexadentate entre le sidérophore et le fer, lui conférant ainsi des capacités de mobilisation du fer. L'internalisation du fer extracellulaire représente le rôle principal de la PVD. Cependant, au-delà de son rôle dans la chélation du fer, la PVD joue aussi un rôle très important dans l'infection et la colonisation de l'hôte

chez les espèces pathogènes de *Pseudomonas*. En effet, de par son affinité élevée pour le fer, la PVD confère un avantage certain au pathogène lors de la compétition pour le fer avec l'hôte, en complément de l'utilisation de l'hème et/ou des hémoprotéines. La PVD est également capable d'utiliser le fer séquestré par les protéines de l'hôte comme la transferrine ou la lactoferrine (Dell'Anno *et al.*, 2022). Dans le cas de PAO1, la production de PVD est corrélée avec sa pathogénicité dans des modèles d'infection aiguë (Damron *et al.*, 2016). De plus, la PVD est également nécessaire pour la formation d'un biofilm mature par la souche *via* l'acquisition du fer, et inversement, la molécule du quorum-sensing PqsA serait nécessaire pour la production du PVD de façon dépendante du biofilm, sous-entendant ainsi une régulation bidirectionnelle entre les deux éléments (Kang *et al.*, 2018; Visca *et al.*, 2007). Enfin, la PVD joue un rôle direct dans la virulence de PAO1, à la fois en stimulant la production de l'exotoxine A et de la protéase PrpL mais également en exerçant une cytotoxicité sur l'hôte grâce à la séquestration du fer, conduisant à des dommages mitochondriaux ainsi qu'une hypoxie dans un modèle d'infection chez *Caenorhabditis elegans* (Dell'Anno *et al.*, 2022).

La sécrétion des sidérophores n'est pas toujours associée à la pathogénicité mais peut, par exemple, être bénéfique pour la santé des plantes. Des souches de *Pseudomonas*, appelée PGPR, sont impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes et la lutte contre les maladies végétales. Cela est corrélé à leur capacité de produire des sidérophores permettant de réduire la biodisponibilité du fer pour les pathogènes, mais aussi à une augmentation de la phytoextraction de métaux par les plantes en présence des bactéries (Bakker *et al.*, 2007; Cornu *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Autres sidérophores endogènes

La PVD représente un des sidérophores produit par les *Pseudomonas* fluorescents mais ces souches sont aussi capables de produire d'autres sidérophores, appelés parfois, à tort, sidérophores secondaires à cause de leur plus faible affinité pour le fer. Ces sidérophores semblent avoir plusieurs rôles à jouer dans les systèmes biologiques. Leur premier rôle est, comme pour la PVD, lié à l'acquisition du fer. Leur synthèse est moins énergivore car nécessitant l'expression de moins de gènes que pour la PVD par exemple. Ces sidérophores présentent des propriétés anti-fongique, induisent des mécanismes de défense chez les plantes ou encore participent à la dégradation de

certains composés chimiques ou biologiques (Audenaert *et al.*, 2002; Matthijs *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2006). Si on prend pour exemple nos deux bactéries d'intérêt, PAO1 est capable de produire de la pyochéline mais KT2440 ne produit aucun autre sidérophore. Cependant, certaines espèces de *P. putida* telle que DSM 3601 sont capables de produire de la pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) (PDTC) (**Figure 9**) (Leach *et al.*, 2007).

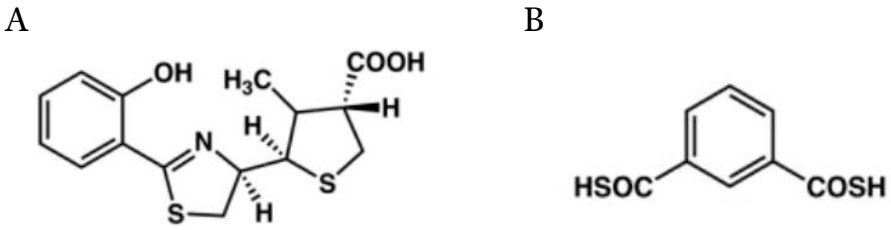


Figure 9 : Sidérophores secondaires produits par *P. aeruginosa* PAO1(A) et *P. putida* DSM 3601 (B)

2.3.2 Utilisation de sidérophores exogènes

Les *Pseudomonas* étant des organismes ubiquitaires, ils peuvent coloniser des niches écologiques variées comme les eaux ou les sols mais également les plantes ou les animaux. De plus, dans un contexte infectieux, *P. aeruginosa* va devoir lutter, pour l'accès au fer, à la fois contre l'hôte mais également contre d'autres microorganismes, parfois producteurs de sidérophores et donc entrer en compétition avec eux pour l'acquisition du fer essentiel à leur survie. Afin d'économiser de l'énergie, certaines bactéries sont ainsi capables d'utiliser les sidérophores produits par d'autres microorganismes. Ces sidérophores sont appelés exosidérophores et peuvent être produits par d'autres *Pseudomonas* mais également d'autres bactéries ou champignons (Cornelis and Bodilis, 2009).

P. aeruginosa, étant connue pour l'expression d'un large éventail de TBDT en fonction des conditions, elle est ainsi capable d'utiliser une dizaine de sidérophores exogènes comme l'entérobactine (*E. coli*), le ferrichrome (*Aspergillus*), la mycobactine (*Mycobacteriium*) ou encore le schizokinen (*Bacillus subtilis*)(Perraud *et al.*, 2020). Concernant *P. putida*, il a été montré que la souche BTP1 serait capable d'utiliser un large spectre de PVDs exogènes de structures différentes grâce à de nombreux récepteurs probablement exprimés de façon constitutive à sa membrane externe (Ongena *et al.*, 2002). Cela peut être dû au fait que cette souche soit connue pour être une

colonisatrice persistante de la rhizosphère, entrant régulièrement en compétition pour le fer. *P. putida* WCS 358 semble, elle, capable d'utiliser le ferrichrome (Jurkevitch *et al.*, 1992). Concernant *P. putida* KT2440, elle semble capable de n'utiliser que sa propre PVD ainsi que celle produite par *P. syringae* LMG 1247 (Matthijs *et al.*, 2009).

3 Le système pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*

Le système PVD englobe à la fois la biosynthèse de la PVD, son export puis son import et également toute la régulation sous-jacente. Le système le mieux décrit dans la littérature est celui de PAO1. Le système PVD de KT2440 étant peu décrit dans la littérature, une comparaison sera réalisée avec le système de PAO1 afin d'essayer de mettre en avant les points communs et les divergences des deux espèces.

3.1 La biosynthèse de la pyoverdine

Le système de la pyoverdine PVDI chez PAO1 est le mieux caractérisé et la majorité des gènes a été identifiée et caractérisée. Seuls quelques zones d'ombres subsistent concernant la libération du fer dans la cellule même si quelques hypothèses ont été suggérées ces dernières années (Bonneau *et al.*, 2020).

3.1.1 Chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Le précurseur de la PVD est synthétisé *via* 4 peptides synthétases non ribosomales (NRPS) (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) qui vont, par un assemblage de différents acides aminés, former la chaîne peptidique présentée en **Figure 10** (Gasser *et al.*, 2015; Schalk *et al.*, 2020). Les NRPS sont définies comme des enzymes multimodulaires permettant de synthétiser, par voie non ribosomale, des peptides par ajout successif d'acides aminés spécifiques, à raison d'un acide aminé par module (Visca *et al.*, 2007). Chaque module est lui-même composé d'au moins 3 domaines (adénylation (A), thiolation (P(CP)) et condensation (C)). Au sein de chaque module, le domaine A permet l'activation d'un acide aminé par une réaction d'adénylation. L'acide aminé est ainsi transféré au domaine de

thiolation qui permet de le lier de façon covalente à un thiol libre présent sur un cofacteur du domaine. Cela permet au peptide de rester fixé durant tout le processus d'élongation. Ensuite, le domaine de condensation permet la formation de la liaison peptidique ainsi que le transfert du peptide en formation sur l'acide aminé fixé au domaine d'adénylation du module suivant. Enfin, une thioestérase (TE) permet de cliver la liaison thioester entre le peptide et le cofacteur du dernier module afin de libérer le peptide néosynthétisé.

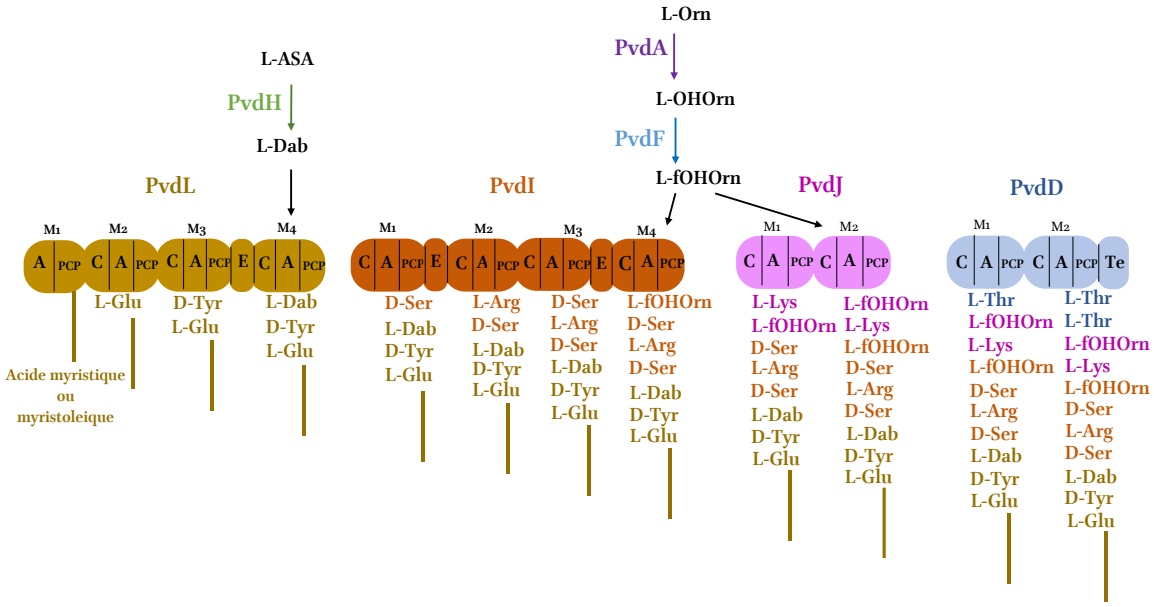


Figure 10 : NRPS impliquées dans la biosynthèse du précurseur de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* PAO1. Chaque NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) est divisé en plusieurs modules (M1 à M4) comportant chacun un domaine de condensation (C), un domaine d'acétylation (A) et un domaine de thiolation (PCP). PvdL et PvdI sont en plus pourvus d'un domaine d'épimérisation (E) et PvdD d'un domaine thioestérase (Te) pour la libération du peptide néosynthétisé. Les acides aminés incorporés dans la chaîne sont indiqués sous chaque module (d'après Schalk *et al.*, 2020).

Les NRPS sont très variables d'un *Pseudomonas* à l'autre et seule PvdL est commune à toutes les souches (Ravel and Cornelis, 2003). Cette NRPS va permettre d'incorporer un acide myristique ou myristoléique puis 3 acides aminés (Schalk *et al.*, 2020). Certains acides aminés sont des acides aminés non protéinogènes (Mossialos *et al.*, 2002). L'acide myristique ou myristoléique va alors constituer une chaîne grasse permettant l'ancrage du précurseur dans la membrane cytoplasmique ainsi que l'ajout des acides aminés suivant dans la chaîne peptidique. Le L-Tyr et L-Dab incorporés vont permettre de former le chromophore de la PVD, non cyclique à ce stade de la synthèse

(**Figure 10**). Le peptide précurseur de la PVD est synthétisé puis transporté dans le périplasme via le transporteur de type ABC (ATP Binding Cassette) PvdE (**Figure 11**). Le précurseur de la PVD est alors maturé grâce à l'intervention de 5 enzymes nommées PvdM à PvdQ (Lamont and Martin, 2003). Dans un premier temps, l'hydrolase PvdQ permet la déacétylation du précurseur, conduisant au clivage de la chaîne grasse permettant d'obtenir un précurseur appelé ferribactine (Clevenger *et al.*, 2017; Hannauer *et al.*, 2012). PvdP va alors catalyser les premières étapes de cyclisation du chromophore permettant la formation de la dihydropyoverdine qui sera alors oxydée en PVD par PvdO (Nadal-Jimenez *et al.*, 2014; Ringel *et al.*, 2018; Ringel and Brüser, 2018). PvdN est quant à lui impliqué dans la modification de la chaîne du précurseur de la PVD. En effet, le précurseur est formé des résidus L-Tyr et L-Dab formant le chromophore ainsi que du L-Glu converti en succinamide, succinate ou α-cétoglutarate grâce à PvdN (Ringel *et al.*, 2016). A l'heure actuelle, le rôle de PvdM n'a pas encore été défini.

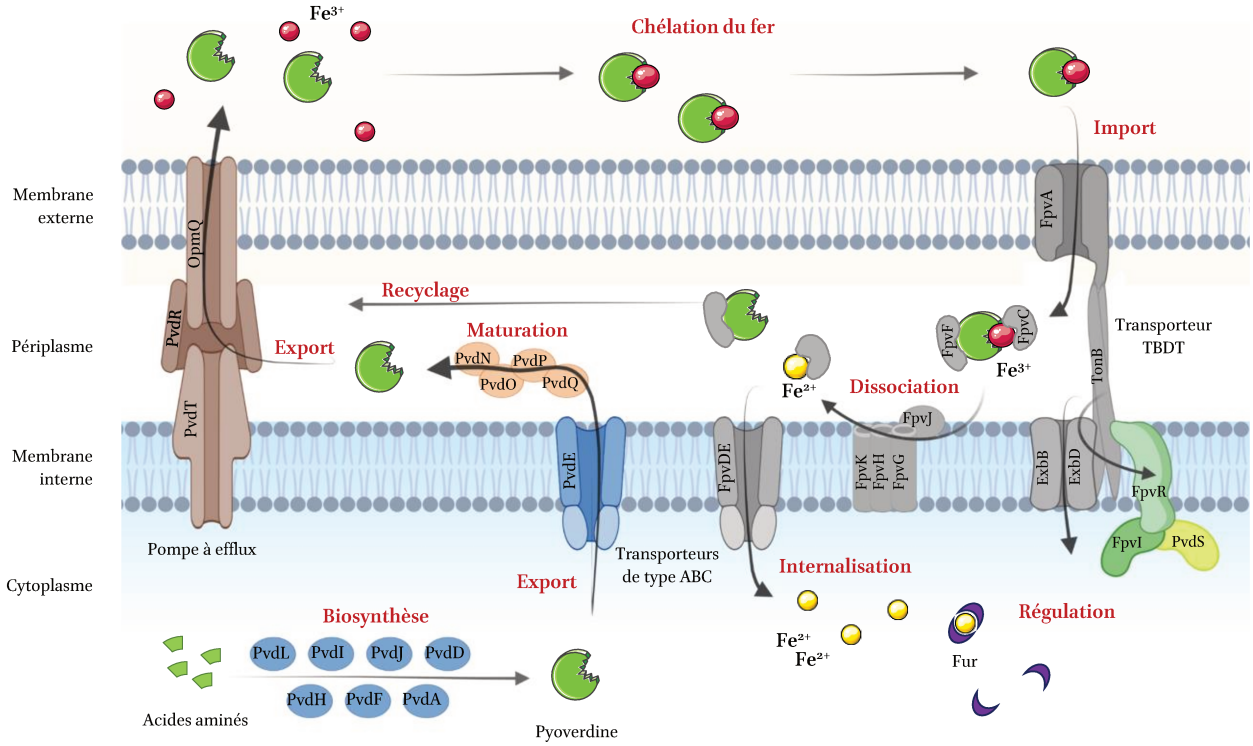


Figure 11 : Représentation schématique du système pyoverdine chez PAO1. Les éléments impliqués dans des fonctions similaires, hors pyoverdine et fer, sont représentés dans la même couleur (bleu : biosynthèse ; vert : régulation *via* FpvI ; jaune : régulation *via* PvdS ; brun : export ; orange : maturation ; gris : import)

Une fois mature, la PVD est sécrétée dans le milieu extracellulaire majoritairement grâce au système d'efflux PvdRT-OmpQ (Hannauer *et al.*, 2012). Elle chélate alors le Fe(III) avec une forte affinité, formant ainsi le complexe ferri-pyoverdine. Ce complexe est alors reconnu par le TBDT FpvA situé sur la membrane externe, afin d'être internalisé dans le périplasme (Poole *et al.*, 1993). Ce transporteur est formé d'un large tonneau β (formé d'un assemblage de 22 brins β), d'un bouchon (constitué de 4 feuillets β formant un domaine globulaire), de la boîte TonB en interaction avec ExbB et ExbD ainsi que d'un domaine de signalisation en interaction avec le régulateur FpvR situé sur la membrane interne (Brillet *et al.*, 2007). L'équipe de Ghysels *et al.* a également mis en évidence la présence d'un deuxième TBDT transporteur nommé FpvdB et semblable à FpvA (Chan and Burrows, 2022; Ghysels *et al.*, 2004).

Une fois dans le périplasme, le complexe est pris en charge par FpvC et FpvF, deux protéines cytoplasmiques, pour former un complexe FpvC-FpvF-PVDI-Fe (Bonneau *et al.*, 2020). Le Fe(III) est alors réduit en Fe(II) grâce à la réductase FpvG du complexe FpvGHJFC puis le Fe(II) est pris en charge par FpvC puis internalisé dans le cytoplasme par le transporteur ABC FpvDE (Bonneau *et al.*, 2020; Brillet *et al.*, 2012). Le rôle des protéines FpvH, J et K n'est, à l'heure actuelle, pas encore connu. L'apo-pyoverdine (PVD débarrassée du fer), pourra être sécrétée dans le milieu extracellulaire *via* FpvF pour rejoindre la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Bonneau *et al.*, 2020) et réaliser un nouveau cycle de chélation du Fe(III) (Greenwald *et al.*, 2009).

3.1.1 Chez *Pseudomonas putida* KT2440

Dans le génome de *P. putida* KT2440, on retrouve les gènes codants pour PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD, les 4 NRPS impliquées dans la biosynthèse du précurseur de PVDI chez PAO1, permettant d'incorporer, chez KT2440, les acides aminés suivants : Asp–Orn–(OHAsp-Dab)–Gly–Ser–cOHOrn. Malgré la similarité des NRPS impliquées, les acides aminés composants le précurseur de la PVD de KT2440 sont très différents de ceux de PAO1 comme l'illustre la **Figure 12.**

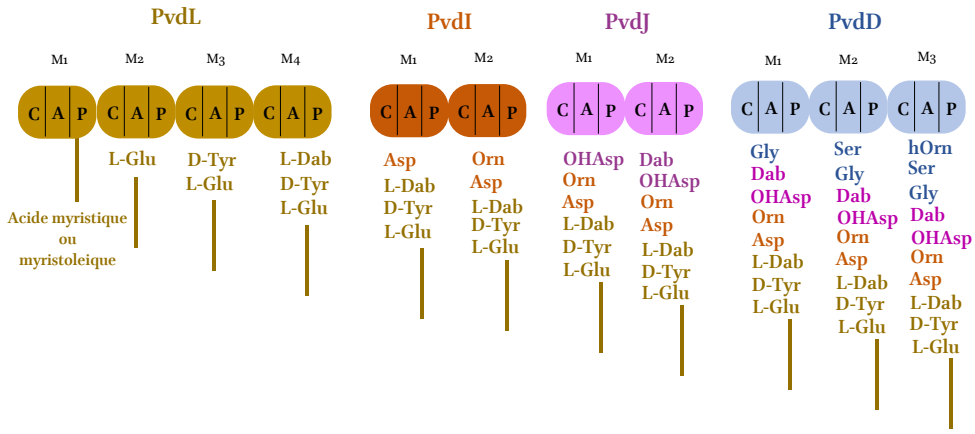


Figure 12 : NRPS impliquées dans la biosynthèse du précurseur de la pyoverdine chez *P. putida* KT2440. Chaque NRPS (PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD) est divisé en plusieurs modules (M1 à M4) comportant chacun un domaine de condensation (C), un domaine d'acétylation (A) et un domaine de thiolation (P). Les acides aminés incorporés dans la chaîne sont indiqués sous chaque module.

Par alignements de séquences, la quasi-totalité des gènes impliqués dans le système PVD chez PAO1 et illustrés en **Figure 13** a été annoté dans le génome de KT2440 (Winsor *et al.*, 2016). Cependant, aucune caractérisation moléculaire n'a été réalisée, permettant de confirmer leur activité. Il a néanmoins été démontré que chez KT2440, la sécrétion de la PVD dans le milieu extracellulaire peut se faire *via* deux pompes à efflux, PvdRT-OpmQ et MdtABC-OpmB, contrairement à PAO1 où seule PvdRT-OpmQ est présente. De plus, au moins un autre système semble également impliqué dans la sécrétion car la délétion de ces deux systèmes ne supprime pas totalement la sécrétion de PVD (Henríquez *et al.*, 2019).

Concernant l'import du complexe ferri-pyoverdine, KT2440 possède également dans son génome le gène codant pour le transporteur FpvA ainsi que pour la machinerie TonB-ExbB-ExbD, supposant un fonctionnement identique à celui de PAO1. La souche présentant également le complexe FpvKHGJ, la libération du fer au sein du périplasme semble également se faire *via* un mécanisme de réduction du Fe(III) en Fe(II) afin que celui-ci puisse être internalisé dans le cytoplasme et que la PVD puisse ainsi réaliser un nouveau cycle de chélation du fer.

3.2 Organisation des gènes impliqués dans le système pyoverdine

Une étude comparative de l'organisation des gènes impliqués dans les systèmes PVD de PAO1 et KT2440 a été réalisée par l'équipe de Ravel *et al.* en 2003 et mis à jour par l'équipe. Comme expliqué précédemment, presque tous les gènes identifiés chez PAO1 ont été identifiés et annotés chez KT2440 (Ravel and Cornelis, 2003). La **Figure 13** résume le contexte génétique du système PVD chez PAO1 et chez KT2440 et illustre les différences d'organisation génétique chez les deux espèces. Par exemple, la région PVD des deux souches est dispersée dans l'ensemble du génome, formant deux locus chez PAO1 et trois chez KT2440. Les locus sont ainsi séparés les uns des autres par des séquences d'ADN de taille variable (Ravel and Cornelis, 2003). De plus, au-delà d'une différence de localisation des gènes dans le génome, l'organisation des gènes et de certains opérons est différente d'une souche à l'autre. Par exemple, tout l'opéron impliqué dans la dissociation du complexe ferri-pyoverdine chez PAO1 est situé dans la région voisine de *pvdI*. A l'inverse, il se trouve dans un cluster à part entière chez KT2440 bien que les gènes de l'opéron suivent toujours le même ordre.

Une telle différence organisationnelle nous laisse également penser que la régulation du système PVD chez KT2440, très peu décrite dans la littérature, est différente de celle identifiée chez PAO1. Par exemple, les régulateurs FpvI et FpvR, cruciaux chez PAO1, ne sont, à l'heure actuelle, pas bien identifiés chez KT2440. Bien que l'existence du gène PP_3555 codant pour FpvR chez KT2440 soit suggéré, aucune évidence ne nous permet d'affirmer qu'il s'agit bien de ce régulateur (Llamas *et al.*, 2014). A l'opposé, son importance n'est plus à démontrer chez PAO1 puisqu'il permet de réguler la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PVD. FpvI, quant à lui, est uniquement annoté comme un facteur sigma à fonction extracytoplasmique chez KT2440 (Llamas *et al.*, 2014).

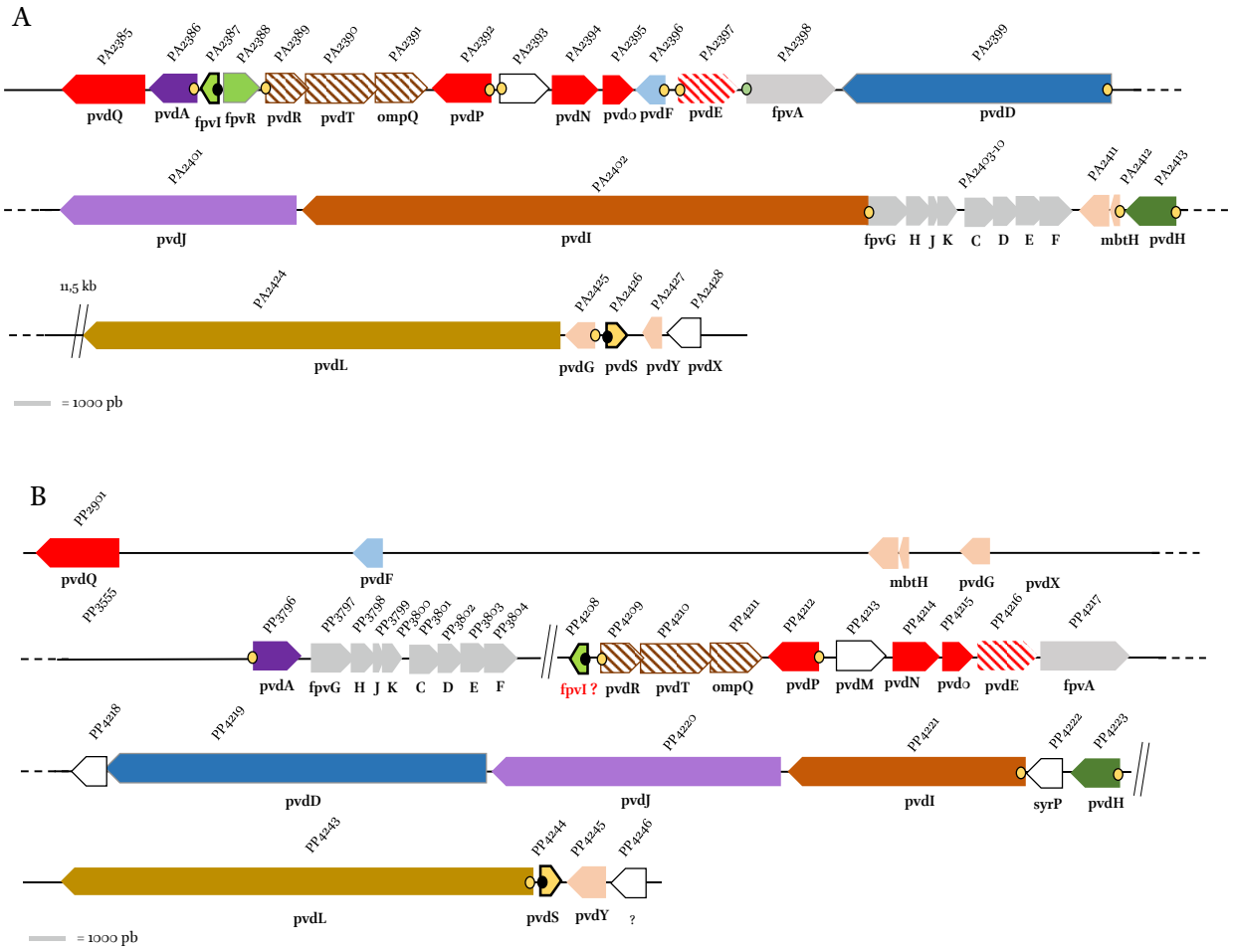


Figure 13 : Contexte génétique du système pyoverdine chez *P. aeruginosa* PAO1 (A) (d'après Schalk 2020) **et chez *P. putida* KT2440** (B). Les encadrés colorés bleus, violets, rouges et bruns représentent les gènes codant pour des enzymes impliqués dans la biosynthèse de la PVD. Les encadrés hachurés représentent les gènes codant pour les transporteurs de la PVD. Les encadrés grises représentent les gènes impliqués dans l'import de fer via la PVD (importation du complexe ferri-PVD et libération du fer). Les encadrés blancs sont pour les gènes codant pour les protéines de fonction inconnue. Les gènes codant les régulateurs transcriptionnels sont encadrés en noir. Les gènes sont représentés selon leur taille. Les doubles lignes verticales représentent une interruption dans le génome de la longueur indiquée.

3.3 Régulation du système pyoverdine

L'expression de la voie PVD chez *P. aeruginosa* est soumise à une régulation très fine faisant intervenir 3 acteurs principaux : les facteurs sigma (σ) FpvI et PvdS et leur facteur anti-sigma FpvR. L'expression de ces 3 protéines est elle-même régulée par le régulateur Fur.

3.3.1 Par les facteurs sigma/anti sigma

Les facteurs σ sont des sous-unités de l'ARN polymérase permettant la reconnaissance du promoteur des gènes sous leur dépendance et donc l'initiation de leur transcription. PvdS et FpvI appartiennent au groupe des facteurs σ à fonction extracytoplasmique (ECF) qui est le plus grand groupe de facteurs σ bactériens et qui appartient à la famille des facteurs RpoD (σ^{70}) (Helmann, 2002). Cette famille est capable de reconnaitre la séquence TTGACA située à - 35 bp du site d'initiation de la transcription ainsi que la séquence TATAAT (aussi appelée TATA box) située à - 10 bp du site d'initiation. Il a été montré que les organismes capables de vivre dans des environnements divers et variés possédaient plus de facteurs σ ECF que les autres. En effet, ces facteurs sont capables de réguler, en réponse à des stimuli extracytoplasmiques, l'expression de gènes impliqués dans diverses fonctions comme la réponse au choc-thermique, la pathogénicité, la réponse aux métaux toxiques ou encore au stress oxydatif (Helmann, 2002; Staroń *et al.*, 2009). Au total, PAO1 et KT2440 possèdent chacun 19 ECF au sein de leur génome (Visca *et al.*, 2002).

Au sein du groupe des ECF se trouve la sous-famille des facteurs σ répondant à la privation de fer, appelés IS (Iron Starvation) dont font partie PvdS et FpvI ainsi que 12 autres facteurs chez PAO1 (Visca *et al.*, 2002). Ces facteurs IS répondent à des situations de carence en fer intracellulaire mais également à la présence de sidérophores. Ils sont régulés par leurs facteurs anti-σ respectifs *via* une cascade de signalisation activée par l'internalisation d'un sidérophore et contrôlant ainsi leur interaction avec le core de l'ARN polymérase. Leur nombre important chez PAO1 reflète la capacité de cette souche à utiliser une grande diversité de chélateurs de fer dans l'environnement mais également chez l'homme lors d'une infection (Visca *et al.*, 2002).

Lorsque PAO1 se trouve dans une situation de carence en fer, FpvR se trouve ancré dans la membrane cytoplasmique de la cellule et piège les facteurs σ PvdS et FpvI les rendant ainsi inactifs. Lors de l'interaction entre le complexe ferri-pyoverdine et le transporteur FpvA, un signal est transmis à la machinerie TonB, permettant l'import du complexe. Cet import aura pour conséquence de déplacer le domaine de signalisation de FpvA qui va alors interagir avec le domaine périplasmique de FpvR et entrainer sa protéolyse *via* la protéase RseP (Ringel and Brüser, 2018). Les facteurs σ PvdS et FpvI seront ainsi libérés et pourront alors recruter l'ARN polymérase afin d'initier la transcription des gènes impliqués dans la voie PVD (Llamas *et al.*, 2014). PvdS va alors permettre

l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PVD représentés en **Figure 14A** tandis que FpvI va permettre l'expression du transporteur FpvA lui-même (Beare *et al.*, 2003; Ochsner *et al.*, 2002).

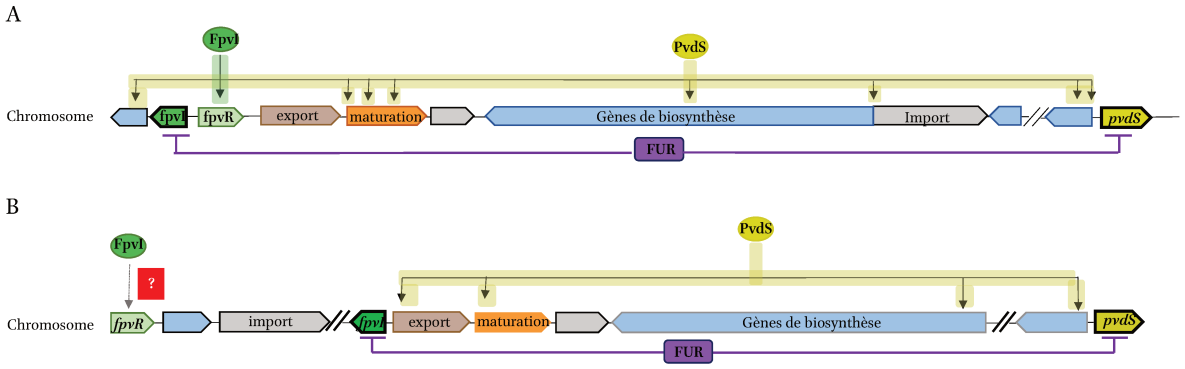


Figure 14 : Contexte génétique des gènes impliqués dans la voie pyoverdine et dans sa régulation chez *P. aeruginosa* PAO1 (A) et *P. putida* KT2440 (B). La boucle d'autorégulation positive du système faisant intervenir les facteurs sigma PvdS et FpvI lors d'un besoin en fer est représenté en vert pour FpvI et en jaune pour PvdS. L'impact du répresseur FUR actif en présence de fer intracellulaire est représenté en violet. La couleur des gènes correspond aux différents acteurs impliqués dans le systèmes et schématisés en **Figure 11**

L'expression du transporteur étant dépendante de l'import de la PVD, ces deux facteurs σ sont exprimés constitutivement en très faible quantité, permettant une expression basale de la voie PVD (Edgar *et al.*, 2014). Cela permet ensuite d'initier, en cas de besoin en fer, la boucle d'auto-activation du système PVD *via* l'import de PVD complexée au fer.

Il est important de souligner que contrairement à FpvI, PvdS est impliqué dans l'expression d'autres gènes indépendants de l'import du fer comme des facteurs de virulence, l'exotoxine A ou la protease PrpL (Llamas *et al.*, 2014; Rédly and Poole, 2003). Une étude récente soumet l'hypothèse que les régulons de PvdS et FpvI seraient plus grands qu'on ne le pense, et que par exemple, 7 gènes seraient sous le contrôle de FpvI et une vingtaine sous celui de PvdS (Cornelis *et al.*, 2023). De plus, ces régulateurs peuvent être eux même soumis à une régulation fine au niveau transcriptionnel *via* des régulateurs de la famille des LysR (Cornelis *et al.*, 2023). Une répression de la PVD s'exerce aussi au niveau post-transcriptionnel grâce à l'activation de l'ARN régulateur PrrF2 (ARN inhibant la transcription d'un gène en masquant une partie ou la totalité de la séquence codante) ou à la répression de PvdS (Little *et al.*, 2018). L'intervention de ces différents acteurs pourrait permettre

d'affiner la production de la PVD en fonction de signaux environnementaux qu'il reste à définir (Cornelis *et al.*, 2023). D'autres facteurs ECF semblent également impliqués dans le système PVD. En effet, une surexpression de XhuI conduit à la surexpression de 16 gènes impliqués dans l'acquisition du fer, notamment tous les gènes impliqués dans la réduction et la libération du fer dans la périplasme de la bactérie (Cai *et al.*, 2022).

Concernant KT2440, l'activateur transcriptionnel PvdS est bien décrit et permet la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse, la maturation et l'export de la PVD comme pour PAO1 (**Figure 14B**). A l'opposé, même si FpvI semble avoir été identifié dans quelques études, il ne figure pas dans les bases de données telles que *Pseudomonas*.com (Winsor *et al.*, 2016 ; dernier accès le 04/07/2023) et FpvR n'ayant jamais été identifié chez KT2440, son réseau d'interactions n'est pas connu à ce jour (Molina *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2008).

3.3.2 Par le régulateur Fur

Comme le montre la **Figure 14A**, l'expression des gènes *pvdS* et *fpvI* est sous la dépendance de la protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) chez PAO1. Il s'agit d'une protéine de liaison à l'ADN qui reconnaît des séquences d'ADN spécifiques et utilise le Fe(II) ou le Mn(II) comme corépresseur et bloque la transcription des gènes cibles (Fillat, 2014). Cependant, Fur représente également un activateur central *via* 3 mécanismes : la répression des petits ARN, la liaison en *cis* à des régulateurs pour améliorer le recrutement de l'ARN polymérase ou encore le blocage de la liaison à l'ADN d'un répresseur de la transcription (Troxell and Hassan, 2013). Identifié pour la première fois chez *Escherichia coli* et présent chez un grand nombre de microorganismes, Fur est un régulateur contrôlant notamment l'expression d'une grande majorité des gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Escolar *et al.*, 1999).

Chez les *Pseudomonas*, Fur est caractérisé pour son rôle de répresseur des gènes impliqués dans l'import du fer lorsque la quantité disponible dans le cytoplasme est suffisante pour répondre aux besoins de la bactérie. Le mécanisme moléculaire de la répression par Fur consiste en la liaison de cette protéine aux éléments régulateurs situés en amont d'un gène, empêchant ainsi la liaison de l'ARN polymérase par encombrement stérique, réprimant ainsi la transcription des gènes (Troxell and Hassan, 2013). Les sites de liaison de Fur à l'ADN se situent environ 19 bp avant le gène cible,

sont appelées Fur-box et sont définis par la séquence palindromique TG**ATAAT**n**ATTAT**C (Escolar *et al.*, 1999; Steingard and Helmann, 2023). En absence de fer, Fur se trouve sous forme de tétramères solubles et stables. Sous cette forme, Fur ne peut pas se lier à l'ADN et la transcription des gènes *pvdS* et *fpvI* peut donc avoir lieu, permettant l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la PVD et l'import du complexe ferri-pyoverdine dans la cellule.

En présence de fer, le Fe(II) va se lier à Fur, entrainant la dissociation du tétramère en dimères actifs puis la reconnaissance de la Fur-box et la fixation de 2 dimères de part et d'autre du double brin (Ochsner and Vasil, 1996; Pérard *et al.*, 2016). Un dimère actif est illustré en **Figure 15**.

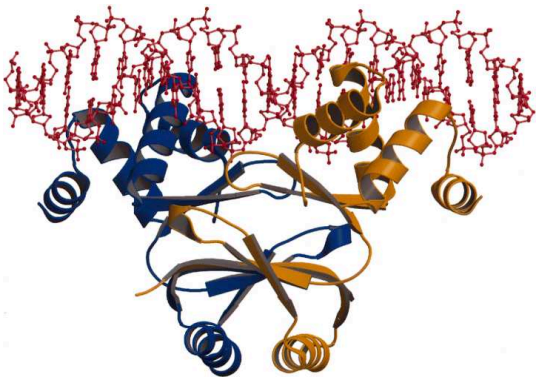


Figure 15 : Dimère de Fur fixé sur le double brin d'ADN codant pour *pvdS*. Le premier monomère est représenté en bleu et le second en orange tandis que la séquence d'ADN est en rouge (d'après Pohl *et al.*, 2003).

Ainsi, par l'action de Fur, l'expression des gènes comportant une Fur-box est soumise à une régulation dépendante de la concentration en Fe(II) intracellulaire, ce qui est notamment le cas du système PVD (Troxell and Hassan, 2013). Par son influence sur *pvdS*, Fur contrôle aussi indirectement la virulence de la souche *via* l'expression de l'exotoxine A qui est dépendante de *pvdS* (Vasil, 2007).

Fur semble jouer un rôle majeur chez les *Pseudomonas* puisque seules quelques espèces comme *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528 ont pu être délétée de *fur* mais qu'aucun mutant n'a pu être obtenu chez *P. aeruginosa* ni chez *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Butcher *et al.*, 2011; Cha *et al.*, 2008). De plus, les mutants conditionnels de ce gène chez ces souches sont difficilement viables (Hassett *et al.*, 1996; Pasqua *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2009). De façon générale, les différents mutants impactés dans *fur* présentent une production de PVD constitutive (Barton *et al.*, 1996; Pasqua *et al.*, 2017).

Lors de leurs recherches sur un mutant délété conditionnellement de *fur* chez PAO1, Pasqua *et al.* ont mis en évidence que le répresseur n'est pas essentiel pour la croissance en milieu liquide ou en biofilm de la souche ni pour sa pathogénicité dans un modèle infectieux d'insecte. En revanche, Fur semble essentiel pour la croissance en colonies de la souche. L'équipe a également démontré que lorsque Fur n'est pas exprimé et que la souche ne produit pas de PVD, le niveau de ROS intracellulaire augmente en milieu riche liquide mais reste identique à la souche sauvage en milieu solide. Ils émettent ainsi l'hypothèse qu'en milieu liquide, la PVD, dont la production est médiée par Fur, aurait un effet protecteur envers les ROS (Pasqua *et al.*, 2017).

Hassett *et al.* ont également montré que les cellules dépourvues de Fur présentaient un taux plus important de ROS en milieu riche (Hassett *et al.*, 1996). Ainsi, Fur contrôle également positivement la réponse au stress cellulaire *via* l'expression d'enzymes permettant la détoxification de ces ROS. En effet, comme décrit ci-dessus, Fur peut aussi jouer un rôle d'activateur mais dans le cas de *P. aeruginosa*, seule l'implication de deux petits ARN régulateurs (PrrF1 et PrrF2) est décrite. Ce rôle d'activateur est alors indirect puisqu'en fait Fur va directement réprimer l'expression de PrrF1 et PrrF2 qui sont eux-mêmes des répresseurs post-transcriptionnels d'un ensemble de gènes (Vasil, 2007). Ainsi, en condition riche en fer, Fur réprime PrrF1 et PrrF2, induisant ainsi l'expression de gènes impliqués dans le stockage du fer ou encore la défense contre le stress oxydatif comme *sodB*, par exemple (Vasil, 2007). Parmi ces gènes se trouvent aussi *acnA* codant pour une aconitase impliquée dans le cycle de Krebs ainsi que la succinate déshydrogénase *sdhCDAB* impliquée dans la respiration cellulaire. Enfin, les gènes *antAB* et *catAB* codant pour la dégradation de l'anthranilate sont également sous le contrôle de ces ARN régulateurs. L'anthranilate est en fait le précurseur de la *Pseudomonas* quinolone (PQS), une molécule importante du quorum sensing) (Vasil, 2007). Il existe ainsi, chez *P. aeruginosa* un lien fort entre quorum sensing, virulence et régulation par le fer.

Enfin, Fur a une influence non négligeable sur de nombreux gènes dans la cellule dont certains, bien qu'essentiels, demeurent non identifiés à l'heure actuelle. A cela s'ajoute l'hypothèse que Fur aurait également un rôle important à jouer, autre que son activité de régulateur transcriptionnel (Visca and Imperi, 2018). Visca et Imperi ont émis l'hypothèse que Fur serait capable de se lier directement au fer dans le cytoplasme, sans engendrer l'activité transcriptionnelle, mais permettant ainsi la viabilité de la cellule en empêchant la toxicité du fer (Visca and Imperi, 2018).

Chapitre 3

La dégradation des déchets amiantés

1. Les principaux types de déchets amiantés

De par ses propriétés physico-chimiques extraordinaires, l'amiante a été utilisé dans de nombreux domaines depuis le 20ème siècle. Ces fibres résistantes peuvent être mélangées à divers matériaux ou matrices afin d'obtenir des matériaux aux propriétés multiples (Barbalace, 2004). En effet, l'amiante a été utilisé dans plus de 3000 produits à usages domestiques et industriels et le secteur du bâtiment fût le plus gros consommateur après les secteurs ferroviaires, aériens et maritimes (Bordebeure, 2017; Gautier *et al.*, 2017). En plus d'être retrouvé dans presque tous les bâtiments construits avant son interdiction, l'amiante est également retrouvé à tous les niveaux : dans les produits en amiante-ciment, les revêtements muraux notamment les flocages isolants, mais également dans des produits décoratifs tels que les revêtements de sol en vinyle (Barbalace, 2004). Tout travaux dans ces bâtiments nécessite un diagnostic amiante avant travaux (DTA). Environ 70 % des pays membres de l'Union Européenne demandent une évaluation de la présence d'amiante mais les raisons sont variables d'un pays à l'autre. Certains pays l'exigent pour tout travaux de démolition ou de rénovation, d'autres uniquement si la présence d'amiante est suspectée. La France est le seul pays où le diagnostic est requis lorsque le bâtiment est soumis à un changement de propriétaire (Workshop Européen RDA 2023).

Ainsi, en 2018, la Commission Européenne a rédigé un guide concernant la gestion des déchets de construction et de démolition dans l'Union Européenne permettant ainsi d'encadrer ces audits de pré-démolition de façon officielle. Cependant, la mise en place de ces audits n'est décidée qu'au niveau national (European Comission, 2018). En effet, la mise en place de la détection de l'amiante et de ces audits peut s'avérer laborieuse puisqu'elle nécessite deux étapes distinctes, à savoir la délimitation de la zone à analyser et la mise en place de protections collectives ou individuelles puis la décontamination au sens propre. Ces deux étapes peuvent ainsi nécessiter la présence de deux entreprises distinctes, entrainant des coûts et des délais supplémentaires avant les travaux. Environ la moitié des pays concernés ont ainsi un document guide clair et détaillé permettant de gérer les déchets amiantés (Workshop Européen RDA 2023). Par exemple, en 2023, l'organisme fédéral en charge de la gestion des déchets en Allemagne a publié un guide définissant un nouveau critère d'évaluation des déchets contenant de l'amiante (LAGA, 2023). Si plus de 0,1 % de la masse du déchet

est composé d'amiante alors il s'agit d'un déchet dangereux qui sera enfouit. Si le pourcentage d'amiante est compris entre 0,0010 et 0,1 %, alors il ne s'agit pas d'un déchet dangereux mais il sera tout de même traité de la même façon que les déchets dangereux par précaution. Si le déchet contient moins de 0,0010 % d'amiante, alors il est considéré comme « amiante-free » et peut être recyclé en matériau de construction (LAGA, 2023). Concernant la réglementation pour la protection des travailleurs ou la mise sur le marché d'article contenant de l'amiante, il n'existe pas, en France, de seuil « amiantifère ». Cela signifie que la seule détection de la présence de fibres amiantées suffit à classer ce matériau comme déchet amianté. En 2015, le nombre de chantiers de désamiantage déclarés à l'inspection du travail française est estimé à 25 000 (Moussallam, 2017).

En France, l'arrête du 12 mars 2012 définit les deux types de déchets amiantés suivants (JORF, 2012) :

- Les déchets d'amiante lié à des matériaux inertes : « déchets contenant de l'amiante lié à des matériaux de construction inertes ayant conservé leur intégrité ». Cela concerne des matériaux de construction dont les fibres amiantées sont intégrées à une matrice solide (amiante ciment, plaques ondulées, tuyaux et canalisations en fibrociment, etc.)
- Les déchets de terres amiantifères : « déchets de matériaux géologiques naturels excavés, contenant naturellement de l'amiante ».

Il est nécessaire de rajouter également les déchets suivants :

- Les déchets se déliant par nature, comprenant par exemple les flocages, les calorifugeages, ou les amiantes intégrés à des poudres
- Les déchets d'amiante lié à des matériaux non inertes comme les dalles de vinyle ou les colles et mastics
- Les équipements de protection jetables regroupant les combinaisons, gants, sacs d'aspirateurs et autres résidus de nettoyage
- Les déchets d'amiante lié à des matériaux inertes de tout type mais ayant perdu leur intégrité.

Chaque pays étant libre dans la gestion de ses déchets, la législation danoise a rajouté, par exemple, une catégorie regroupant les matériaux de construction contenant de l'amiante poussiéreux. Dans les années 70, au pic de l'utilisation de l'amiante, l'essentiel de la production des

produits amiantés au niveau mondial concerne les amiante-ciment sauf aux États-Unis où la répartition était très différente comme le présente le **Tableau 1** (Douguet *et al.*, 1997).

Tableau 1 : Répartition de la production de produits amiantés dans le monde et aux Etats-Unis (D'après Douguet *et al.*, 1997)

Produit amianté	Répartition de la consommation aux USA (%)	Répartition de la consommation mondiale (%)
Amiante-ciment	23-30	65-70
Amiante-cartons/papiers	26-38	7-8
Dalles de sols (dont vinyle)	13-21	4-7
Matériaux de friction	6-8	2-3
Produits de couverture (dont flocage)	4-7	2-3
Textiles	1-2	1-4
Plastiques	1-2	trace-1
Divers	12-20	13-15

1.1 Les matériaux en amiante-ciment

L'amiante-ciment, illustré en **Figure 16A** est un mélange homogène contenant environ 10 % de fibres amiantées pour 90 % de matrice cimentaire. On y retrouve principalement des fibres de type chrysotile bien que des amphiboles aient déjà été trouvés (Douguet *et al.*, 1997). L'amiante-ciment a été le matériau amianté le plus utilisé en France dans le second œuvre depuis la fin des années 1960, représentant, en 1998, un gisement de 24 millions de tonnes réparties de la façon suivante (Bordebeure, 2017 ; Gautier *et al.*, 2017) :

- 13 millions de tonnes de plaques ondulées
- 4 millions de tonnes de tuyaux enterrés et de gaines
- 3,5 millions de tonnes d'ardoises
- 2 millions de tonnes de plaques planes
- 1,5 millions de tonnes de plaques de support de tuiles

Actuellement, les déchets composés d'amiante-ciment sont impliqués dans 80 % des chantiers de désamiantage (Moussallam, 2017). Au laboratoire, une minéralisation à l'acide nitrique 4 $mol.L^{-1}$ des déchets de tuile de toit en fibrociment fournis par la société CEFASC Environnement a permis

de montrer que ces déchets sont composés de 12 mg de fer et 36 mg de magnésium par gramme de déchet (David, 2019)

1.2 Les dalles vinyles

Dans la catégorie des amiantes liés, les dalles vinyles (**Figure 16B**) représentent 390 000 tonnes de déchets amiantés en France et ont majoritairement été utilisés comme revêtements de sols (Gautier *et al.*, 2017). L'analyse de plusieurs centaines d'échantillons a confirmé que ces déchets de dalles vinyles ne contiennent que des fibres de type chrysotile (Campopiano *et al.*, 2021 ; Zichella *et al.*, 2021). Ces matériaux sont obtenus en mélangeant des résines comme le polychlorure de vinyle (PVC), des additifs, des pigments et des fibres d'amiantes dont la proportion peut aller de de 8 à 30 % (Donovan and Pickin, 2016). Zichella *et al.* ont travaillé avec deux types de dalles vinyles, un lot plutôt flexible datant des années 1990 et un lot plus rigide datant des années 1980 et les analyses ont montré que la quantité de fibres ainsi que leurs dimensions variaient d'un lot à l'autre (Zichella *et al.*, 2021). La caractérisation du lot utilisé pour mes recherches fera l'objet d'un paragraphe de la **Partie II** dans ce manuscrit.

1.3 Le flocage et le calorifugeage

Les déchets les moins abondants en terme de tonnage sont les déchets de flocage (**Figure 16C**) et de calorifugeage, représentant environ 200 000 tonnes et, avec les plâtres et les peintures, concernent près de 23 % des chantiers de désamiantage (Gautier *et al.*, 2017; Moussallam, 2017). Contrairement aux 2 précédents, ces déchets sont considérés comme plus friables, les fibres n'étant pas liées à la matrice, elle-même composée de gypse dans le cas du flocage. Ces matériaux de flocage, utilisés en tant qu'isolants thermiques et phoniques sont divisés en deux catégories distinctes (Douguet 1997) :

- Le flocage dit « en couche épaisse » (> 2 cm) : de texture duveteuse, de basse densité et souvent friable. Il est obtenu généralement par voie sèche et contient 50 à 90 % d'amiante.
- Le flocage dit « en couche mince » (< 1,5 cm) : de texture plus dure, de plus haute densité et moins friable. A l'inverse, il s'obtient par voie humide et renferme 5 à 30 % d'amiante.

Ce déchet peut renfermer aussi bien des fibres de chrysotile que d'amphiboles, qu'il soit en couche mince ou épaisse. Tout comme pour les déchets de fibrociment, une minéralisation au laboratoire des déchets de chrysotile-gypse, provenant du chantier de désamiantage de l'Université de Paris Jussieu, a permis de montrer que ces déchets sont composés de 4,6 mg de fer et 74 mg de magnésium par gramme de déchet (David, 2019).

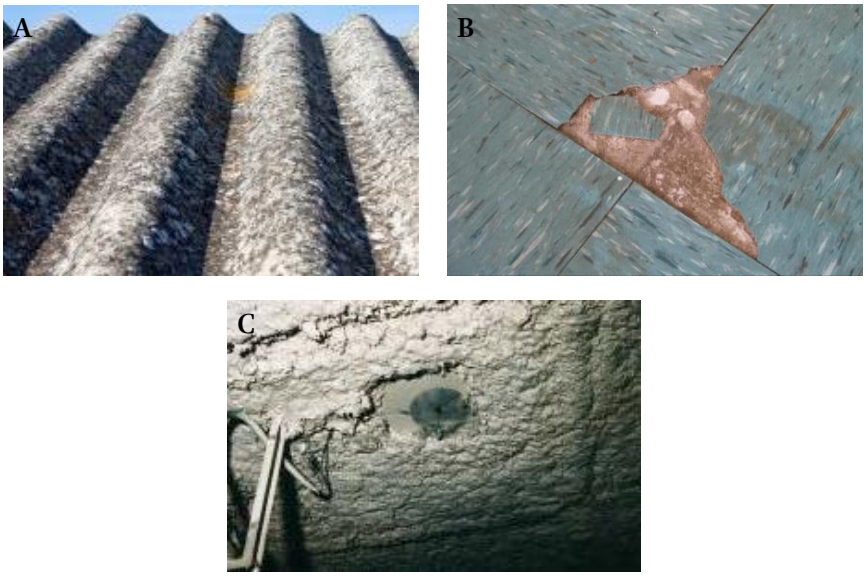


Figure 16 : Principaux types de matériaux amiantés retrouvés dans les bâtiments. A : toiture en fibrociment. **B** : dalles vinyles amiantées. **C** : flocage amianté

2 Nature des matrices retrouvées dans les déchets amiantés

Ce paragraphe traite des matrices les plus retrouvées dans les 3 principaux types de déchets amiantés, à savoir le ciment et le gypse, matrices minérales retrouvées dans les déchets d'amiante-ciment et de flocage ainsi que le PVC, matrice organique englobant les fibres dans les dalles vinyles.

2.1 Les matrices minérales

Les matrices minérales sont formées de composants d'origine minérale, à savoir « tout élément ou composé chimique arborant une structure cristalline et ayant été formé grâce à un procédé géologique naturel » (Nickel, 1995).

2.1.1 Le ciment

Le fibrociment est un mélange de ciment et de fibres naturelles ou synthétiques. L'analyse d'un fibrociment sans amiante par l'équipe de Bouharoun *et al.* a relevé les composants majoritaires suivantes : SiO_2 : 20,07 % ; CaO : 64,25 % ; Al_2O_3 : 4,86 % ; SO3 : 3,55 % et Fe_2O_3 : 3,07 % (Bouharoun *et al.*, 2015). Dans ce cas, les fibres utilisées étaient de la silice mais concernant nos déchets d'amiante-ciment, il s'agit de fibres amiantées conférant au matériau les propriétés remarquables décrites dans la **Partie I, Chapitre 1.** Le ciment est une matière pulvérulente formant, lors d'un mélange avec de l'eau ou une solution alcaline, une pâte homogène et plastique capable d'agglomérer des substances variées lors de sa prise. Il est ainsi classifié de liant hydraulique et est fabriqué à partir d'environ 80 % de calcaire et de 20 % d'argile. Le béton résultant de l'hydratation du ciment présente une bonne résistance à la compression mais reste faible en traction. Par conséquent, il est souvent renforcé soit par des armatures soit par des fibres pour être résistant et durable. Il ne s'agit cependant pas d'un déchet avec lequel j'ai été amenée à travailler durant mon doctorat.

2.1.2 Le gypse

Le gypse est la deuxième matrice d'intérêt dans le cadre des matériaux amiantés à matrice minérale. Il s'agit d'une espèce minérale commune de formule $CaSo_4,2H_2O$, composée de feuillets de sulfate de calcium maintenus par des molécules d'eau. L'origine du mot gypse provient du latin *gypsum* désignant la pierre à plâtre car c'est surtout sous cette forme qu'il est employé depuis plus de 4000 ans (Marteau, 2011). Il est très peu soluble dans l'eau mais peut se dissoudre efficacement dans des milieux acides. Ce minéral est trouvé pur dans l'environnement et il existe plusieurs variétés en fonction de son profil de cristallinité. Les 5 variétés principales sont :

- Le gypse lamelleux présentant des cristaux allongés
- L'albâtre gypseux formant des grains fins
- Le gypse fibreux composé de fibres longues et fines formant une masse parfois nacrée de couches de fibres parallèles ou d'agglomération de fibres courbées
- La pierre à plâtre commune formée d'une masse cristalline compacte pauvre en chaux

- Le gypse lenticulaire sous forme de grands cristaux transparents, pouvant former des structures similaires à des roses des sables

Actuellement le gypse est employé comme base de fabrication du plâtre, notamment pour le plâtre de Paris, ou comme additif dans le ciment, mais dans le cas des matériaux amiantés seul le gypse fibreux était utilisé (Marteau, 2011).

2.2 Les matrices organiques plastiques : le cas du PVC

Le PVC désigne une matière plastique issue de la polymérisation de chlorure de vinyle dont la fabrication industrielle remonte à 1931. Les plastiques sont des matériaux entièrement synthétisés par l'homme, omniprésents dans notre société sous de nombreuses formes aux propriétés physico-chimiques sur mesure telles que la résistance, flexibilité ou l'hydrophobicité. Lors de leur synthèse, les plastiques, majoritairement issus de la pétrochimie, sont optimisés pour durer et ne pas se dégrader sous l'effet de conditions externes. Ainsi, actuellement seulement 9 % du plastique est recyclé et le reste se dégrade peu à peu en micro et nano plastiques, s'accumulant ainsi dans l'environnement et ayant un effet néfaste sur tous les écosystèmes. Le PVC est le 3ème plastique le plus produit dans le monde puisque peu couteux et très résistant (Ali *et al.*, 2014 ; Giacomucci *et al.*, 2020). Initialement, le PVC, principalement issu de sels minéraux et de dérivés du pétrole, se présente sous la forme d'une poudre blanche et est ensuite mélangé avec des additifs pour former un produit final. Les additifs peuvent représenter jusqu'à 50 % du poids total et confèrent diverses propriétés au matériau (Ru *et al.*, 2020). Il peut s'agir de plastifiants augmentant la flexibilité, la durabilité et l'élasticité, d'antioxydants retardant la dégradation du plastique à cause de la lumière ou encore de stabilisateurs thermiques permettant au PVC stabilisé d'être utilisé jusqu'à 260 °C (Hahladakis *et al.*, 2018). Sans ces additifs, le PVC est en fait un matériau dur, fragile et compliqué à manipuler et fond à partir de 60 °C. La grande force du PVC réside dans sa versatilité due aux additifs. Par convention, on distingue deux types de PVC traités : le PVC flexible qui permet de créer des rideaux de douche, vêtements et autres et le second type qui est le PVC rigide utilisé pour la construction et permettant d'obtenir des canalisations ou des revêtements de sol, comme les dalles vinyle amiante.

3 Dégradation biologique des déchets amiantés à matrices minérales et organiques

En 2013, le Service de l'Observation et des Statistiques du Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (SOeS) a mené une enquête concernant les déchets produits par le domaine BTP dont une partie porte sur la projection de l'estimation du gisement annuel de déchets amiantés et des capacités de stockage disponibles à horizon + 10 et + 20 ans, soit 2023 et 2033. En tenant compte des différents programmes de renouvellement urbains, de l'évolution contraignante de la réglementation, du vieillissement et de la durée de vie moyenne des bâtiments et des matériaux amiantés mais aussi de la prise de conscience des particuliers et des pouvoirs publics concernant la persistance des dangers de l'amiante, l'hypothèse retenue relève un scénario dit « de continuité » avec une augmentation de + 1,8 % par an (Gautier *et al.*, 2017). Cette dernière étude prouve une fois de plus l'importance de trouver une solution durable et respectueuse de l'environnement pour gérer au mieux ces déchets toxiques nécessitant actuellement de grands espaces de stockage sur une planète dénombrant toujours plus d'habitants. En conséquence, le développement d'un traitement biologique des déchets amiantés par notre équipe est une alternative innovante et respectueuse de l'environnement.

3.1 Dissolution des matrices minérales par des acides organiques

Dans la littérature, un brevet datant de 2012 fait état d'un procédé utilisant l'acide lactique présent dans le petit lait afin de dissoudre la matrice cimentaire des déchets de fibrociment. Ce procédé se termine par un traitement hydrothermal afin d'achever l'altération des fibres libérées (Balducci, 2012). Comme expliqué dans le **Chapitre 1**, les acides organiques, dont fait partie l'acide lactique, sont décrits comme des molécules pouvant altérer efficacement les minéraux. Partant de ce postulat, notre équipe a rapidement cherché à comparer l'efficacité de différentes solutions d'acides organiques issues de l'industrie agroalimentaire pour dégrader les déchets amiantés à matrices minérales. Les tests se sont focalisés sur l'utilisation du jus de choucroute (provenant de la station de traitement des eaux usées du bassin de l'Ehn qui utilise un procédé de méthanisation pour traiter ces déchets) et du petit lait (fournit par la société Alsace lait). En effet, en plus d'être des

déchets produits en grande quantité à l'échelle locale, leurs pH sont très acides, environ 3,70 pour le jus de choucroute et 4,30 pour le petit lait. Le jus de choucroute n'a pas été une voie intéressante car, étant très riche en fer, ce dernier se retrouve sous forme de dépôt au niveau des fibres d'amiante. Seul le magnésium était solubilisé avec cependant une diminution de l'extraction au fil des cycles (David, 2019). Cela s'explique par le fait que le pH de la solution augmente au fur et à mesure que du magnésium est libéré du déchet, diminuant ainsi l'efficacité de l'extraction en milieu acide. De plus, le jus de choucroute comme le petit lait montrent une efficacité moindre sur les déchets de fibrociment que sur les déchets de flocage, liée à une augmentation plus importante du pH du milieu, le fibrociment renfermant plus de magnésium dans sa matrice.

Notre équipe a pu montrer l'efficacité du petit lait à extraire le fer et le magnésium des déchets (David, 2019). Cependant, afin de maintenir un pH acide tout le long de l'altération et éviter le traitement hydrothermal décrit par Balducci *et al.*, notre équipe a également investigué l'efficacité d'un traitement dans lequel le petit lait est ensemencé par *Lactobacillus plantarum*. L'ensemencement du milieu par la souche a ainsi permis d'extraire 3 fois plus de fer et de magnésium des déchets de flocage et 200 fois plus de fer et 30 fois plus de magnésium des déchets de fibrociment, prouvant l'importance de maintenir un pH acide (David, 2019). L'analyse des milieux d'altération par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a permis de montrer que la présence de déchets amiantés stimule la production d'acides organiques (lactate et succinate), notamment grâce à la libération de magnésium (David, 2019).

3.2 Altération de la matrice organique de PVC

Le PVC étant un plastique conçu pour durer dans le temps, sa biodégradation est un véritable défi. La biodégradation des plastiques de façon générale se déroule suivant 4 étapes distinctes illustrées en **Figure 17** (Amobonye *et al.*, 2021):

- La biodétérioration : première étape consistant en une colonisation de la surface du plastique par les microorganismes, pouvant parfois même former des biofilms.
- La biofragmentation : dépolymérisation du plastique grâce à des enzymes extracellulaires et des radicaux libres produits par les microorganismes. Ces réactions se font préférentiellement sur les groupements nucléophiles (liaisons peptidiques, esters, etc.), très

peu présents dans le PVC, pouvant expliquer, entre autre, sa résilience face à la biodégradation.

- L'assimilation : transferts des oligomères ou monomères formés lors de l'étape précédente vers le cytoplasme des cellules. Cette assimilation fait intervenir des mécanismes encore mal connus car variant d'un composé à l'autre.
- La minéralisation : métabolisation des oligomères par les organismes grâce à diverses enzymes comme des estérases, lipases, cutinases, peroxydases et laccases. Les microorganismes peuvent également utiliser ces éléments comme source de carbone en détournant les réactions de dégradation pour obtenir un intermédiaire qui sera ensuite utilisé dans une autre voie métabolique. Des conditions aérobies sont préférables pour la minéralisation, car elles permettent des réactions plus rapides permettant d'oxyder totalement les oligomères minéralisés. De plus, l'absence d'oxygène comme accepteur final d'électrons provoque chez les microorganismes un manque à gagner en énergie par l'utilisation de molécules organiques comme accepteurs d'électrons (Amobonye *et al.*, 2021).

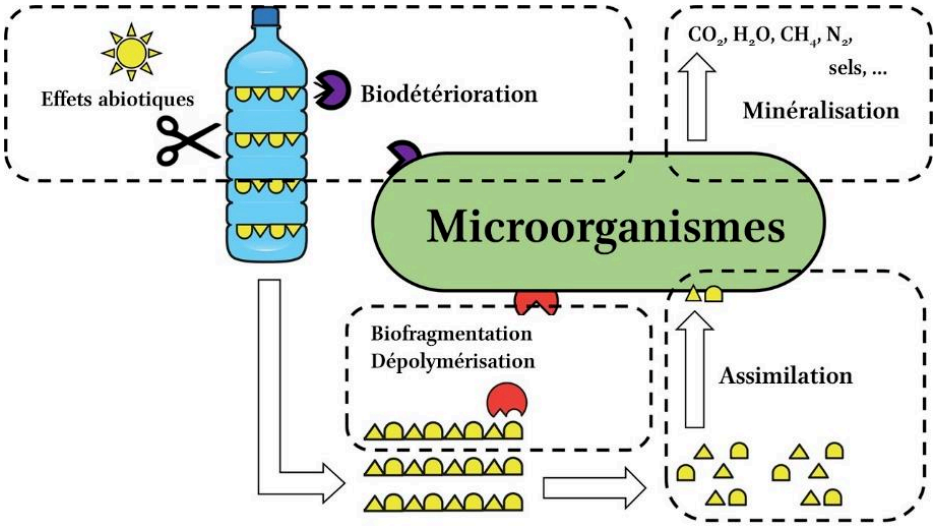


Figure 17 : Représentation schématique de la biodégradation des plastiques (d'après Amobonye *et al.*, 2021)

3.2.1 Biodégradation par voie bactériologique

L'approche la plus utilisée pour étudier la biodégradation du PVC par des microorganismes consiste à mettre en contact du PVC stérile avec des échantillons prélevés dans différents environnements, pollués ou non, et d'identifier les microorganismes pouvant le coloniser.

Les bactéries marines ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur importante diversité et de leur capacité d'adaptation à l'environnement marin. De plus, ces souches marines sont souvent des pionnières dans la colonisation de diverses surfaces, pilotant ainsi les cycles géobiochimiques (Harrison *et al.*, 2014). Une incubation sur 2 ans de PVC avec des échantillons d'eau de mer enrichis a permis de mettre en avant l'existence de 11 consortia capables de se développer mais également de réduire significativement la masse du PVC (Giacomucci *et al.*, 2020). L'analyse de ces communautés a montré que presque tous les consortia contenaient des bactéries du genre *Clostridium* et que 8 consortia sur 11 renfermaient des bactéries du genre *Acetobacterium* (Giacomucci *et al.*, 2020). Ces bactéries ont ainsi permis de dégrader partiellement les chaînes de polymères, formant ainsi des fragments plus petits. Cela permet de mettre en avant le potentiel devenir des déchets de PVC dans des environnements marins. Cependant, cette dégradation se faisant en conditions anaérobies, elle reste relativement faible, avec une diminution de la masse d'environ 10 %. Une seconde équipe étudiant la croissance d'une souche marine avec du PVC comme unique source de carbone, a permis de l'identifier au genre *Bacillus.* Cette souche est ainsi capable d'altérer la texture de la surface du PVC après 90 jours d'incubation. Cependant, son activité de dégradation reste plus élevée sur le polyéthylène, surement à cause de la présence d'atome de chlore dans la structure du PVC le rendant plus versatile (Kumari *et al.*, 2019).

En 2004, l'équipe de Danko *et al.* ont isolé pour la première fois des souches de *P. putida* AJ et d'*Ochrobactrum* TD possédant un ou plusieurs plasmides linéarisés leur permettant de dégrader le chlorure de vinyle *via,* notamment, une alkene monooxygenase (Danko *et al.*, 2004). Le chlorure de vinyle reste différent du PVC mais la liaison étant identique il serait intéressant d'étudier leur croissance en présence de PVC comme seule source de carbone.

3.2.2 Biodégradation par voie fongique

Le PVC étant un polymère complexe, plusieurs études ont ciblé des microorganismes connus pour dégrader divers polymères grâce à leurs enzymes. L'équipe de Sumathi *et al.* s'est ainsi intéressée à la production de laccases, enzymes impliqués dans la dégradation de la lignine, par différentes espèces de *Cochliobolus* isolées de décharges plastiques. Après avoir optimisé la production de laccases, l'équipe a pu démontrer que la souche était capable d'utiliser le PVC comme seule source de carbone mais également d'induire des changements structuraux. En effet, ils ont pu prouver que ces laccases étaient capables de rompre les doubles liaisons C=C du PVC pour générer de nouvelles liaisons C=O via un mécanisme inconnu. Les molécules à courtes chaînes résultantes seraient alors dégradées par d'autres enzymes inconnues afin d'être utilisables par les microorganismes comme source de carbone *via* le cycle de Krebs (Sumathi *et al.*, 2016).

Une seconde équipe a ensuite incubé du PVC dans du terreau avec des boues de station d'épuration, ayant permis de mettre en évidence le développement de *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus tigrinus* et *Aspergillus brasiliensis*, avec une colonisation plus efficace du PVC pour *P. chrysosporium* lorsqu'il représente la seule source de carbone (Ali *et al.*, 2014). Enfin, Khatoon *et al.* ont prélevé des échantillons sur des sites contaminés par des déchets de plastiques et de bois où une souche de *P. chrysosporium* (NK-1) capable d'utiliser le PVC comme seule source de carbone a été isolée. Cette souche a, de plus, permis une dégradation du PVC grâce à la production de lignine peroxydases conduisant à des changements de texture de la surface du PVC et à l'apparition de trous (Khatoon *et al.*, 2019). La production maximale de lignine peroxydase est atteinte après 4 semaines d'incubation en présence de PVC et l'utilisation de l'enzyme purifiée a permis de réduire la masse du PVC de 31 %, soit une dégradation 3 fois plus importante que pour les consortia marins (Khatoon *et al.*, 2019).

Ainsi, ces études nous permettent de mettre en avant le rôle des microorganismes dans la dégradation du PVC. Les champignons et leurs enzymes, notamment les oxydoréductases, ont montré une efficacité de biodégradation du PVC supérieure à celle des bactéries capables d'utiliser le PVC comme seule source de carbone.

3.3 Altération des fibres amiantées par les *Pseudomonas* producteurs de pyoverdine

Comme l'explique le **Chapitre 1 Partie I**, de nombreux organismes sont capables d'altérer des fibres d'amiantes, notamment *via* la production de chélateurs du fer de bas poids moléculaire. Comme la levée de la toxicité des déchets amiantés nécessite l'élimination du fer des fibres, notre équipe a étudié le rôle du principal sidérophore produit par les espèces de *Pseudomonas*, la pyoverdine, connue pour être un excellent chélateur du fer, dans l'altération biologique des déchets d'amiante. Deux stratégies ont été envisagées : l'utilisation de pyoverdines purifiées pour extraire le fer des fibres puis l'ensemencement de *Pseudomonas* producteurs de pyoverdines.

3.3.1 Altération des fibres par la pyoverdine

L'objectif de cette voie est d'utiliser les capacités de complexation des pyoverdines pour extraire le fer présent au sein des fibres d'amiantes. Les résultats obtenus par notre équipe concernant l'utilisation des pyoverdines sont présentés au sein de la revue **Partie I Chapitre 1**, paragraphe *Bioweathering of asbestos waste*. Ces travaux ont permis de montrer que toutes les pyoverdines testées permettent d'extraire du fer des déchets amiantés, ce qui peut s'expliquer par les faibles différences de constantes d'affinités pour le fer entre les pyoverdines (données du laboratoire). Concernant les déchets de flocage, ce sont les pyoverdines de PAO1 et *P. mandelii* SB 8.3 qui ont permis d'obtenir l'extraction la plus importante (David *et al.*, 2020c)

3.3.2 Dégradation par *Pseudomonas aeruginosa*

En se basant sur la dépendance des souches de *Pseudomonas* au magnésium, l'équipe a ainsi sélectionné les souches de *P. aeruginosa* PAO1 et *P. mandelii* SB 8.3 afin d'étudier leur capacité à altérer les amiantes natives mais aussi les déchets amiantés *via* leur production de pyoverdine, couplée à une attaque directe des cellules bactériennes. L'étude approfondie du rôle des sidérophores produits par les *Pseudomonas* n'a été menée, jusqu'à présent, que par notre équipe et a permis de déposer un brevet (PCT/FR2016/052154). Les résultats obtenus concernant l'altération par les *Pseudomonas* sont présentés au sein de la **revue Partie I Chapitre 1**, paragraphe *Bioweathering of asbestos waste*. De façon générale, la souche PAO1 semble plus efficace pour

extraire fer et magnésium des déchets de flocage. (David *et al.*, 2020a). Cependant, l'extraction du fer est moindre que pour les sidérophores purifiés. Il a rapidement été observé que la présence d'amiantes entrainait malheureusement une répression de la production de pyoverdine, corrélée avec la libération de fer dans le milieu extracellulaire (David, 2019; David *et al.*, 2020a). Ainsi, une souche de *P. aeruginosa* surproduisant de la pyoverdine de façon indépendante à la présence de fer a été construite au laboratoire par Sébastien Mathieu lors de son stage de Master 2 (Mathieu, 2019) et une première approche de mon travail de thèse a consisté à optimiser le procédé d'altération des déchets grâce à cette souche afin de développer un procédé de bioremédiation (Lemare *et al.*, 2022).

Partie II

Résultats et discussion

Chapitre 1

Ingénierie de la voie pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*

1 Introduction de l'article

Il est maintenant clairement admis que *P. aeruginosa* possède un potentiel d'altération de l'amiante native et des déchets amiantés notamment via la production de sidérophores (David *et al.*, 2021, 2020b, 2020a). En effet, les amiantes représentent une source de nutriments indispensables à la croissance bactérienne, à la fois grâce à leur matrice mais aussi leurs fibres, toutes deux riches divers éléments, notamment le magnésium et le fer. Cependant, du fait de la répression naturelle de la production de sidérophores par la bactérie en présence de fer, l'altération des amiantes s'est révélée limitée pour les souches sauvages (David and Geoffroy, 2020).

Afin de lever ce frein, nous décrivons dans cet article publié dans « Microbial Biotechnology », une stratégie d'ingénierie d'une souche de *P. aeruginosa* PAO1 permettant une production de PVD en présence de fer. La séquence promotrice, contenant la zone de régulation par le fer (aussi appelée FUR-box), du facteur de transcription PvdS impliqué dans la synthèse de la PVD est remplacé par un promoteur inductible à l'arabinose (AraC/pBAD). Cette construction permet ainsi la production de PVD indépendamment de la concentration en fer du milieu. La souche mutante ainsi obtenue est appelée PaM1.

Dans un premier temps, l'étude s'est focalisée sur la caractérisation du mutant PaM1 et notamment l'expression de sa voie PVD dans différentes conditions. Pour cela, un suivi de la croissance et la production de PVD par le mutant PaM1 et par la souche sauvage PAO1 ont été réalisés en présence de fer ou d'arabinose. Cela nous a permis de déterminer si PaM1 est capable de produire de la PVD en réponse à l'arabinose et d'estimer les quantités produites par rapport à la souche sauvage en absence de fer. Des analyses des transcrits de différents gènes de la voie PVD par RT-qPCR ont été réalisées en parallèle dans les mêmes conditions pour comparer l'expression des gènes de la voie PVD chez PaM1 et PAO1.

Après cette preuve de concept de la production de PVD en présence de fer par PaM1 obtenue, le second objectif de l'étude était de comparer l'altération de déchets amiantés de type flocage par PaM1 comparée à PAO1. Des déchets de flocage ont été incubés avec l'une ou l'autre des souches durant 5 cycles de 24 h dans un milieu carencé en fer et en magnésium. L'altération a été suivie par le dosage du fer et du magnésium dissous dans le surnageant de culture ou accumulés dans le culot

bactérien au cours de chaque cycle. L'extraction du fer et du magnésium des fibres a également été mesurée post-altération par MET-EDS.

2 Contribution des auteurs

J'ai contribué, à parts égales avec le Dr. Hélène Puja, à la mise en forme des résultats, leur interprétation et la rédaction de l'article. Le Dr. Sébastien David et moi-même avons réalisé toutes les expériences concernant l'altération de déchets de flocage tandis que le Dr. Hélène Puja a participé à la caractérisation du mutant PaM1 préalablement construit par Sébastien Mathieu (étudiant en Master 2). Le Dr. Dris Ihiawakrim a effectué les analyses MET-EDS sur les échantillons traités biologiquement. Le Dr. Valérie Geoffroy et le Dr. Coraline Rigouin ont participé à la rédaction et à la soumission de l'article.

Check for updates

microbial biotechnology

Open Access

Engineering siderophore production in *Pseudomonas* to improve asbestos weathering

Marion Lemare,[1,†] Hélène Puja,[1,†] Sébastien R. David,[1] Sébastien Mathieu,[1] Dris Ihiawakrim,[2] Valérie A. Geoffroy[1,*] and Coraline Rigouin[1,]**

[1]*Université de Strasbourg, CNRS-UMR7242, BSC, ESBS, 300 Bld Sébastien Brant, 67413, Illkirch, Strasbourg, France.*

[2]*Université de Strasbourg, CNRS-UMR7504, IPCMS, 23 Rue du Loess, BP, 43, 67034, Strasbourg, France.*

Summary

Iron plays a key role in microbial metabolism and bacteria have developed multiple siderophore-driven mechanisms due to its poor bioavailability for organisms in the environment. Iron-bearing minerals generally serve as a nutrient source to sustain bacterial growth after bioweathering. Siderophores are high-affinity ferric iron chelators, of which the biosynthesis is tightly regulated by the presence of iron. Pyoverdine-producing *Pseudomonas* have shown their ability to extract iron and magnesium from asbestos waste as nutrients. However, such bioweathering is rapidly limited due to repression of the pyoverdine pathway and the low bacterial requirement for iron. We developed a metabolically engineered strain of *Pseudomonas aeruginosa* for which pyoverdine production was no longer repressed by iron as a proof of concept. We compared siderophore-promoted dissolution of flocking asbestos waste by this optimized strain to that by the wild-type strain. Interestingly, pyoverdine production by the optimized strain was seven times higher in the presence of asbestos waste and the dissolution of magnesium and iron from the chrysotile fibres contained in flocking asbestos waste was significantly enhanced. This innovative mineral weathering process contributes to remove toxic iron from the asbestos fibres and may contribute to the development of an eco-friendly method to manage asbestos waste.

Received 2 October, 2021; accepted 25 May, 2022.
For correspondence. *E-mail valerie.geoffroy@unistra.fr.
**E-mail rigouin@unistra.fr; Tel: +33 (0)3 68 85 48 20.
†These two authors contributed equally to this work.
Microbial Biotechnology (2022) **0**(0), 1–13
doi:10.1111/1751-7915.14099
Funding Information
This work has been conducted under the framework of the IdEx Unistra supported by the Investments for the future programme of the French Government and partially funded by the agence nationale de la Recherche.

Introduction

In an aerobic environment at neutral pH, iron is poorly bioavailable, yet it is an important metal for microorganisms. In most natural habitats, iron, in its oxidized state (Fe^{3+}), forms stable ferric oxide hydrate complexes, lowering its solubility. As a consequence, soluble iron concentrations generally vary between 10^{-9} and 10^{-18} M (Miethke and Marahiel, 2007) while bacteria require between 10^{-5} and 10^{-7} M (Khan *et al.*, 2018) for their optimal growth. The main strategy developed by many organisms to access iron is the production of siderophores. Indeed, iron is an important nutrient involved as a cofactor of many bacterial enzymes and the redox properties of the metal are essential for many cellular processes. The response to iron must be tightly controlled by the cell, as excessive concentrations of intracellular iron may lead to oxidative stress (Andrews *et al.*, 2003). In this context, siderophores are key players in bacterial iron homeostasis (Cornelis *et al.*, 2011; Schalk *et al.*, 2011).

Siderophores can be classified into three groups based on the chemical nature of their chelating groups: catechol-type siderophores, hydroxamate-type siderophores and mixed-type siderophores (α-hydroxycarboxylate and 2-(2-hydroxyphenyl-oxazoline) (Ahmed and Holmström, 2014). More than 500 siderophores have been described and most of them have a peptide backbone and harbour functional groups that donate the oxygen ligands for Fe^{3+} coordination (Boukhalfa and Crumbliss, 2002). The affinity of siderophores for Fe^{3+} is high, varying from 10^{23} to 10^{52} M^{-1}, and they have been reported to also complex with other metals (*e.g.* Cu, Cd, Ni, Co, Zn, Al and Mn), macronutrients and radionuclides (Chen *et al.*, 1994; Braud *et al.*, 2010; Johnstone and Nolan, 2015; Williamson *et al.*, 2021).

Upon iron starvation, these secondary metabolites are synthesized in the cytoplasm and secreted into the medium where they chelate Fe^{3+}. The iron-complexed siderophore is then taken up *via* selective transport mechanisms involving TonB-dependant membrane receptors or membrane-associated reductase activity to

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

deliver the iron inside the cell (Gasser *et al*., 2015; Ringel *et al*., 2018; Josts *et al*., 2021). Once in the cell, both the siderophore and iron trigger various signalling pathways, allowing adaptation of the cell to the iron concentration, the ability to respond to oxidative stress and virulence (Khan *et al*., 2018). Ultimately, siderophores play an important role in infection for pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* or *Salmonella typhimurium* (Holden and Bachman, 2015). In the environment, siderophores produced by soil microorganisms participate in plant growth, the weathering of soil minerals and the biogeochemical cycling of iron (Kraemer, 2004; Ahmed and Holmström, 2014; Aznar and Dellagi, 2015).

As a result of these properties, siderophores have been used in biotechnology in many fields (Saha *et al*., 2016; Serrano, 2017; Albelda-Berenguer *et al*., 2019). In medicine, the chelating properties of siderophores are used to treat iron-overload disease (Hatzipantelis *et al*., 2014) and are exploited in bioimaging, biosensing and diagnosis (Petrik *et al*., 2017; Nosrati *et al*., 2018; Tonziello *et al*., 2019). In addition, their ability to cross bacterial membranes using specific transporters has led to the synthesis of siderophore-antibiotic conjugates that are able to hijack the iron-acquisition pathway to deliver antibiotics inside the cell (Mislin and Schalk, 2014; Saisho *et al*., 2018; Schalk, 2018). In agriculture, siderophores are used to promote plant growth (Serrano, 2017), as pathogen biocontrol agents (Gull and Hafeez, 2012) and in soil bioremediation for bioleaching (Williamson *et al*., 2021) or bioweathering (Ferret *et al*., 2014; David, *et al*., 2020b).

Recently, our group demonstrated the role of siderophores and siderophore-producing bacteria in asbestos weathering (David, *et al*., 2020a; David, *et al*., 2020b, 2020c). Asbestos is an industrial term for naturally occurring fibrous silicate minerals belonging to serpentine or amphibole groups. These minerals were widely used for 30 years due to their insulating, chemical and mechanical properties. Chrysotile, the single mineral species from the serpentine group, represents 95% of world production (Kanarek, 2011). Chrysotile is a hydrated magnesium silicate with the theoretical composition $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$. Its structure consists of a double layer made of an inner silicate layer and an outer magnesium hydroxide layer (brucite), in which the Si and Mg can be replaced by Fe^{3+} and Fe^{2+} respectively (Virta, 2002). However, exposure to asbestos fibres can cause serious health problems, such as fibrogenesis of the lung, pleural calcification, mesothelioma and ovarian or digestive system cancers (Scherpereel, 2016; Fiche toxicologique amiante, 2018). The toxicity of asbestos is partially due to the presence of iron in the inhaled fibres, which induces when dissolved the production of free radicals, causing DNA damage (Pascolo *et al*., 2013; Valko *et al*., 2016). Consequently, asbestos has been banned in many countries, generating a vast amount of asbestos-containing waste. Currently, most asbestos waste is typically disposed of in controlled landfill sites, although the toxicity and potential health and environmental risk of asbestos fibres remain (Spasiano and Pirozzi, 2017; Paolini *et al*., 2019). Because these minerals can represent an efficient source of nutrients for bacteria (David, *et al*., 2020a; David, *et al*., 2020c), the biological dissolution of asbestos fibres represents a tremendous opportunity to meet the demand for the eco-friendly management of asbestos wastes (Wallis *et al*., 2020).

Microorganisms, such as filamentous fungi (Daghino *et al*., 2006), rhizospheric bacteria (Rajkumar *et al*., 2009) and Gram-positive bacteria (Bhattacharya *et al*., 2016) have a common siderophore-driven mechanism to access iron from asbestos. Recently, David *et al*. (2020a; 2020c) showed the involvement of the bacterial siderophores produced by *Pseudomonas aeruginosa* in iron depletion from raw asbestos and wastes, such as flocking asbestos waste (FAW) and asbestos cement waste (ACW). The dissolution of the brucite layer, which potentially supplies Mg and/or Fe, was shown to be sufficient to sustain bacterial growth, confirming that asbestos minerals represent a bacterial nutrient source. Pyoverdine (PVD) is the main siderophore produced by *P. aeruginosa* (Budzikiewicz, 1997). More than a hundred structures of PVD has been described (Fuchs *et al*., 2001; Meyer *et al*., 2008) and several can efficiently dissolve iron from raw asbestos (David, *et al*., 2020c), as well as asbestos waste (David, *et al*., 2020a). In *Pseudomonas*, the biosynthesis of PVD is tightly regulated and directly dependent on the absence of iron (Schalk *et al*., 2020). The ferric uptake regulator (Fur) is the main regulator involved in PVD synthesis. Under iron-rich conditions, Fur binds to the promoter–operator region, a specific region of 19 bp located in between the −35 and − 10 regions of the promoter called Fur box and inhibits the transcription of the corresponding genes (Pohl *et al*., 2003; Hassan and Troxell, 2013). One of the Fur-controlled genes is *pvdS*, an extracytoplasmic sigma factor required for the transcription of a number of PVD-biosynthetic genes (Leoni *et al*., 2000). Due to such regulation, PVD production stops when a sufficient intracellular concentration of iron is reached, preventing the potential toxicity of high iron concentration.

When growing in an iron-depleted medium in the presence of the mineral, *P. aeruginosa* PAO1 synthesizes PVD, which dissolves the metal from the fibres. However, as the iron concentration increases, siderophore synthesis is repressed, thus preventing any further metal dissolution. Consequently, we hypothesized that the siderophore must be produced continuously for efficient

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

dissolution. Here, we describe the engineering of *P. aeruginosa* (PaM1) as a model to produce PVD independently of the iron concentration. We quantified the PVD production of this iron-independent siderophore-producing mutant and the effect of over-expression of the PvdS transcriptional regulator on two PVD biosynthetic genes, *pvdD* and *pvdA*, as representatives of the induction of the PVD pathway. This bioengineered strain demonstrates the potential of the PVD-weathering process on FAW, one of the most representative forms of asbestos waste. This anthropogenic material is mostly composed of chrysotile fibres (David, *et al*., 2020a) combined with a gypsum matrix, widely used for insulation in buildings. After the biological treatment of FAW, the amount of extracted iron and magnesium are measured as markers of fibre dissolution, together with the resulting fibre composition. We highlight how the regulation of PVD can be modulated to better fit with an efficient eco-process to remove the toxicity of asbestos fibres. This biotechnological advance should make it possible to avoid the continuing disposal of asbestos waste in landfills, which is the common practice today, and to consequently reduce this environmental problem. Given the major public health problem of asbestos and the lack of satisfactory treatment, our findings could have a significant societal impact.

Results

PaM1 produces pyoverdine in the presence of iron

To obtain a PVD production independent of iron, we built the mutant strain PaM1 in which the native Fur-box promoter region of *pvdS* is replaced by the arabinose-inducible promoter. The growth and PVD production of both the wild-type (PAO1) and mutant (PaM1) strains were then assessed. The presence of arabinose in the medium did not influence the growth of PAO1 and PaM1 (Fig. S1). On the contrary, the iron concentration clearly affected bacterial growth, with optimal growth obtained with 5 μM $FeCl_3$ (Fig. S2). We compared the PVD production of the two strains by analysing the amount of PVD relative to bacterial growth. PVD production was high for PAO1 when the iron concentration was <50 nM and decreased as the iron concentration increased (Fig. 1A), in accordance with the regulation of PVD being dependent on the absence of iron. By contrast, PVD production by PaM1 was low regardless of the iron concentration. We next assessed PVD production by PAO1 and PaM1 in increasing concentrations of arabinose (0 to 0.5%) (Fig. 1B). PVD production by PAO1 did not change, irrespective of the concentration of arabinose in the absence of iron. By contrast, PVD production by PaM1 significantly increased as the concentration of arabinose increased from 0.01% to 0.5%. Higher concentrations of arabinose (0.5 to 2%) were tested but did not significantly improve PVD production (data not shown). These experiments allowed us to determine an optimal concentration of arabinose for PVD production of 0.5%. Overall, these results show that PVD production by PaM1 is independent of iron and relies solely on the arabinose inducer in a dose-dependent manner.

To estimate the amount of PVD produced in optimal conditions for PaM1 and PAO1, strains were grown in rich or minimal medium, supplemented or not with 0.5% arabinose and/or 5 μM $FeCl_3$ (Fig. 2). In rich medium, the total amount of PVD measured for PAO1 was low (143 ± 12 mg l^{-1}) due to the presence of iron in the medium, whereas that for PaM1 reached 574 ± 10 mg l^{-1} when induced by arabinose. In minimal medium, the highest production was obtained for both strains in the iron-depleted and arabinose-supplemented condition: PAO1 produced 529 ± 9 mg l^{-1} and PaM1 574 ± 4 mg l^{-1}. Overall, these results show that PaM1 can produce a high amount of PVD in both rich and minimal media. In addition, our data show that the arabinose-dependent PVD production of PaM1 is not significantly different from that of PAO1 under conditions of iron restriction.

Transcription of pvdS *increases in PaM1 following arabinose induction*

We first assessed *pvdS* transcript levels in PaM1 and in PAO1 relative to that of PAO1 in *pvdS*-repressed condition (CAA with iron) (Fig. 3A). In PAO1, the level of *pvdS* transcripts was 123-fold higher in the absence of iron than in its presence. For PaM1 without arabinose, the level of *pvdS* transcripts was higher than that of repressed PAO1, suggesting leakage in the induction system. The addition of 0.5% arabinose triggered an increase in the level of *pvdS* transcripts in PaM1 by ≃ 1100-fold, which was significantly higher than in PAO1 in the absence of iron. Of note, controls showed that the exposure of PAO1 to arabinose or PaM1 to iron had no significant impact on the level of *pvdS* transcripts. This strongly shows that modification of the regulation of *pvdS* transcription in PaM1 allows the overproduction of transcripts in the presence of the arabinose inducer.

We then monitored the transcription of *pvdD* and *pvdA* (Fig. 3B and C respectively), two genes under the control of PvdS and involved in PVD biosynthesis. We measured a ≃ 250-fold increase in *pvdD* transcript levels for PaM1 when *pvdS* was induced by arabinose, with no significant difference relative to the number of *pvdS* transcripts in PAO1 under induced conditions. We observed the same tendency for *pvdA* transcription, for which there was no significant increase in *pvdA* transcript levels in PaM1 relative to PAO1 under induced

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

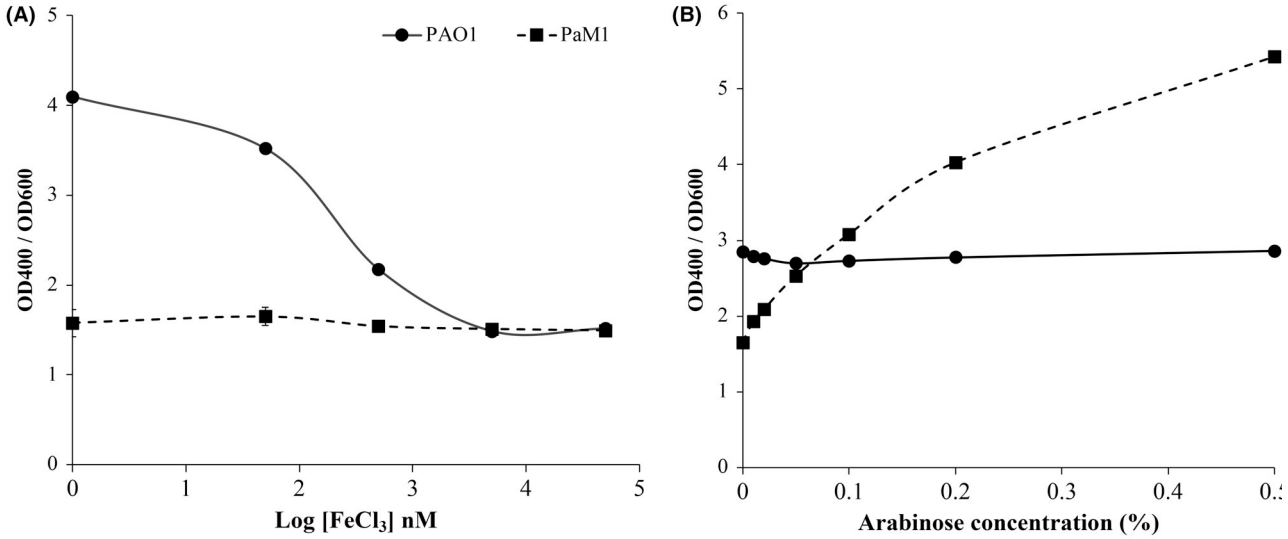


Fig. 1. Pyoverdine production relative to growth (OD400/OD600) after 9 h of incubation at 30°C for the strains *P. aeruginosa* PAO1 (solid line) and PaM1 (dashed line) depending on iron concentration (nM) (A) or arabinose concentration (% v/v) (B).

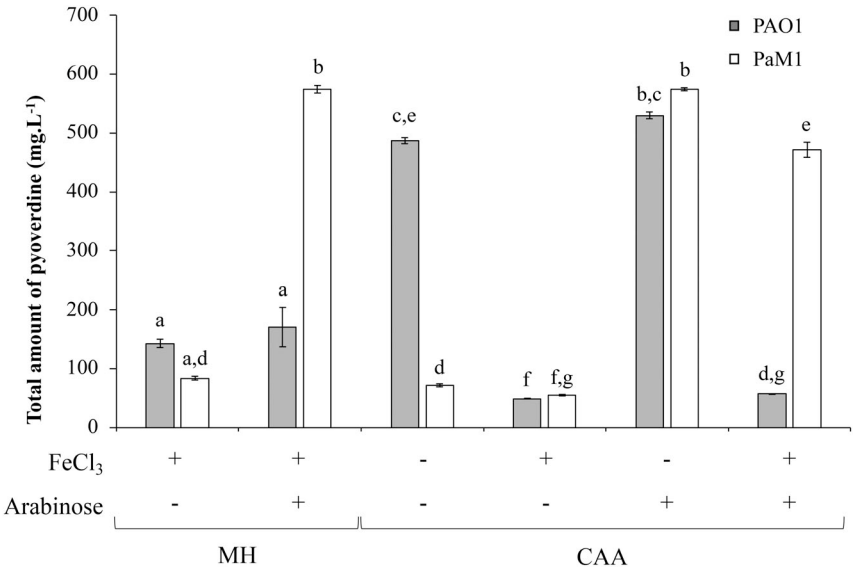


Fig. 2. Pyoverdine production of *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars) assessed after 24 h of growth in rich (MH) or minimal (CAA) medium supplemented or not with iron (5 μM FeCl3) and/or arabinose (0.5%). Error bars indicate the standard error over mean of triplicates experiments. Kruskal–Wallis non-parametric test was used to calculate statistically significant differences. Letters (a to g) above the bars represent the result of the test: bars harbouring the same letter(s) are not statistically different ($P \geq 0.05$).

conditions (with arabinose and without iron respectively). Overall, these results show that although more *pvdS* transcripts are generated, the expression of genes under its control does not increase accordingly.

Pyoverdine production by PaM1 increases in the presence of asbestos waste

We evaluated the efficiency of the asbestos waste weathering by growing both PAO1 and PaM1 in the presence of FAW. The bacterial cell number after each cycle of incubation was significantly higher in the presence of FAW for PAO1 and PaM1 (Fig. 4). The growth was even higher when the cells were grown in Mg-supplemented CAA medium (data not shown). These results confirm the previous observations of David *et al.* (2020a) and prove that the stimulation of bacterial growth is due to the dissolution of nutrients from the fibres (release of iron and magnesium from the fibres). The monitoring of PVD produced by the two strains after

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

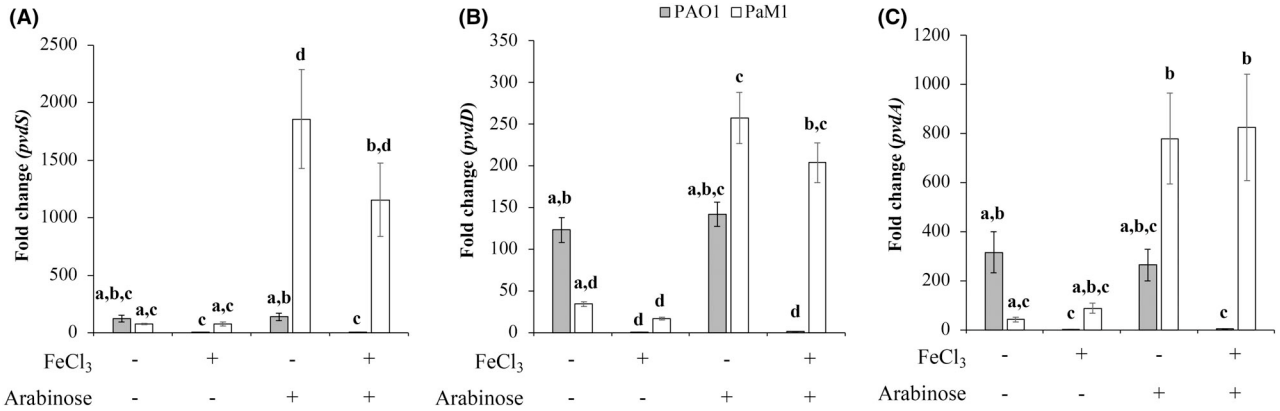


Fig. 3. Relative transcript levels of genes involved in pyoverdine biosynthesis for *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). Transcript level of pvdS (A), pvdD (B) and pvdA (C) relative to the levels measured in PAO1 grown in CAA + FeCl3 are shown. Error bars indicate the standard error over mean of triplicates experiments. Kruskal–Wallis non-parametric test was used to calculate statistically significant differences. Letters (a to d) above the bars represent the result of the test: bars harbouring the same letter(s) are not statistically different ($P \geq 0.05$).

each growth cycle showed its production by PAO1 to be low in CAA(-Mg) (<5 mg·L^{-1}) and to increase to ≃ 40 mg·L^{-1} in the presence of FAW (Fig. 5). This difference can be explained by the stimulation of growth in the presence of FAW, leading to a global increase in PVD production. The observed weak PVD synthesis by PAO1 is due to the repression exerted by the dissolved iron from asbestos. Interestingly, the amount of PVD produced by PaM1 was significantly higher than that by PAO1, independently of the presence of FAW (Fig. 5). This difference cannot be due to differences in growth, as both strains grew equally (Fig. 4 and S3). Moreover, PVD production by PaM1 was elevated for each cycle, unlike that of PAO1 which remained close to the detection limit. In the presence of FAW, PVD production by PaM1 was high during the first two cycles and reached 523 ± 23 mg·L^{-1} at cycle 2 and then gradually decreased with the number of cycles. Overall, PVD production by PaM1 at the end of the five cycles was ≃ 7-fold higher than the wild-type strain, even though the number of cells at the end of each growth cycle was equivalent between the two strains.

Enhancement of iron and magnesium dissolution from asbestos waste by PaM1

We measured the amount of magnesium and iron in both the supernatant and cells to estimate the dissolution of iron and magnesium from the fibres at the end of each growth cycle (Fig. 6). Overall, the amount of iron

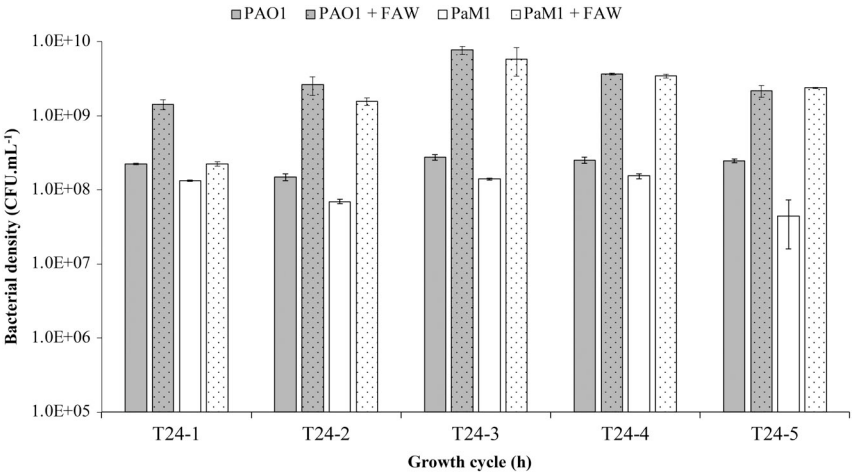


Fig. 4. Numeration of *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). The number of cells (CFU ml^{-1}) was assessed during five growth cycles of 24 h (T24-1 to T24-5) in CAA medium without magnesium CAA(-Mg) supplemented with arabinose, in the presence (dots) or absence (plain) of flocking asbestos wastes. Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

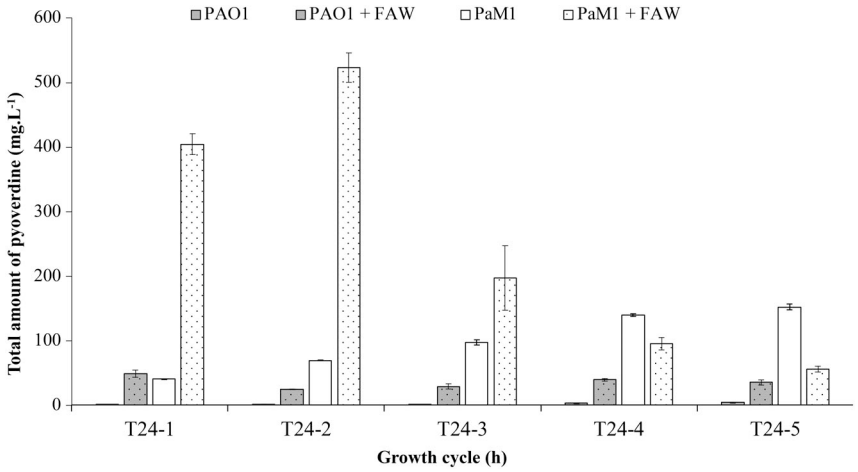


Fig. 5. Pyoverdine production of *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). The concentration of pyoverdine (mg l^{-1}) was assessed during five growth cycles of 24 h (T24-1 to T24-5) in CAA medium without magnesium CAA(-Mg) supplemented with arabinose (1%), in the presence (dots) or absence (plain) of flocking asbestos wastes. Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

and magnesium dissolved from FAW was higher for PaM1 than PAO1. The highest level of extraction was measured for cycles 1 and 2 for magnesium and cycles 2 and 3 for iron, suggesting that the extraction begins with magnesium. In addition, iron and magnesium mainly accumulated in the supernatant, particularly during the early cycles for PaM1. After cycle 5, although the amount of iron and magnesium measured was significantly lower, both elements were still extracted, suggesting that additional cycles could favour further extraction. Overall, a total of 64 ± 8 μg of iron was extracted from FAW by PAO1 and 100 ± 10 μg by PaM1 after five cycles, representing an extraction of 7.0 ± 0.9% and 10.9 ± 1.1% respectively. Concerning magnesium, 534 ± 128 μg was extracted from FAW by PAO1 and 1004 ± 125 μg by PaM1, representing an extraction of 3.6 ± 0.9% and 6.8 ± 0.8% respectively. In conclusion, PaM1 can extract significantly more iron and magnesium from FAW fibres than PAO1.

Analysis by STEM-EDX of the chrysotile fibres after the short-term weathering of FAW showed the iron composition in almost all fibre areas to be <1% (Fig. S4A–F). We measured a lower mass % of iron after alteration by PaM1 than by PAO1 (0.9% and 1.3% respectively), confirming a higher iron extraction by the mutant strain (Fig. S4E). Furthermore, the percentage of iron could be extremely low, close to zero, especially at the end of the fibres. The Fe/Si atomic ratio showed the same trend, with 0.029 (PAO1) versus 0.022 (PaM1), confirming the active dissolution of iron driven by the bacteria (Fig. S4F). Moreover, we observed a greater decrease in silicon content after alteration by PaM1 (40.29%) than by PAO1 (43.62%) (Fig. S4E), suggesting that silicon dissolution from asbestos fibres may be another reliable marker for bacterial weathering.

Discussion

Here, we describe the modification of the regulation of PVD production in *Pseudomonas aeruginosa* to improve asbestos weathering. Replacement of the iron-responsive promoter region of *pvdS* by an inducible promoter rendered the production of PVD dependent on solely the inducer. We chose to use the AraC/pBAD promoter because it is widely used for the controlled expression of proteins in several microorganisms (Balzer *et al.*, 2013), in particular, *Pseudomonas aeruginosa* (Qiu *et al.*, 2008; Huse *et al.*, 2013; Pasqua *et al.*, 2017). The use of this promoter is this relevant to establish the proof of concept that PVD production can be modulated by a stimulus other than iron. Other types of promoters, such as constitutive promoters, are worth trying (Zobel *et al.*, 2015; Elmore *et al.*, 2017) to prevent (i) the perturbation of metabolism that inducers such as arabinose may have on the strain and (ii) excessive cost if the process is transferred to a larger scale. In our study, the measurement of *pvdS* transcript levels in the engineered strain PaM1 provides evidence that AraC/pBAD works efficiently in *P. aeruginosa*. We obtained higher levels of *pvdS* transcripts in PaM1 upon induction with 0.5% arabinose than in PAO1 under iron depletion. The difference can be attributed to the strong repression of *pvdS* exerted by the entry of iron into the cell resulting from PVD production in PAO1, whereas no repression occurs in PaM1, allowing a constant increase in transcript levels during growth. However, although *pvdS* transcript levels were higher, we did not measure a

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

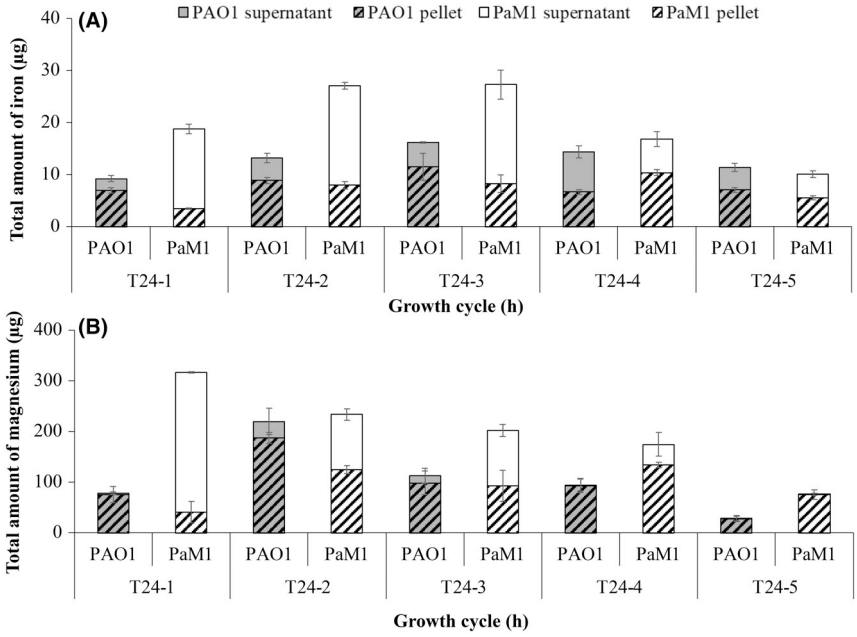


Fig. 6. Amount of iron (A) and magnesium (B) extracted from raw asbestos waste by *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). The quantity of iron and magnesium (µg) was assessed during five growth cycles of 24 h (T24-1 to T24-5) in CAA medium without magnesium CAA(-Mg) supplemented with arabinose, in the presence of flocking asbestos wastes. Elements were measured in the bacterial cells (pellet, dashed) and supernatant (plain). Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

corresponding increase in the transcription of the *pvdD* or *pvdA* genes, of which the transcription relies on *pvdS*. As a consequence, the amount of PVD produced by PaM1 was not significantly higher than that for PAO1 under these conditions. This highlights the fact that the efficiency of PVD synthesis is likely already optimal in PAO1 under iron-depleted conditions.

Our data provide evidence that overproduction of the sigma factor PvdS does not impair *P. aeruginosa* growth. Of note, as PvdS controls the transcription of several virulence factors (Ochsner *et al.*, 1996; Wilderman *et al.*, 2001), its overproduction may have an impact on PAO1 behaviour under conditions of infection. In this study, we focused on the model strain PAO1 because it showed the best asbestos weathering in our previous study (David, *et al.*, 2020b). However, the use of an opportunistic pathogen is not suitable for developing an innocuous process to manage untreated asbestos waste. We are currently implementing the strategy using a non-pathogenic *Pseudomonas* species, such as *P. putida*, of which PVD biosynthesis is also under the Fur repressor (Venturi *et al.*, 1995). *P. putida* has been used as a chassis strain for the production of recombinant proteins and polymers (Nikel *et al.*, 2016) and has been widely used in bioremediation strategies (Kahlon, 2016). Although the regulation of PVD synthesis has not been completely described, pvdS transcription has been engineered and has led to the constitutive production of PVD (Becker *et al.*, 2018). Whether PVD production in *P. putida* can lead to efficient asbestos weathering is under assessment.

We tested the hypothesis that iron-independent PVD production can improve metal dissolution from asbestos fibres by growing the engineered PaM1 strain in the presence of one of the most representative forms of asbestos waste: FAW. First, our work confirms that FAW stimulates the growth of *Pseudomonas* strains through iron and Mg dissolution from the fibres, as already described by David et *al.* (2020a). The level of these elements in asbestos is several thousand times higher (personal data) than that required by *Pseudomonas aeruginosa* for optimal growth (56 µg l^{-1} Fe^{3+} and 200 µg l^{-1} Mg^{2+}) (Heldal *et al.*, 1985; Groisman *et al.*, 2013). This gap between metal availability and requirement suggests that multiplication of the bacteria may not be sufficient to dissolve all the magnesium and iron contained in the fibres, as the wild-type strain will not accumulate these elements beyond their potential toxic levels. Thus, the use of metabolic engineering strategies to modify bacterial metal homeostasis can lead to an improvement in the extraction performance of the bacteria (Diep *et al.*, 2018). In *Pseudomonas*, Mg^{2+} uptake takes place via activation of the PhoP/PhoQ two component system in Mg^{2+}-limiting environments and such passive transport occurs mainly via porins (McPhee *et al.*, 2006). There is no evidence that PVD can chelate Mg^{2+}. Therefore, we previously hypothesized that Mg^{2+} is dissolved when the fibres are introduced into aqueous

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

solution (David, *et al*., 2020a). Mg^{2+} dissolution could be the first step of alteration of the fibres and may trigger weakening of the fibre structure, facilitating access of the PVD to the deeper iron-containing layers. Iron uptake, however, involves active transporters and requires the production of siderophores (Cunrath *et al*., 2016). Iron extraction may thus constitute the second step of the alteration, promoting further destructuration of the fibre, thus allowing more magnesium dissolution and iron extraction. Our data with the mutant PaM1 support this hypothesis, as the enhancement of PVD production directly correlated with an increase in both iron and magnesium dissolution (Fig. 6).

When PaM1 was grown in the presence of arabinose and FAW, the production of PVD was almost seven times higher than that of PAO1. This higher PVD concentration led, however, to only a two-fold increase in iron and magnesium extraction. This implies that all the PVD is not involved in Fe^{3+} chelation. Indeed, we estimated that only 23% (for PAO1) and 12% (for PaM1) of PVD is complexed with iron. This suggests that either PVD is complexed to another metal or that the iron contained in the fibres is not accessible to PVD (because of the structure of the fibres or because of PVD adsorption to the fibres). Indeed, PVD can be adsorbed onto the surface of iron-bearing minerals, such as metal oxides (Upritchard *et al*., 2007) or smectite (Ferret *et al*., 2014), which may lead to modification of the surface structure. Although arabinose stimulated the production of PVD from PaM1 in the first two growth cycles, our results showed a decrease of PVD in solution from cycles 2 to 5, together with a decrease in magnesium and iron extraction. Changes in fibre morphology may lead to lower availability of iron to PVD, explaining this tendency. Another hypothesis to explain such a decrease could be the formation of a biofilm on the asbestos fibres after a few cycles. *P. aeruginosa* is a biofilm-forming bacteria that produces exopolysaccharides (EPS) responsible for iron sequestration by PVD trapped in this matrix. Such interface could constitute a barrier to deterioration, both by the presence of EPS, which creates a physical barrier between the fibre and the solution, and by the nature of the EPS, which has the property of complexing with the dissolved elements. Such phenomena have been observed during the alteration of bottom ash by *Pseudomonas*, in which the establishment of a biofilm reduced the rate of alteration (Aouad *et al*., 2008). Whether this is the case with *P. aeruginosa* grown with FAW has yet to be determined.

Finally, we show that the improvement in iron extraction by PVD is not toxic for the bacteria. Our data provide evidence that iron does not accumulate in the cell but rather in the external medium. As high iron concentrations are toxic for the cell, protection from internal toxic iron concentrations by the regulator Fur persists, even in PaM1, in which the main iron acquisition system (PVD) is overexpressed. Of note, aside from PVD, the second endogenous siderophore, pyochelin (PCH), has already been shown to be involved in asbestos–iron dissolution (David, *et al*., 2020c), as well as that of organic acids (Mohanty *et al*., 2018). Indeed, it has been reported that *P. aeruginosa* in iron-containing medium produces more PCH than PVD (Cunrath *et al*., 2016). The role of PCH in iron extraction by PAO1 and PaM1 in the presence of FAW has yet to be assessed but may be another pathway to explore and engineer to enhance the alteration of asbestos fibres. In this context, transcriptomic analysis may improve our understanding of the mechanisms required for iron extraction in the presence of asbestos fibres and, more generally, of other metabolic pathways involved in asbestos weathering by *P. aeruginosa*.

Overall, we describe an original approach to improve the alteration of asbestos by bacteria. Given the major public health problem of asbestos and the lack of efficient waste management, this work demonstrates a low-energy and low-cost approach that could lead to a sustainable process that may have significant and beneficial societal repercussions. This strategy has the potential to be extended to other types of asbestos waste (such as asbestos cement) and more generally to bioleaching strategies (Williamson *et al*., 2021) for which the improvement of siderophore production may greatly improve the extraction capacity of bacteria.

Experimental procedures

Asbestos waste preparation

The flocking asbestos waste used in this study was obtained from the asbestos removal site of Jussieu University of Paris and kindly provided by the Mediterranean Company of Zeolites (SOMEZ). The asbestos waste consisted of chrysotile associated with a gypsum matrix. Asbestos samples (0.2 g) were sterilized by autoclaving (121°C for 20 min) and incubated at 70°C for 14 days before experimentation for complete sterilization of the material. Before experiments, samples were washed with 20 ml of sterile casamino acids medium without magnesium to remove free iron and magnesium.

Construction of the mutant PaM1

We chose to modify the promoter region of *pvdS* to render PVD production independent of iron. The promoter region was removed and replaced by the inducible promoter AraC/pBAD (Newman and Fuqua, 1999). Replacement of the promoter region was performed by

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

inserting the suicide vector carrying the substitution (pEXG2::AraC/pBAD*pvdS)* in the PAO1 strain, followed by homologous recombination. To construct the plasmid (pEXG2::AraC/pBAD*pvdS*), two regions of 700 pb flanking the promoter region of *pvdS* were PCR-amplified from genomic DNA with Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the primers pvdSam_F and pvdSam_R and pvdSav_F and pvdSav_R (Table S1). The promoter region of AraC/pBAD was amplified from plasmid pBAD24 using the primers pBad_F and pBad_R. Primers were designed to contain an additional 15 bp of homology with the end of the two amplified regions flanking the *pvdS* promoter. A fusion PCR was carried out to assemble the three fragments and reconstitute the substitution cassette. The cassette was then digested with EcoRI and XhoI (Thermo Fisher Scientific) and inserted by ligation into the plasmid pEXG2 (Rietsch *et al*., 2005) already digested with the same restriction enzymes to obtain the final plasmid pEXG2::AraC/pBAD*pvdS*. TOP10 cells were then transformed with this plasmid and used in triparental conjugation with *P. aeruginosa* PAO1 as the receiver strain and *E. Coli* HB101 (Boyer and Roulland-dussoix, 1969) as the helper strain. A two-step process allows allelic exchange between the vector and the chromosome mediated by homologous recombination (Hmelo *et al*., 2015). Briefly, for the triparental conjugation, the strains were grown overnight at 37°C without antibiotics and 500 μl of each culture was mixed and gently pelleted. The pellet was then resuspended in 50 μl of fresh Luria Bertani broth (LB)-rich medium and plated on an LB plate before incubating for 5 h at 37°C. The resulting biofilm-forming colony was recovered with an inoculation loop, resuspended in 1 ml LB, and 100 μl spread on LB plate with 30 μg ml^{-1} gentamycin (Gm) and 10 μg ml^{-1} chloramphenicol (Chl) to select for plasmid integration. After 2 days of incubation at 37°C, colonies were grown for 4 h in 1 ml LB broth, pelleted, resuspended in 50 μl fresh LB medium and streaked onto LB agar with 6% (w/v) sucrose for counter-selection to force plasmid excision. Colonies that lost Gm resistance were selected and the substitution was verified by PCR and sequencing (Eurofins genomic) using the primers pvdSam_F and pvdSav_R (Table S1).

Growth conditions and pyoverdine production

The two *P. aeruginosa* strains PAO1 and PaM1 were grown routinely for 24 h at 30°C in LB with shaking (220 rpm). To assess PVD production, pre-cultured cells were harvested and washed twice with sterile iron-poor CAA medium (composition in g l^{-1}: casamino acids 5, K_2HPO_4.3 H_2O 1.46, $MgSO_4$.7 H_2O 0.25) or rich Mueller Hinton medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). After overnight culture, the cells were pelleted by centrifugation at 9871 *g* for 5 min, washed twice with sterile CAA or MH and adjusted to an OD_{600} of 0.05. The culture was optionally supplemented with arabinose (0.5% w/v) and/or $FeCl_3$ (for a final concentration of 5 μM $FeCl_3$). For the 24-h kinetic assays, the cell culture was performed in a 96-well U-bottom microplate at 30°C for 24 h. The bacterial density and PVD were measured directly with a TECAN microplate reader every 30 min at OD_{600} and OD_{400}, respectively, after a short orbital shaking of 10 s. For end-point experiments in 50-ml Falcon tubes, cultures were incubated in a shaker (220 rpm) at 30°C. After 24 h and 48 h of culture, the OD_{600} was measured in a spectrophotometer (Biophotometer Eppendorf). The OD_{400} of the supernatant was measured after centrifugation (5 min at 9871 *g*) of the culture (SPECORD 205 Analytik Jena). To measure iron and magnesium depletion from asbestos, cells from an LB-pre-culture were washed once in sterile CAA medium without magnesium (CAA(-Mg)). For bacterial suspensions, cells were washed once with sterile CAA(-Mg). The cell density was adjusted to an OD_{600} of 0.1, corresponding to 1–2 x 10^8 CFU ml^{-1}, and the cells diluted to obtain a starting inoculum between 6 x 10^4 and 1 x 10^5 CFU ml^{-1}. The culture was supplemented with arabinose (1%) in the presence or absence of FAW. Cultures were incubated for 24 h at 30°C with shaking (200 rpm).

Measurement of gene expression by RT-qPCR

Total RNA was extracted from mid-log phase bacterial cultures (OD_{600} = 0.5 to 1), after 8 h of incubation in CAA optionally supplemented with 5 μM $FeCl_3$ or 0.5% (w/v) arabinose, using the RNeasy MiniKit and QiaShredder columns (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. An additional double DNAse treatment was performed on the column and the eluate directly using RNase-Free DNase Set (Qiagen). A total of 1 μg of purified RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA). The cDNA levels of the genes *pvdS, pvdD and pvdA* were measured using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Step one plus real time PCR System) with appropriate primers (Table S1). The transcript levels of interest were normalized against that of the *uvrD* gene, used as an internal control (Jo *et al*., 2003; Jeannot *et al*., 2005) and expressed as the ratio to the mRNA expressed in strain PAO1 grown in CAA without supplementation. Gene expression values were calculated, using an improved version of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method for quantitative real-time

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

polymerase chain reaction data analysis, from three independent experiments (Rao *et al*., 2013).

Alteration of flocking asbestos waste by Pseudomonas aeruginosa

To alter FAW, *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PaM1 were cultured for five renewal cycles of 24 h at 30°C with shaking (220 rpm). Bacterial suspensions (20 ml), prepared in CAA(-Mg) as described previously, were added to FAW samples (0.2 g). Assays were performed in triplicate. Bacterial enumeration was performed at the end of every cycle by serial dilution-plating on LB agar and the plates were incubated at 30°C for 24 h. The 20-ml assays were then gently centrifuged for 5 min at 67 *g* to separate the bacterial cells from the asbestos fibres. An aliquot of 10 ml was removed and the remaining 10 ml diluted four times as follows: addition of 20 ml of sterile CAA(-Mg), centrifugation for 5 min at 67 *g* to separate the bacterial cells from the asbestos fibres and elimination of 20 ml of bacterial cells. Then, 10 ml of sterile CAA(-Mg) was added to perform a new cycle.

The iron and magnesium content in the cells and supernatants, as well as the amount of PVD in the supernatant were measured on the removed 10 ml, which were centrifuged for 10 min at 9871 *g* and the supernatant was filtered (0.22 μm porosity). Bacterial pellets were washed once with ultrapure water and dried at 50°C for 48 h. Dried pellets were mineralized by incubation in 77 μl 65% (v/v) HNO_3 for 48 h at room temperature. The volume was brought to 5 ml with ultrapure water to obtain 1% HNO_3 and the samples filtered through a membrane with a 0.22 μm filter unit. The iron and magnesium content were measured by colorimetric assay (see below) and the amount of PVD in solution in the supernatant was calculated from the absorbance at 400 nm using the extinction coefficients $\varepsilon = 19\,000$ (M) cm^{-1} (Meyer and Abdallah, 1978; Albrecht-Gary *et al*., 1994).

Iron and magnesium assay

The sensitive bathophenanthroline colorimetric method was used to determine the ferrous iron content of each sample (Baumann *et al*., 2019). The addition of thioglycolic acid converts ferric iron to ferrous iron to determine total iron content. Each sample was analysed in triplicate as follows: to each well of a 96-well plate (PS flat-bottom microplate, Greiner, San Jose, CA, USA), 20 μl of sample, 40 μl of saturated sodium acetate (5.5 M) (Sigma-Aldrich [Merck], Darmstadt, Germany), 80 μl of cold distilled water, 10 μl of thioglycolic acid (10% in distilled water) (Sigma-Aldrich) and 10 μl of bathophenanthroline (0.5% in distilled water) (Sigma-Aldrich) were added. After shaking, the microplates were stored overnight at 4°C. After shaking, the absorbance was measured at 535 nm using a Tecan microplate reader (Infinite 200 Pro; Tecan, Männedorf, Switzerland). Iron content (μg) was determined by comparing the values to a $FeCl_3$ standard reference curve. For magnesium content, the calmagite method was used (ELITech magnesium calmagite kit, San Jose, CA, USA). Ethylene glycol tetra acid (EGTA) was added to eliminate any interfering calcium, allowing calmagite to form a stable coloured complex with magnesium only. The reactive solution was prepared by mixing one volume of reagent 1 (1 M 2-methyl-2-amino-1-propanol and 215 μM EGTA) with one volume of reagent 2 (300 μM calmagite). Samples were analysed in triplicate in a 96-well plate (Greiner; PS flat-bottom microplate). In each well, 3 μl of sample were mixed with 300 μl of the reactive solution. After shaking and 30 s of incubation, the absorbance was measured at 500 nm using a Tecan microplate reader (Infinite 200 Pro; Tecan). Magnesium content (μg) was determined by comparing the values to a calibration curve established with known concentrations of $MgSO_4$.

STEM-EDX of asbestos fibres

TEM (Transmission Electron Microscopy) images were recorded with a JEOL 2100 microscope with a 200 kV potential applied to a LaB6 filament as an electron source. Resolution of the TEM was 0.21 nm. TEM mapping was performed in STEM (scanning transmission electron microscopy) mode (resolution 2 nm), using an SSD-EDX (silicon drift detector-energy dispersive X-ray) spectrometer to determine the chemical composition.

Statistical analysis

Results presented in all figures correspond to the mean values of three replicates. Significant statistical differences between values were determined using the Kruskal–Wallis test (R version 1.0.153), followed by a Conover post-hoc analysis. Results of the statistical analysis are given with letters: bars harbouring the same letter(s) are not significantly different, bar harbouring different letters are significantly different ($P \geq 0.05$).

Acknowledgements

This work has been conducted under the framework of the IdEx Unistra supported by the Investments for the future programme of the French Government and partially funded by the agence nationale de la Recherche. The authors thank the support of the French R&D plan for asbestos removal (PRDA) and SOMEZ (Mediterranean Company of Zeolites).

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest to declare.

References

Ahmed, E., and Holmström, S.J.M. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *J Microbial Biotechnol* **7:** 196–208.

Albelda-Berenguer, M., Monachon, M., and Joseph, E. (2019) Chapter Five - Siderophores: From natural roles to potential applications. In *Advances in Applied Microbiol*. Gadd, G.M., and Sariaslani, S. (eds). Cambridge, MA: Academic Press, pp. 193–225.

Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33:** 6391–6402.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quiñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27:** 215–237.

Aouad, G., Crovisier, J.-L., Damidot, D., Stille, P., Hutchens, E., Mutterer, J. *et al*. (2008) Interactions between municipal solid waste incinerator bottom ash and bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*). *Sci Total Environ* **393:** 385–393.

Aznar, A., and Dellagi, A. (2015) New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *J Exp Bot* **66:** 3001–3010.

Balzer, S., Kucharova, V., Megerle, J., Lale, R., Brautaset, T., and Valla, S. (2013) A comparative analysis of the properties of regulated promoter systems commonly used for recombinant gene expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **12:** 26.

Baumann, B.H., Shu, W., Song, Y., Sterling, J., Kozmik, Z., Lakhal-Littleton, S., and Dunaief, J.L. (2019) Liver-specific, but not retina-specific, hepcidin knockout causes retinal iron accumulation and degeneration. *Am J Pathol* **189:** 1814–1830.

Becker, F., Wienand, K., Lechner, M., Frey, E., and Jung, H. (2018) Interactions mediated by a public good transiently increase cooperativity in growing *Pseudomonas putida* metapopulations. *Sci Rep* **8:** 4093.

Bhattacharya, S., Ledwani, L., and John, P.J. (2016) Siderophores, the answer for micro to nanosized asbestos fibre related health hazard. 1724: 020102.

Boukhalfa, H., and Crumbliss, A.L. (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **15:** 325–339.

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

Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol Rep* **2:** 419–425.

Budzikiewicz, H. (1997) Siderophores of fluorescent *Pseudomonads*. *Z Für Naturforschung C* **52:** 713–720.

Chen, Y., Jurkevitch, E., Bar-Ness, E., and Hadar, Y. (1994) Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Sci Soc Am J* **58:** 390–396.

Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C., and Vinckx, T. (2011) Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **3:** 540–549.

Cunrath, O., Geoffroy, V.A., and Schalk, I.J. (2016) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ Microbiol* **18:** 3258–3267.

Daghino, S., Turci, F., Tomatis, M., Favier, A., Perotto, S., Douki, T., and Fubini, B. (2006) Soil fungi reduce the iron content and the DNA damaging effects of asbestos fibers. *Environ Sci Technol* **40:** 5793–5798.

David, S.R., Fritsch, S., Forster, A., Ihiawakrim, D., and Geoffroy, V.A. (2020) Flocking asbestos waste, an iron and magnesium source for *Pseudomonas*. *Sci Total Environ* **709:** 135936.

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., and Geoffroy, V.A. (2020a) Efficiency of pyoverdines in iron removal from flocking asbestos waste: an innovative bacterial bioremediation strategy. *J Hazard Mater* **394:** 122532.

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., and Geoffroy, V.A. (2020b) Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*. *J Hazard Mater* **385:** 121563.

Diep, P., Mahadevan, R., and Yakunin, A.F. (2018) Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Front Bioeng Biotechnol* **6:** 157.

Elmore, J.R., Furches, A., Wolff, G.N., Gorday, K., and Guss, A.M. (2017) Development of a high efficiency integration system and promoter library for rapid modification of *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab Eng Commun* **5:** 1–8.

Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., and Geoffroy, V.A. (2014) Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environ Microbiol Rep* **6:** 459–467.

Fiche toxicologique Amiante (2018) *Fiche toxicologique amiante (No. 145)*. Paris, France: INRS.

Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V., and Meyer, J.-M. (2001) Siderotyping a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr Top Med Chem* **1:** 31–57.

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

Groisman, E.A., Hollands, K., Kriner, M.A., Lee, E.-J., Park, S.-Y., and Pontes, M.H. (2013) Bacterial Mg^{2+} homeostasis, transport, and virulence. *Annu Rev Genet* **47:** 625–646.

Gull, M., and Hafeez, F.Y. (2012) Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. *Afr J Microbiol Res* **6:** 6308–6318.

Hassan, H., and Troxell, B. (2013) Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3:** 59.

Hatzipantelis, E.S., Karasmanis, K., Perifanis, V., Vlachaki, E., Tziomalos, K., and Economou, M. (2014) Combined chelation therapy with deferoxamine and deferiprone in β-thalassemia major: compliance and opinions of young thalassemic patients. *Hemoglobin* **38:** 111–114.

Heldal, M., Norland, S., and Tumyr, O. (1985) X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

elemental content of individual bacteria. *Appl Environ Microbiol* **50:** 1251–1257.
Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S. *et al*. (2015) Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nat Protoc* **10:** 1820–1841.
Holden, V.I., and Bachman, M.A. (2015) Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* **7:** 986–995.
Huse, H.K., Kwon, T., Zlosnik, J.E.A., Speert, D.P., Marcotte, E.M., and Whiteley, M. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* enhances production of a non-alginate exopolysaccharide during long-term colonization of the cystic fibrosis lung. *PLOS One* **8:** e82621.
Jeannot, K., Sobel, M.L., El Garch, F., Poole, K., and Plésiat, P. (2005) Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* **187:** 5341–5346.
Jo, J.T.H., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. (2003) Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **47:** 1101–1111.
Johnstone, T.C., and Nolan, E.M. (2015) Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans* **44:** 6320–6339.
Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I.J., and Tidow, H. (2021) Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* **118:** e2101952118.
Kahlon, R. (2016) Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*.
Kanarek, M.S. (2011) Mesothelioma from Chrysotile Asbestos: Update. *Ann Epidemiol* **21:** 688–697.
Khan, A., Singh, P., and Srivastava, A. (2018) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: a review. *Microbiol Res* **212–213:** 103–111.
Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* **66:** 3–18.
Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., and Visca, P. (2000) Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182:** 1481–1491.
McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D. *et al*. (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg^{2+}-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188:** 3995–4006.
Meyer, J.M., and Abdallah, M.A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology* **107:** 319–328.
Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., and Budzikiewicz, H. (2008) Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **21:** 259–271.
Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71:** 413–451.
Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2014) Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Met Integr Biometal Sci* **6:** 408–420.
Mohanty, S.K., Gonneau, C., Salamatipour, A., Pietrofesa, R.A., Casper, B., Christofidou-Solomidou, M., and Willenbring, J.K. (2018) Siderophore-mediated iron removal from chrysotile: implications for asbestos toxicity reduction and bioremediation. *J Hazard Mater* **341:** 290–296.
Newman, J.R., and Fuqua, C. (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene* **227:** 197–203.
Nikel, P.I., Chavarría, M., Danchin, A., and de Lorenzo, V. (2016) From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr Opin Chem Biol* **34:** 20–29.
Nosrati, R., Dehghani, S., Karimi, B., Yousefi, M., Taghdisi, S.M., Abnous, K. *et al*. (2018) Siderophore-based biosensors and nanosensors; new approach on the development of diagnostic systems. *Biosens Bioelectron* **117:** 1–14.
Ochsner, U.A., Johnson, Z., Lamont, I.L., Cunliffe, H.E., and Vasil, M.L. (1996) Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Mol Microbiol* **21:** 1019–1028.
Paolini, V., Tomassetti, L., Segreto, M., Borin, D., Liotta, F., Torre, M., and Petracchini, F. (2019) Asbestos treatment technologies. *J Mater Cycles Waste Manag* **21:** 205–226.
Pascolo, L., Gianoncelli, A., Schneider, G., Salomé, M., Schneider, M., Calligaro, C. *et al*. (2013) The interaction of asbestos and iron in lung tissue revealed by synchrotron-based scanning X-ray microscopy. *Sci Rep* **3:** 1123.
Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., and Imperi, F. (2017) Ferric uptake regulator fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **199:** e00472–e00417.
Petrik, M., Zhai, C., Haas, H., and Decristoforo, C. (2017) Siderophores for molecular imaging applications. *Clin Transl Imaging* **5:** 15–27.
Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47:** 903–915.
Qiu, D., Damron, F.H., Mima, T., Schweizer, H.P., and Yu, H.D. (2008) PBAD-based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria. *Appl Environ Microbiol* **74:** 7422–7426.
Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H., and Ae, N. (2009) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit Rev Biotechnol* **29:** 120–130.
Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013) An improvement of the 2ˆ(−delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* **3:** 71–85.
Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **102:** 8006–8011.
Ringel, M.T., Dräger, G., and Brüser, T. (2018) PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* **293:** 2330–2341.
Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* **23:** 3984–3999.
Saisho, Y., Katsube, T., White, S., Fukase, H., and Shimada, J. (2018) Pharmacokinetics, safety, and tolerability of cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin for gram-negative bacteria, in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **62:** e02163–e02117.
Schalk, I.J. (2018) A trojan-horse strategy including a bacterial suicide action for the efficient use of a specific gram-positive antibiotic on gram-negative bacteria. *J Med Chem* **61:** 3842–3844.
Schalk, I.J., Hannauer, M., and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol* **13:** 2844–2854.
Schalk, I.J., Rigouin, C., and Godet, J. (2020) An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environ Microbiol* **22:** 1447–1466.
Scherpereel, A. (2016) Amiante et pathologie respiratoire. *Presse Médicale* **45:** 117–132.
Serrano, L.O.D. (2017) Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. *Biomol Concepts* **8:** 169–178.
Spasiano, D., and Pirozzi, F. (2017) Treatments of asbestos containing wastes. *J Environ Manage* **204:** 82–91.
Tonziello, G., Caraffa, E., Pinchera, B., Granata, G., and Petrosillo, N. (2019) Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases. *Infect Dis Rep* **11:** 8208.
Upritchard, H.G., Yang, J., Bremer, P.J., Lamont, I.L., and McQuillan, A.J. (2007) Adsorption to metal oxides of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyoverdine and implications for bacterial biofilm formation on metals. *Langmuir ACS J Surf Colloids* **23:** 7189–7195.
Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K., and Musílek, K. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* **90:** 1–37.
Venturi, V., Ottevanger, C., Bracke, M., and Weisbeek, P. (1995) Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol Microbiol* **15:** 1081–1093.
Virta, R. (2002) *Asbestos: Geology, Mineralogy, Mining, and Uses*. Reston, VA: U.S. Geological Survey.
Wallis, S.L., Emmett, E.A., Hardy, R., Casper, B.B., Blanchon, D.J., Testa, J.R. *et al*. (2020) Challenging global waste management – bioremediation to detoxify asbestos. *Front Environ Sci* **8:** 20.
Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., and Vasil, M.L. (2001) Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69:** 5385–5394.
Williamson, A.J., Folens, K., Matthijs, S., Cortez, Y.P., Varia, J., Laing, G.D. *et al*. (2021) Selective metal extraction by biologically produced siderophores during bioleaching from low-grade primary and secondary mineral resources. *BioRxiv* **163:** 106774.
Zobel, S., Benedetti, I., Eisenbach, L., de Lorenzo, V., Wierckx, N., and Blank, L.M. (2015) Tn7-based device for calibrated heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol* **4:** 1341–1351.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Appendix S1

Fig. S1. Bacterial growth (OD600) of *P. aeruginosa* strains PAO1 (A) and PaM1 (B) in the presence of increasing arabinose concentrations (0.01 to 0.5% (v/v)).

Fig. S2. Bacterial growth (OD600) of *P. aeruginosa* strains PAO1 (A) and PaM1 (B) strains in the presence of increasing iron ($FeCl_3$) concentrations (50 nM to 50 μM).

Fig. S3. Amount of PVD relative to the growth of *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). The relative amount was assessed during five growth cycles of 24 h in CAA medium without magnesium CAA(-Mg) supplemented with arabinose, in the presence (dots) or absence of flocking asbestos waste (plain). Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

Fig. S4. STEM images and STEM mapping of chrysotile fibers from flocking asbestos waste after five growth cycles of 24 h in the presence of PAO1 (A and C) or PaM1 (B and D). Large images obtained by combining the distributions of Mg, Si, and Fe, with analysis areas (A and B). Atomic ratios of Mg/Si and Fe/Si of various areas (C and D) and the total area (F). Mass percentage of Mg, Si, and Fe after growth cycles in the presence of PAO1 or the PaM1 (E).

Table S1. Primers used in this study.

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

SUPPLEMENTAL DATA

Primer name	Sequence (5' – 3')	Comment
pvdSam_F	CCCGGGCTCGAGCTCTTGCAGCTCGCCGGCCAATTG	Amplification of the *pvdS* genomic region in PAO1
pvdSam_R	GTTGTCATAAAATAGCCGCTGGC	Amplification of the *pvdS* genomic region in PAO1
pvdSav_F	CAGCAAGGTGATTTCCATGTCG	Amplification of the *pvdS* genomic region in PAO1
pvdSav_R	TACCGAATTCGAGCTGGGAAAGGAGCGCTGCGAAA	Amplification of the *pvdS* genomic region in PAO1
pBad_F	GAAATCACCTTGCTGTTAGCCCAAAAAAACGG	Amplification of the araC/pBAD promoter from plasmid pBAD24
pBad_R	TTCGCAGCGGCTATTTTATGACAACTTGACGGC	Amplification of the araC/pBAD promoter from plasmid pBAD24
uvrD_F	CTACGGTAGCGAGACCTACAACAA	qRT-PCR of gene *uvrD*
uvrD_R	GCGGCTGACGGTATTGGA	qRT-PCR of gene *uvrD*
pvdA_F	CGCCGAAGTTCACCGATCT	qRT-PCR of gene *pvdA*
pvdA_R	TGGTATTCGCGCAGCAAAC	qRT-PCR of gene *pvdA*
pvdS_F	CAGGCGCTCGAACAGAAATA	qRT-PCR of gene *pvdS*
pvdS_R	CGTAGTTGATGTGCGAGGTT	qRT-PCR of gene *pvdS*
pvdD_F	ACGCCCGAGGTTCAGTTG	qRT-PCR of gene *pvdD*
pvdD_R	GCCGTTTTCGTCTTCCTGAAT	qRT-PCR of gene *pvdD*

Table S1. Primers used in this study.

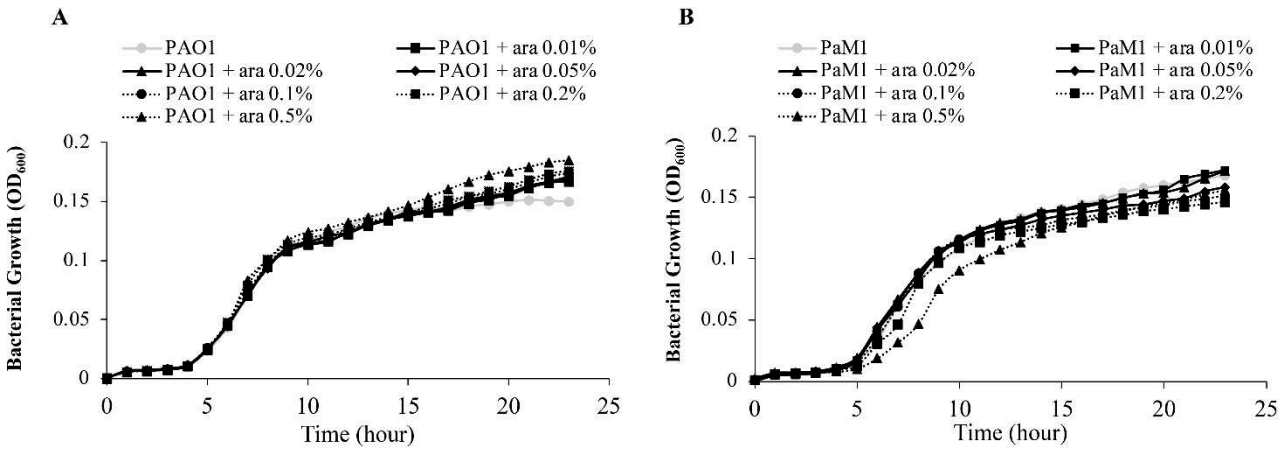


Figure S1: bacterial growth (OD600) of *P. aeruginosa* strains PAO1 (A) and PaM1 (B) in the presence of increasing arabinose concentrations (0.01 to 0.5% (v/v)).

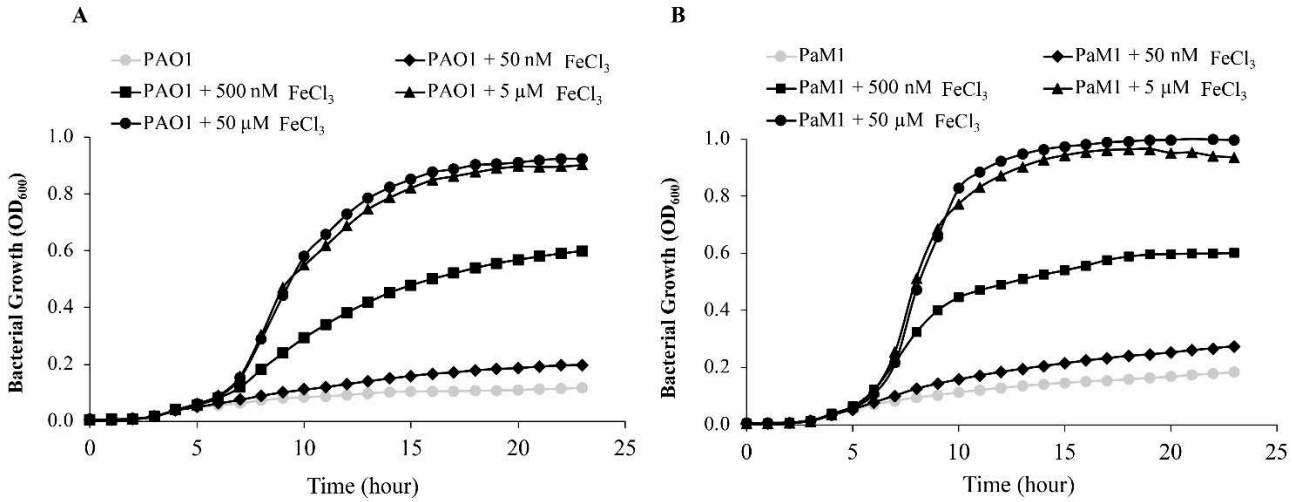


Figure S2: bacterial growth (OD600) of *P. aeruginosa* strains PAO1 (A) and PaM1 (B) strains in the presence of increasing iron ($FeCl_3$) concentrations (50 nM to 50 µM).

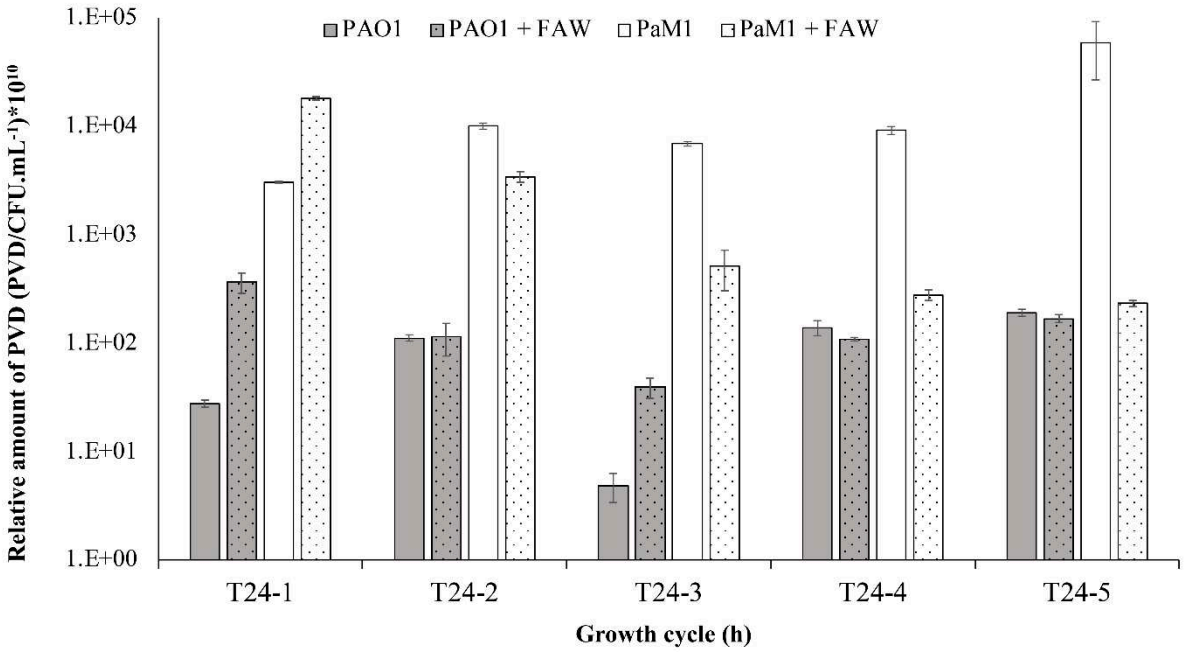


Figure S3: Amount of PVD relative to the growth of *P. aeruginosa* strains PAO1 (grey bars) and PaM1 (white bars). The relative amount was assessed during five growth cycles of 24 h in CAA medium without magnesium CAA(-Mg) supplemented with arabinose, in the presence (dots) or absence of flocking asbestos waste (plain). Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

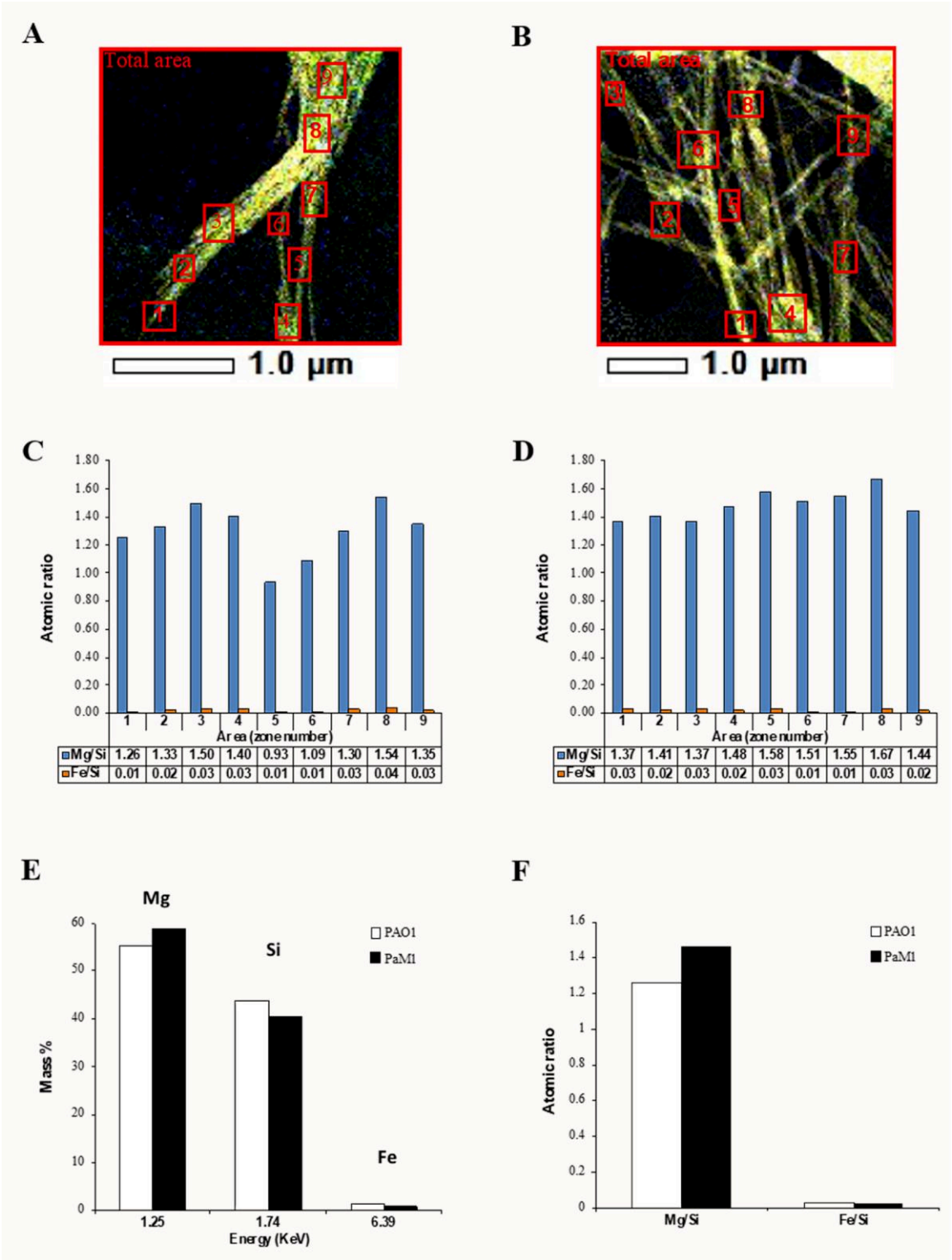


Figure S4: STEM images and STEM mapping of chrysotile fibers from flocking asbestos waste after five growth cycles of 24 h in the presence of PAO1 (A and C) or PaM1 (B and D). Large images obtained by combining the distributions of Mg, Si, and Fe, with analysis areas (A and B). Atomic ratios of Mg/Si and Fe/Si of various areas (C and D) and the total area (F). Mass percentage of Mg, Si, and Fe after growth cycles in the presence of PAO1 or the PaM1 (E).

3 Résumé des résultats

L'objectif de cette publication est de décrire l'ingénierie d'une souche de *P. aeruginosa* PAO1, appelée PaM1, permettant d'améliorer l'extraction du fer de déchets amiantés de type flocage. Nous avons pu montrer que le remplacement de la région de régulation par le fer (Fur-box) du gène *pvdS* par le promoteur AraC/pBAD permet d'obtenir une production de PVD dépendante de la concentration en arabinose du milieu. De plus, contrairement à la souche sauvage et comme attendu, le mutant est capable de produire de la PVD en présence de fer.

La modification de la région promotrice de *pvdS* nous a ainsi permis d'établir la preuve de concept que la production PVD peut être déclenchée par un stimulus autre que le fer. L'analyse par RT-qPCR du niveau d'expression des transcrits de *pvdS* en milieu minimum a en effet permis d'obtenir une expression plus importante de *pvdS* chez PaM1 lors d'une induction à l'arabinose que chez la souche de PAO1 en absence de fer. Cependant, dans ces conditions, la production de PVD de PaM1 n'est pas significativement différente de celle de PAO1. Néanmoins, en présence de déchets de flocage, la souche de PaM1 est tout de même capable de produire 7 fois plus de PVD que PAO1, conduisant à une extraction de fer et de magnésium des déchets environ 2 fois plus importante.

Ces résultats constituent la preuve de concept qu'une production de PVD chez *P. aeruginosa* indépendante du fer permet d'améliorer sa capacité de bioremédiation de déchets amiantés sans que les quantités de fer extraites ne soient un frein dans le processus d'altération.

Chapitre 2

Ingénierie de *Pseudomonas putida* pour l'optimisation de la production de pyoverdine

1 Modification de la région promotrice de *pvdS*

La stratégie de modification de la régulation par le fer de *pvdS* s'est avérée efficace chez *P. aeruginosa* PAO1 puisqu'elle a permis d'obtenir le mutant PaM1 capable de produire de la PVD en présence des amiantes avec des quantités significativement plus importantes de fer extraites. *P. aeruginosa* étant une souche pathogène, nous avons décidé d'appliquer la même stratégie chez *P. putida* KT2440. Deux stratégies de remplacement de la séquence promotrice de *pvdS* contenant la Fur-box ont été envisagées :

- Le remplacement par un promoteur inductible à l'arabinose AraC/pBAD permettant d'obtenir le mutant PP_P_{BAD}
- Le remplacement par un promoteur constitutif Pc, permettant d'obtenir le mutant PP_Pc

L'utilisation d'un promoteur inductible permet de voir si l'induction de la PVD peut être dépendante d'un inducteur autre que le fer, ici l'arabinose. L'arabinose n'étant pas catabolisé par *P. putida*, l'utilisation de cet inducteur permet de gérer la transcription des gènes de biosynthèse de la PVD en fonction d'un facteur externe à la souche et indépendamment du métabolisme. Afin d'éviter une possible interférence entre l'inducteur et le milieu de culture des bactéries, il est également possible d'utiliser un promoteur constitutif. L'objectif est d'induire la production de PVD de façon constitutive, indépendamment de son milieu de culture. Cette stratégie permet également d'éviter le possible effet d'induction « tout ou rien » où, en présence de concentrations intermédiaires en inducteur, certaines bactéries sont totalement induites tandis que d'autres restent non induites (Siegele and Hu, 1997).

1.1 Construction des mutants PP_P_{BAD} et PP_Pc

Le mutant PP_$P_{BAD,}$ dont la région promotrice de *pvdS* chez *P. putida* KT2440 est remplacée par le promoteur inductible à l'arabinose AraC/pBAD a été construit avant mon arrivée au laboratoire (Mathieu, 2019). La carte du plasmide est illustrée dans la partie **Matériel et Méthodes, Figure 38.** Ce promoteur est endogène à *E. coli* où le gène *araC* code pour la protéine régulatrice AraC capable d'agir comme répresseur et activateur selon les conditions (Miyada *et al.*, 1984). Cette régulation est illustrée en **Figure 18.** De plus, ce promoteur a été décrit comme fonctionnel également chez

P. putida lorsqu'il est ajouté par ingénierie génétique et l'induction de la production d'un métabolite par l'arabinose a été démontré (Cook *et al.*, 2018)

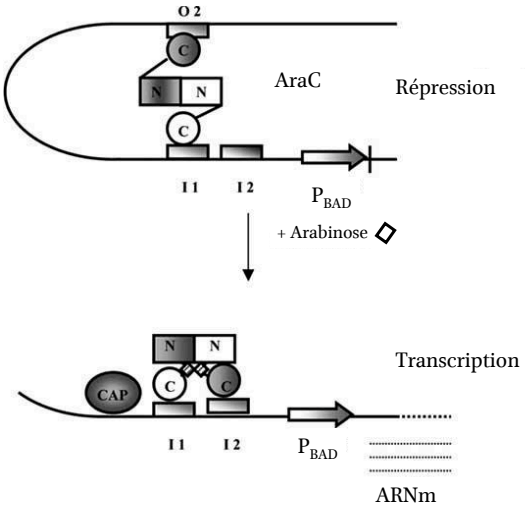


Figure 18 : Fonctionnement de l'opéron arabinose contenant AraC/P_{BAD} chez *E. coli.* Lorsque l'arabinose se lie au répresseur AraC, il libère le site O2 et se lie au site I2. Cela détend la boucle d'ADN et la transcription commence. La protéine activatrice de l'AMPc (CAP) stimule la liaison de l'AraC à I1 et I2. N et C désignent respectivement l'extrémité N-terminale et l'extrémité C-terminale du répresseur AraC (d'après Saïda *et al.*, 2006)

Concernant le mutant PP_Pc dont la région de régulation par le fer a été substituée par le promoteur Pc, le plasmide pEXG2::Pc a été construit avant mon arrivée au laboratoire (Mathieu, 2019). La carte du plasmide est illustrée dans la partie **Matériel et Méthodes, Figure 38.** Le promoteur Pc est un promoteur permettant la transcription des gènes de cassette des intégrons de classe I. Contrairement au précédent, ce promoteur est exprimé naturellement par *P. putida*, ce qui peut être un avantage pour l'ingénierie génétique. J'ai ainsi réalisé la transformation bactérienne par choc thermique permettant d'obtenir de nombreux clones *E. coli* TOP10 pEXG2::Pc résistants à la gentamycine. Un plasmide a été extrait d'un clone résistant et la construction validée par séquençage (voir **Matériel et Méthodes, paragraphe 4.2.7**). La souche *E. coli* TOP10 pEXG2::Pc validée a alors été utilisée pour réaliser la conjugaison tri-parentale avec KT2440 WT et la souche helpeuse *E. coli* HB101 pRK600 afin d'obtenir le mutant PP_Pc dans lequel le promoteur de *pvdS* est substitué par le promoteur PC (voir **Matériel et Méthodes, paragraphe 4.2.6).** Après les étapes de sélection et contre-sélection, des centaines de clones ont été obtenus. 20 clones ont été utilisés pour

l'étape finale de vérification de la perte de la résistance à l'antibiotique. La vérification de la bonne intégration de la cassette de substitution a été vérifiée sur 20 clones. Sur ces clones, 5 ont été sélectionnés et la bonne intégration de la cassette de substitution a été confirmée par PCR sur colonie par amplification de la région modifiée. Après migration, un seul clone présente la cassette de substitution qui est alors vérifiée par séquençage avec les mêmes amorces que la PCR afin de valider le mutant PP_Pc. La région du chromosome autour du gène *pvdS* pour la souche KT2440 WT, PP_P_{BAD} et PP_PC est illustrée en **Figure 19 A, B** et **C** respectivement.

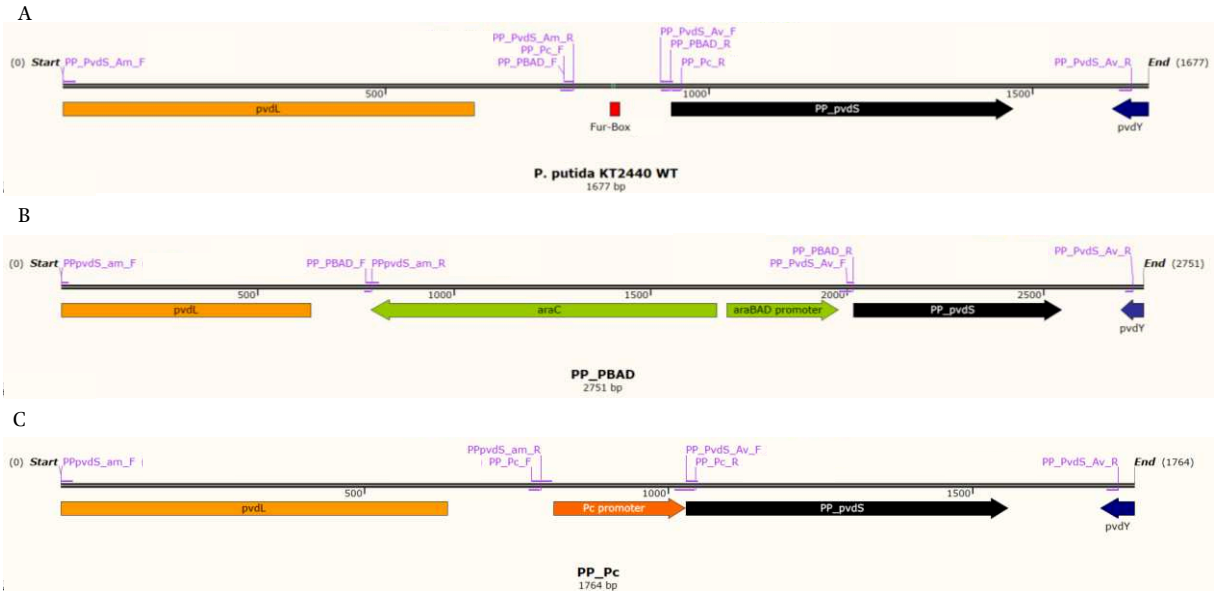


Figure 19 : Région chromosomique de *pvdS* chez KT2440 WT, avant (A) et après remplacement de la région promotrice par le promoteur AraC/P_{BAD} (B) ou Pc (C). Le gène en amont de la séquence d'intérêt est illustré en orange et celui en aval est en bleu.

1.2 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_$_{PBAD}$

La croissance et la production de PVD en milieu minimum CAA par les souches KT2440 sauvage (WT) et PP_P_{BAD} en présence de différentes concentrations en fer ou d'arabinose a été réalisée en microplaques 96 puits. La **Figure** 20 présentent les densités bactériennes (DO_{600nm}) en fonction des concentrations en $FeCl_3$ de 50 nM à 100 µM. En absence de Fer, KT2440 WT et PP_P_{BAD} présentent des populations équivalentes après 24 h de culture. En présence de fer, la croissance des 2 souches est stimulée de façon dépendante de la concentration en fer. Cette croissance est stimulée à partir

de 500 nM de $FeCl_3$ et est maximale à partir de 50 µM. Pour les concentrations intermédiaires, on observe une croissance supérieure pour KT2440 WT tandis que sur les concentrations plus importantes elles sont identiques pour les 2 souches.

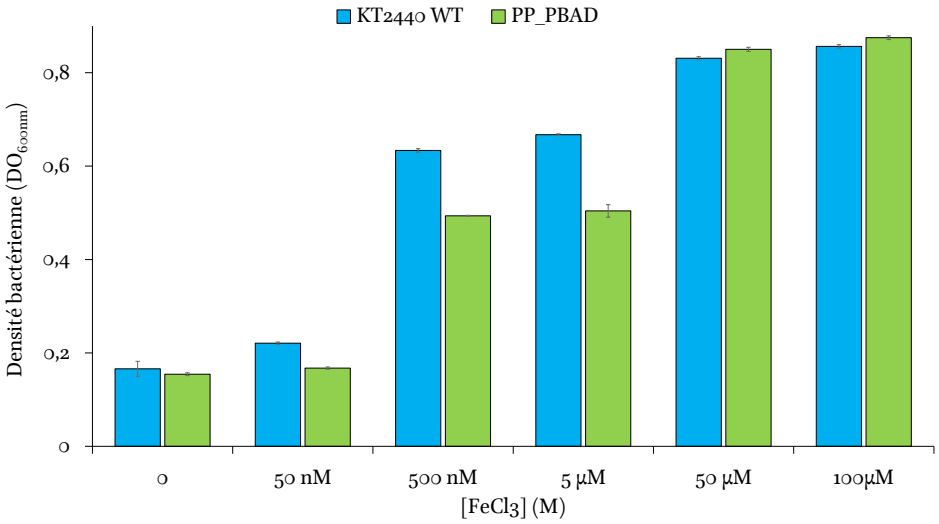


Figure 20 : Population bactérienne de KT2440 WT (bleu) et PP_P_{BAD} (vert) après 24 h en CAA supplémenté ou non en $FeCl_3$ (50 nM à 100 µM). L'expérience a été répétée 3 fois (n = 3)

La production de pyoverdine (DO_{400nm}) correspondante aux différentes conditions de culture est présentée en **Figure 21**. La production de PVD est faible en absence de fer et augmente de manière concentration dépendante. La production de PVD par PP_P_{BAD} est environ 2 fois moins importante que KT2440 WT quand la concentration en fer est inférieure à 50 µM. Néanmoins, la production de PVD en microplaques 96 puits étant estimée sur la culture bactérienne et non uniquement sur le surnageant filtré, la présence de cellules biaise les résultats obtenus pour la DO_{400nm} dans ces conditions.

Afin de comparer les 2 souches, le ratio DO_{400nm}/ DO_{600nm} est représenté en **Figure 22.** Concernant KT2440 WT, comme attendu, sa production relative de PVD est importante en absence et à 50 nM de $FeCl_3$ et est réprimée dès 500 nM de $FeCl_3$, le ratio passant de 3,6 à 1,8. A partir de 5 µM de $FeCl_3$, le ratio diminue encore mais cela correspond à une stimulation de la croissance uniquement, la production de PVD étant déjà totalement réprimée. Le ratio basal correspondant à l'absence de production de PVD chez les deux souches en microplaque, peut alors être défini à environ 1,3. Celui correspondant à une production de PVD optimale en milieu carencé en fer par KT2240 est d'environ 3,7. La production relative de PVD par PP_P_{BAD} est faible quelle que soit la quantité de fer avec un

ratio d'environ 1,3, correspondant à une absence de production de PVD. La production de PVD est ainsi bien dépendante de la présence de fer pour KT2440 WT mais par pour le mutant PP_P_{BAD}..

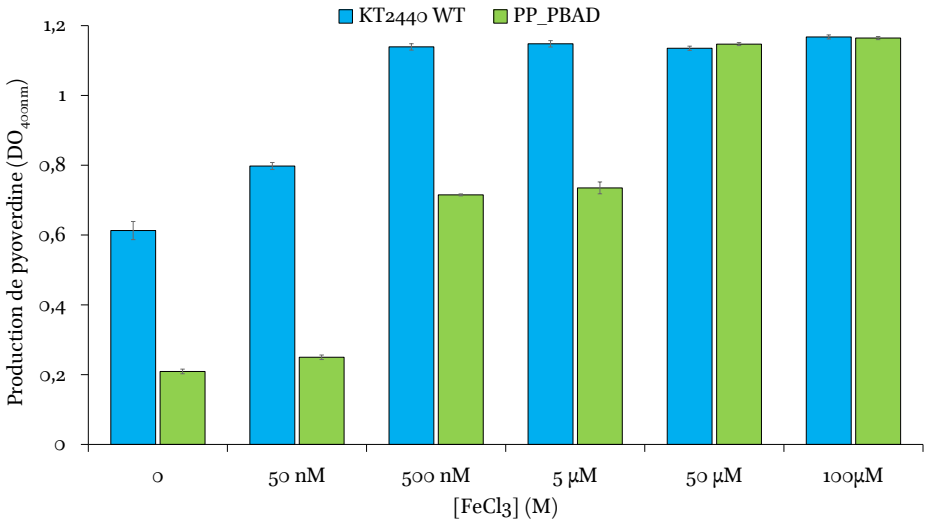


Figure 21 : Production de pyoverdine de KT2440 WT (bleu) et PP_P_{BAD} (vert) après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non en $FeCl_3$ (50 nM à 100 µM). n = 3

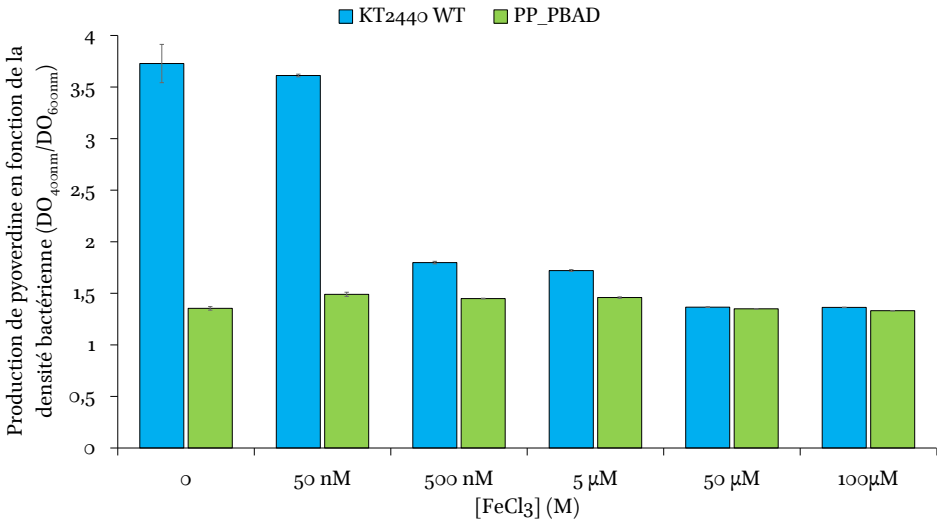


Figure 22 : Production de pyoverdine (DO_{400nm}) de KT2440 WT (bleu) et PP_P_{BAD} (vert) en fonction de la densité cellulaire (DO_{600nm}) après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non en $FeCl_3$ (50 nM à 100 µM). n = 3

Dans un second temps, nous avons suivi la croissance (**Figure 23**) et la production de PVD (**Figure 24**) des deux souches en fonction de la concentration en arabinose dans un milieu CAA durant 24 h.

L'ajout d'arabinose n'a pas d'impact sur la croissance des deux souches qui reste très faible puisque le milieu est dépourvu de fer.

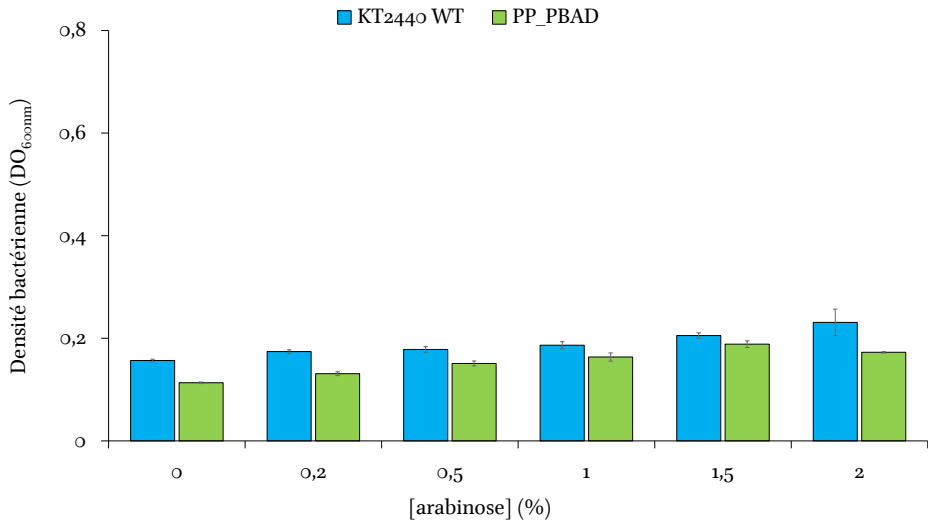


Figure 23 : Croissance de KT2440 WT (bleu) et PP_P$_{BAD}$ (vert) après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non en arabinose (0,2 % à 2 %). n = 3

La production de PVD par les 2 souches dans ces mêmes conditions de culture est présentée **Figure 24.** L'ajout d'arabinose dans le milieu permet d'augmenter légèrement la production de PVD de KT2440 WT, avec une DO_{400nm} passant de 0,53 à 0 % d'arabinose, à 0,89 pour 2%**.** Pour PP_P$_{BAD}$, la production de PVD est stimulée par l'ajout de 0,2 % d'arabinose et augmente de façon dose-dépendante jusqu'à 1,5 %. De façon générale, la production de KT2440 WT reste supérieure à celle de PP_P$_{BAD}$ malgré l'induction à l'arabinose.

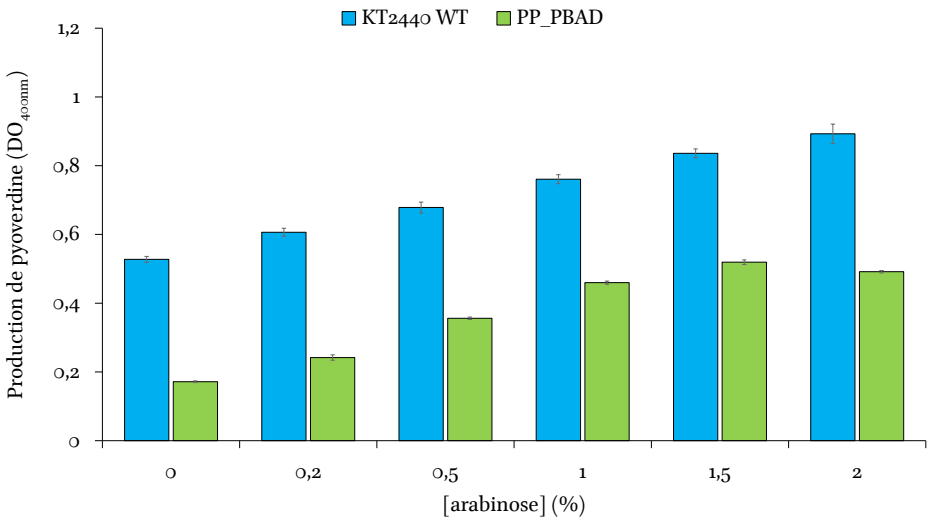


Figure 24 : Production de pyoverdine de KT2440 WT (bleu) et PP_P$_{BAD}$ (vert) après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non en arabinose (0,2 % à 2 %). n = 3

Cependant, lorsqu'on s'intéresse à la production de PVD relative à la croissance, le ratio DO_{400nm}/DO_{600nm} présenté en **Figure 25** montre une légère augmentation (3,8) pour KT2440 WT à partir de 0,5 % d'arabinose, correspondant au ratio de production optimale défini précédemment. Pour PP_P_{BAD}, la production relative de PVD est stable à une valeur d'environ 2,8 à partir de 1 % d'arabinose. Ce résultat est supérieur au ratio correspondant à une production de PVD non induite mais reste néanmoins inférieur au ratio de production optimale définit pour KT2440 WT.

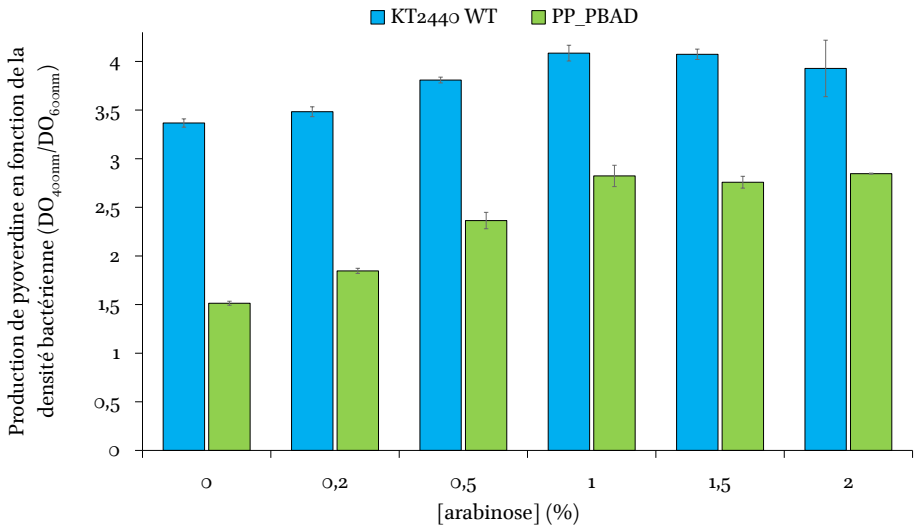


Figure 25 : Production de pyoverdine (DO_{400nm}) de KT2440 WT (bleu) et PP_P_{BAD} (vert) en fonction de la densité cellulaire (DO_{600nm}) après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non en arabinose (0,2 % à 2 %). n = 3

En conclusion, la production de PVD par KT2440 WT est totalement réprimée à partir de 5 µM de $FeCl_3$ tandis que l'arabinose n'a pas d'influence sur sa croissance. Le mutant PP_P_{BAD} présente une production de PVD indépendante de la présence de fer et dépendante de l'arabinose. L'expérience préliminaire précédente a permis de définir la concentration en fer permettant de réprimer la production de PVD de la souche sauvage (5 µM) ainsi que celle d'arabinose permettant de l'induire chez la souche mutante (1 %). La production optimale de PVD de PP_P_{BAD} induite avec 1 % d'arabinose reste néanmoins inférieure à celle de KT2440 WT en absence de fer. Toutefois, les conditions de croissance en microplaque ne sont pas optimales et l'inconvénient majeur est la présence de cellules dans le milieu de culture pouvant gêner l'estimation de la production de PVD qui est lue, de façon optimale, uniquement sur le surnageant de culture filtré.

Nous avons donc reconduit cette expérience dans les conditions optimales identifiées en amont mais cette fois ci en tubes FALCON™ avec des cultures de 50 mL. Ces conditions permettent d'estimer la production de PVD sur le surnageant de culture débarrassé de toutes cellules pouvant fausser la lecture au spectrophotomètre. L'utilisation de ces tubes permet également une meilleure aération des cultures de *Pseudomonas* qui sont, pour rappel, des germes aérobies.

De façon comparable aux résultats obtenus en microplaque, les souches présentent des densités cellulaires similaires après 24 h avec ou sans fer et/ou arabinose (**Figure 26**). A nouveau, l'arabinose n'a pas d'influence sur la croissance bactérienne des deux souches. Comme attendu, la présence de 5 µM de $FeCl_3$ permet de stimuler la croissance et d'augmenter la DO_{600nm} jusqu'à 2,7 pour les 2 souches.

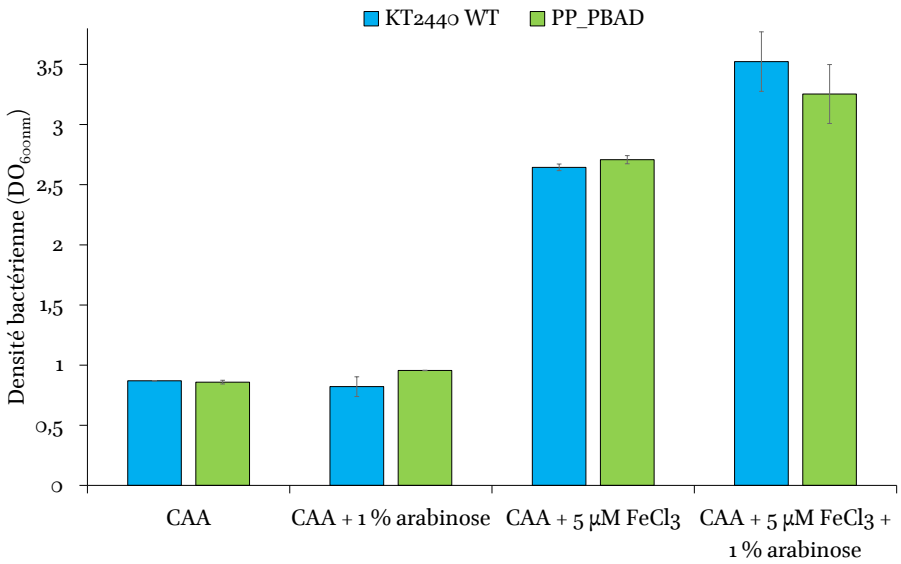


Figure 26 : Croissance de KT2440 WT et PP_P_{BAD} après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non de 1 % d'arabinose et/ou de 5 µM de FeCl3. n = 3

La production de PVD de KT2440WT, représentée en **Figure 27**, est légèrement supérieure en présence de 1 % d'arabinose comparé au milieu CAA, mais est totalement réprimée comme attendu après addition de 5 µM de $FeCl_3$. L'ajout d'arabinose en complément du fer maintient la répression de la production de PVD. Lorsque le milieu CAA n'est pas supplémenté en arabinose, la souche PP_P_{BAD} ne produit pas de PVD, tandis que l'ajout de 1 % d'arabinose stimule la production de la PVD. Pourtant, lorsque le milieu contient à la fois 5 µM de $FeCl_3$ et 1 % d'arabinose, l'induction de la production de PVD est à nouveau réprimée.

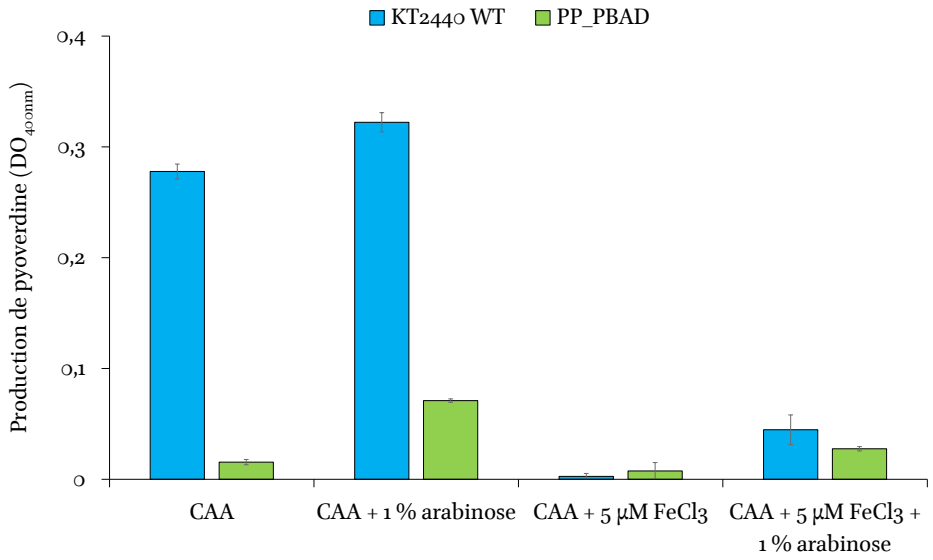


Figure 27 : Production de pyoverdine des souches KT2440 WT et PP_PBAD après 24 h en milieu CAA supplémenté ou non de 1 % d'arabinose et/ou de 5 µM de $FeCl_3$. n = 3

Ces résultats sont confirmés par le ratio DO_{400nm}/DO_{600nm} qui illustre la production relative de PVD (données non présentées). En effet, PP_P_{BAD} présente bien une production de PVD dépendante de l'arabinose mais qui reste inférieure à celle de KT2440 WT. De façon étonnante, lorsque l'on ajoute du $FeCl_3$ à notre milieu contenant de l'arabinose, la production relative de PVD de PP_P_{BAD} est à nouveau réprimée.

En conclusion, ces résultats présentent une tendance similaire aux résultats obtenus en microplaque. Ces expériences ont permis de confirmer que la production de PVD de KT2440 WT est totalement réprimée à partir de 5 µM de $FeCl_3$. Cette quantité de fer correspond à la concentration en $FeCl_3$ retrouvée dans le milieu riche LB (données du laboratoire). L'utilisation future de cette concentration nous permettra ainsi de comparer la croissance des souches en milieu riche et en milieu minimum contenant des quantités comparables de $FeCl_3$. En parallèle, nous avons confirmé que la production de PVD par PP_P_{BAD} est bien indépendante de la concentration en fer et dépendante de la concentration en arabinose. Les résultats indiquent également que les valeurs de production de PVD obtenues en microplaque sont faussées par la présence de cellules puisque la DO_{400nm} restait importante en présence de fer. L'induction par l'arabinose de la production de PVD chez PP_P_{BAD} est inférieure à celle de KT2440 WT en absence de fer. Une expérience similaire a été

réalisée dans un milieu minimum succinate (MM succ) afin de voir si la source de carbone pouvait avoir un impact sur la production de PVD des deux souches. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux souches (données non présentées). KT2440 WT présente une production de PVD plus importante en MM succ qu'en CAA et à nouveau cette dernière est totalement réprimée en présence de fer. Concernant PP_P_{BAD}, sa production est plus importante en milieu CAA qu'en MM succ + arabinose même si elle reste très faible par rapport à KT2240 WT. Cette faible production de PVD induite par l'arabinose peut être liée au fait que *P. putida* ne possède pas de transporteur de l'arabinose contrairement à *E. coli*. En effet, Cook *et al.* ont montré que lorsque *araE* était exprimé de manière constitutive, il était possible d'obtenir une induction maximale du promoteur avec des concentrations d'inducteur très basses (Cook *et al.*, 2018). De plus l'induction à l'arabinose perd de son efficacité dès lors que la souche est cultivée en présence de $FeCl_3$. Cela suggère que certains gènes de la voie PVD sont peut-être régulés directement par le fer. Cela risque alors de poser un problème d'induction lorsque la souche sera cultivée en présence de déchets amiantés riches en fer.

Afin de contourner les problèmes d'induction ou de compatibilité entre l'inducteur et le $FeCl_3$, nous avons décidé de changer de stratégie et d'opter pour la construction d'un mutant dont le promoteur de *pvdS* est remplacé par un promoteur constitutif Pc.

1.3 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_Pc

La croissance et la production de PVD par les souches KT2440 WT et PP_Pc après 24 h à 30°C en milieu riche LB et en minimum CAA supplémenté de différentes concentrations en $FeCl_3$ a été suivie en tubes 50 ml FALCON™. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 28 et 29** respectivement.

En milieu LB, la densité cellulaire est environ 4 fois supérieure à celle en milieu CAA après 24 h de culture. En milieu CAA, la croissance des 2 souches est stimulée par l'ajout de concentrations croissantes en $FeCl_3$. Cependant, de façon inattendue, à partir de 2 µM pour PP_Pc et 5 µM pour KT2440, la densité cellulaire diminue drastiquement (**Figure 28**).

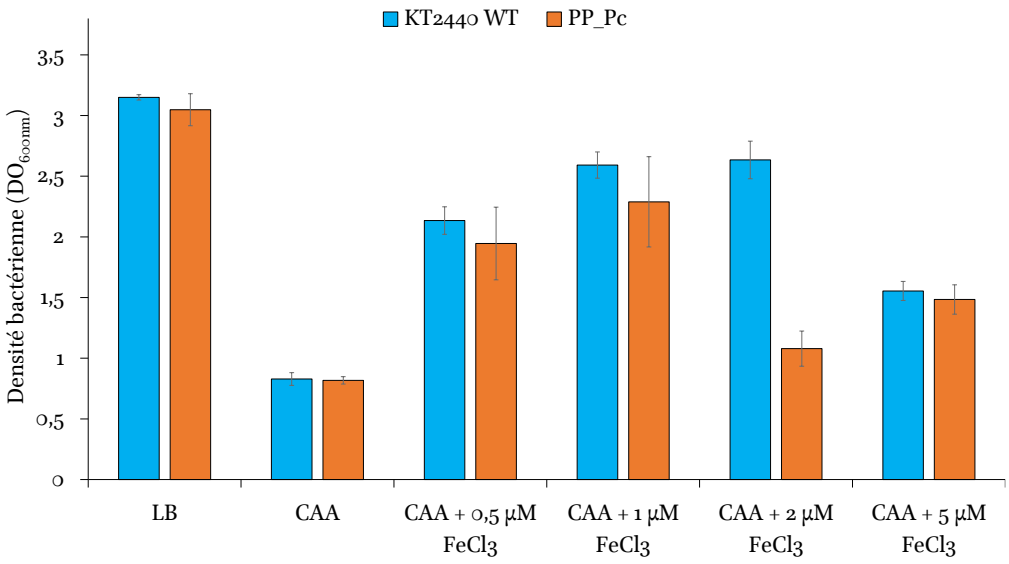


Figure 28 : Croissance de KT2440 WT et PP_Pc après 24 h en milieu LB ou CAA supplémenté ou non en $FeCl_3$ (0,5 µM à 5 µM). n = 3

La production de PVD de KT2440 WT, présentée en **Figure 29**, est réprimée en milieu riche, stimulée dans le milieu minimum CAA puis diminue avec l'augmentation de la concentration en $FeCl_3$. PP_Pc présente, contrairement à PP_P_{BAD}, une production de PVD similaire à KT2240 WT dans le milieu CAA carencé en fer. Ce résultat montre que cette deuxième stratégie est plus efficace que l'induction de *pvdS* par l'arabinose pour produire de la PVD et que le système PVD était impacté dans notre première construction. Cependant, la production de PVD de PP_Pc en milieu riche reste très faible bien que supérieure à celle de KT2440 WT (DO_{400nm} = 0,13 et 0,04 respectivement). La production de PVD par notre mutant PP_Pc est possible en présence de fer jusqu'à une certaine concentration (0,5 µM). En effet, lorsque la concentration en fer augmente, la production de PVD de PP_Pc diminue jusqu'à atteindre 0,15 en présence de 5 µM de $FeCl_3$. Ces données sont également confirmées par l'étude de la production relative de PVD qui diminue avec l'augmentation de la concentration en fer (données non présentées).

Bien que la biosynthèse de la PVD soit sous dépendance d'un promoteur constitutif permettant la transcription de *pvdS* sans condition, comme précédemment avec PP_P_{BAD} le fer semble encore réprimer la production de PVD du mutant. En effet, lorsque la production est rapportée à la densité cellulaire (données non présentées) le ratio le plus important est obtenu en milieu CAA et est similaire pour les deux souches. PP_Pc est donc possiblement utilisable en présence de déchets

amiantés puisqu'elle est capable de produire de la PVD en présence certaines concentrations de fer. Cependant, la quantité de fer et autres minéraux contenus dans les déchets pouvant varier et le relargage pouvant être important, il n'est pas omis que la production de PVD du mutant finisse par diminuer jusqu'à être réprimée totalement comme pour KT2440 WT en milieu riche.

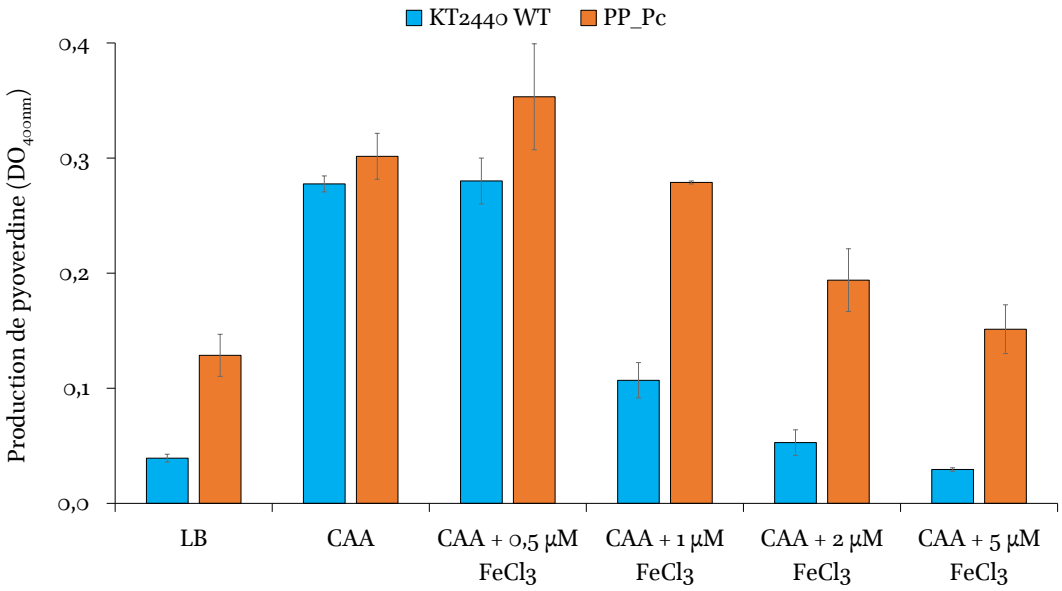


Figure 29 : Production de pyoverdine des souches KT2440 WT et PP_Pc après 24 h en milieu LB ou CAA supplémenté ou non en $FeCl_3$ (0,5 µM à 5 µM). n = 3

En conclusion, les résultats obtenus avec ces mutants semblent encourager l'utilisation de promoteurs constitutifs plutôt qu'inductibles afin d'obtenir une production de PVD en présence de fer. Cependant, le système PVD semble être un système naturellement optimisé chez les *Pseudomonas* puisque la production maximale de PVD est toujours obtenue par la souche sauvage en absence de fer et qu'aucun de nos mutant n'a montré de capacité de surproduction du sidérophore. De plus, il existe peut-être d'autres éléments de régulation des gènes de biosynthèse de la PVD dépendant du fer et la surexpression de la biosynthèse ne permet pas une surproduction pour autant.

2 Délétion du régulateur Fur

Les résultats obtenus précédemment nous conduisent à émettre l'hypothèse que certains gènes sont directement régulés par le répresseur Fur et sont donc directement réprimés lorsque la souche est cultivée en présence de fer. Cependant, en se basant sur la séquence de la Fur-box prédite, nous n'avons pas identifié d'autres Fur-box que celle située dans la région de *pvdS*. Afin d'éviter tout de même ce biais, nous avons alors décidé de construire une souche dans laquelle le gène codant pour le régulateur Fur est délété. Ainsi, sans ce régulateur, *pvdS* est exprimé de façon constitutive et les gènes impliqués dans le système PVD dépendant directement de Fur ne devraient alors plus pouvoir être réprimés par la présence de fer intracellulaire.

2.1 Construction du mutant PP_Δ*fur*

Une cassette de substitution permettant la délétion de *fur* a été construite chez KT2440 par amplification par PCR des séquences en amont et en aval du gène (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.3**). Nous avons utilisé les amorces PP_*fur*_am_F et R afin d'amplifier une séquence de 1000 pb en amont du gène et PP_*fur*_av_F et R pour la séquence en aval. Ces deux paires d'amorces possèdent des queues flanquantes de 20 nt homologues des séquences amont ou aval du plasmide. Un clonage grâce au kit NEBuilder® permet d'assembler les séquences amplifiées et le plasmide pEXG2, afin d'obtenir le plasmide pEXG2::Δ*fur* (voir **Matériel et Méthodes, Figure 40B).** La souche *E. coli* TOP10 est ensuite utilisée pour réaliser la transformation bactérienne avec le plasmide permettant d'obtenir de nombreux clones *E. coli* TOP10 pEXG2::Δ*fur* résistants à la gentamycine. Un plasmide a été extrait de deux clones résistants afin de valider par séquençage la construction (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.7**).

Les deux clones validés ont alors été utilisés pour réaliser deux conjugaisons tri-parentales indépendantes afin d'obtenir le mutant PP_Δ*fur* correspondant à la souche *P. putida* KT2440 dans lequel le gène *fur* est délété, (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.6**). Après la première étape de sélection, de nombreux clones de différentes morphologies (*grosses* et *petites colonies*) sont obtenus et 2 colonies de chaque morphologie sont utilisées pour l'étape de contre sélection. Après cette étape, de nombreux clones présentant des morphologies similaires à celles de clones

parentaux sont obtenus et 20 sont utilisés afin de vérifier la perte de la résistance à l'antibiotique. 12 clones positifs sont sélectionnés pour vérifier l'insertion de la cassette grâce à une PCR sur colonie utilisant les amorces précédentes. Sur ces clones, 3 seulement, tous présentant un phénotype *grosse colonie*, possèdent toujours le gène *pvdS* intact mais seulement 1 est bel et bien délété de *fur*. Cet unique clone est alors envoyé à séquencer afin de valider la délétion de *fur* et donc le mutant PP_Δ*fur*. La région chromosomique de *fur* chez la souche sauvage et la souche PP_ Δ*fur* est présentée en **Figure 30 A et B** respectivement.

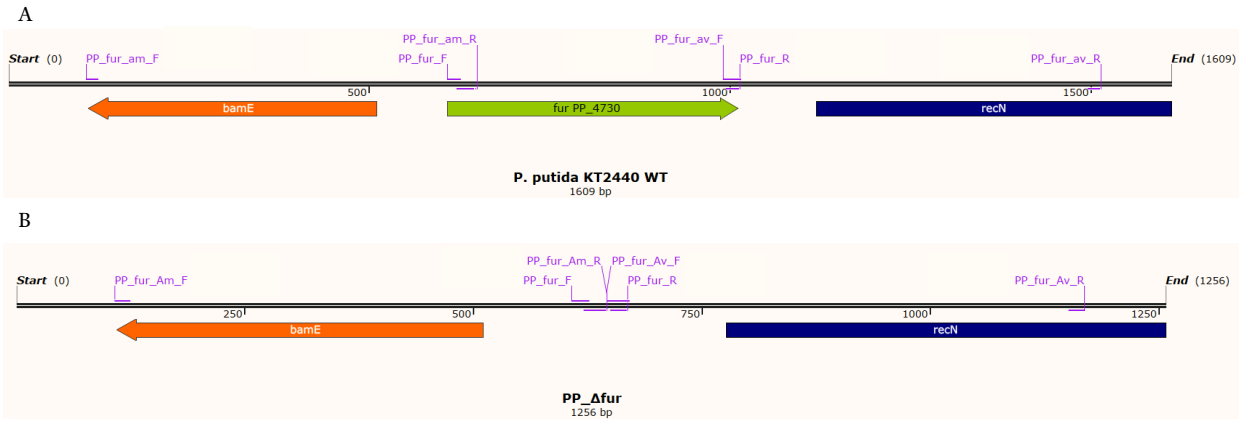


Figure 30 : Région chromosomique de *fur* chez la souche KT2440 WT, avant (A) et après (B) sa délétion. Le gène en amont de la séquence d'intérêt est illustré en orange et celui en aval est en bleu

2.2 Mise au point des conditions de culture du mutant PP_Δ*fur*

L'obtention d'un mutant PP_Δ*fur* viable était déjà un résultat prometteur en soit car ces mutants de délétion sont décrits comme non viables chez plusieurs espèces, notamment *P. aeruginosa*. Afin d'évaluer les conséquences de la délétion de *fur* chez KT2440, une caractérisation phénotypique de la souche a dans un premier temps été réalisée.

2.2.1 Détermination du milieu de culture adapté

Dès les premières étapes de caractérisation, nous avons observé deux phénotypes de colonie très différents pour la souche PP_Δ*fur*. En milieu riche LB, la souche KT2440 WT forme des grosses colonies blanches, opaques, rondes, d'aspect lisse et régulier. Lorsque la souche est cultivée sur milieu solide CAA les colonies sont de même aspect mais plus petites pour une même durée

d'incubation (données non présentées). Cette différence s'explique sûrement par le manque de nutriments, entrainant une croissance limitée. Lorsque l'on observe les deux milieux sous UV, les colonies du milieu CAA présentent un halo fluorescent correspondant à une production de PVD, contrairement à celles du milieu LB. De façon identique, la souche PP_Δ*fur* forme de très petites colonies blanches, moins opaques, rondes et d'aspect lisse en milieu CAA, présentant également un halo fluorescent sous lumière UV. Lorsque la souche se développe sur milieu riche, elle forme également de petites colonies identiques cependant un deuxième phénotype apparaît également. Il s'agit de colonies rondes mais plus grosses, plus blanches, d'aspect plus laiteux (données non présentées). De plus ces colonies ne présentent plus de halo fluorescent, et semblent ainsi avoir perdu leur capacité à produire de la PVD.

Afin de travailler sur des cultures pures, ne présentant que le phénotype *petite colonie*, et produisant donc de la PVD, nous avons isolé une *petite colonie* et l'avons cultivé en milieu liquide CAA sur deux générations afin de nous assurer que la souche ne présente pas de phénotype *grosse colonie* une fois étalée sur milieu gélosé. Nous avons ainsi voulu déterminer si c'est la présence de fer dans le milieu qui induit ce changement phénotypique et surtout si notre *petite colonie* était susceptible de redonner un phénotype *grosse colonie* dans différentes conditions de culture. Pour cela, nous avons cultivé la souche PP_Δ*fur* de phénotype *petite colonie* en milieu CAA ou LB durant 48 h et nous avons réalisé, à T0, T24 et T48, des dénombrements sur milieux gélosé CAA et LB pour chaque culture liquide. A l'issu de 24 h d'incubation, les phénotypes *petites* et *grosses colonies* sont comptés séparément et les résultats, présentés en **Figure 31,** sont validés sous UV.

Culture en milieu liquide		Etalement sur milieu gélosé	Petites colonies (%)	Grosses colonies (%)	Total
Milieu	Durée (h)				
LB	0	LB	58	42	
	24		15	85	
	48		0	100	
	0	CAA	68	32	
	24		16	84	
	48		7	93	
CAA	0	LB	87	13	
	24		98	2	
	48		50	50	
	0	CAA	97	3	
	24		99	1	
	48		100	0	

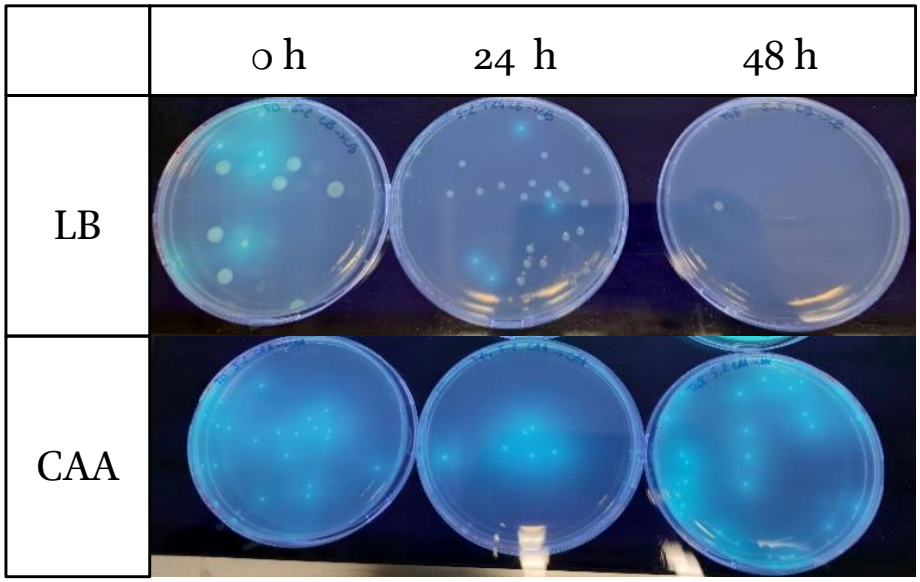


Figure 31 : Distribution des phénotypes petites ou grosses colonies de la souche PP_*Δfur* après une culture de 0, 24 ou 48 h en LB ou CAA puis dénombrement en milieu LB ou CAA. Le comptage des colonies est réalisé sous UV afin de différencier les phénotypes *grosses colonies* non fluorescentes (violet) des *petites colonies* fluorescentes (vert). n = 3

Lorsque PP_Δ*fur* est cultivé en milieu riche uniquement, la moitié des colonies présentent un phénotype *grosse colonie* dès le T0 et représentent 100 % des colonies à T48. Ce pourcentage reste similaire si la souche est cultivée en LB puis dénombrée en milieu CAA gélosé, indiquant que la culture en milieu liquide riche induit ce changement de phénotype. Une deuxième culture en milieu

carencé en fer ne permet pas de restaurer le phénotype *petite colonie* originel. De façon intéressante, lorsque la souche est cultivée en CAA liquide puis sur LB gélosé, le nombre de *grosses colonies* est beaucoup moins important puisqu'il ne représente que 50 % après 48 h. Bien que ce pourcentage soit important, il est intéressant de noter qu'après 24 h de culture, seuls 2 % des colonies sont de phénotype *gros*. Enfin, lorsque le mutant n'est cultivé que dans des conditions de carence en fer, alors la culture n'est composée que de petites colonies, même après 48 h.

Pour comprendre l'origine du phénotype *grosses colonies*, des PCR de vérification ont été effectuées sur différents clones afin de vérifier le « génotype » de ces clones. La région *fur* et la région *pvdS* ont notamment été amplifiées pour vérifier l'absence de contamination par d'autre *Pseudomonas* ou d'autres bactéries. Alors que l'absence de contamination et le génotype Δ*fur* ont été validés, nous avons constaté, lors de l'amplification du gène *pvdS*, des amplicons de tailles variables. Ces amplicons ont été séquencés et des mutations de l'ordre de quelques nucléotides ont été détectées, dans la région promotrice ou dans le gène, empêchant la transcription ou décalant le cadre de lecture. Le mutant semble donc capable d'induire des mutations dans le gène *pvdS* vraisemblablement pour empêcher la production de ce facteur de transcription et donc la biosynthèse de la PVD. L'hypothèse est qu'en milieu riche, PP_Δ*fur* se développe rapidement et de par la production de PVD importante, fait rentrer trop de fer dans la cellule. En effet, un excès de fer peut être toxique pour les cellules, d'autant plus que Fur est décrit comme activant l'expression d'enzymes permettant la détoxification des ROS (Hassett *et al.*, 1996). Si la souche n'exprime plus cette protéine, sa capacité de détoxification, notamment vis-à-vis des ROS induits par l'internalisation du fer, est vraisemblablement diminuée.

2.2.1 Détermination des quantités de fer optimales

En conséquence, la souche PP_*Δfur* ne doit être cultivée qu'en milieu minimum et non en milieu riche. Cependant afin de stimuler la croissance bactérienne, notamment pour la première étape de culture permettant d'obtenir une densité cellulaire conséquente, il est nécessaire de déterminer une quantité de $FeCl_3$ pouvant être ajoutée dans le milieu de culture et permettant de stimuler la croissance sans avoir d'incidence sur le phénotype. Pour cela, après avoir sélectionné un clone PP_*Δfur* présentant un phénotype *petite colonie*, la souche est cultivée en milieu CAA liquide

supplémenté de différentes concentrations en $FeCl_3$. Après 0, 24 h et 48 de croissance, la densité bactérienne et la production de PVD sont estimées par lecture de DO_{600nm} et DO_{400nm} et des dénombrements sont réalisés sur des milieux CAA gélosés supplémentés des mêmes concentrations en $FeCl_3$. A l'issu de 24 h d'incubation, les colonies sont comptées et le pourcentage de *grosse colonie* est estimé (données non présentées). Les résultats concernant la croissance et la production de PVD sont présentés **Figure 32 et 33.**

La croissance de PP_*Δfur* est stimulée par l'addition de 50 nM de $FeCl_3$ dans le milieu CAA puisque cette concentration induit un doublement de la densité bactérienne ($DO_{600} = 1$) en 24 h, puis l'addition de 500 nM permet d'atteindre une DO_{600nm} de 2, qui semble être presque le maximum de croissance puisque l'addition de 5 ou 50 µM ne stimule pas beaucoup plus la croissance. (**Figure 33**). La tendance observée pour la croissance de la souche est la même pour la production de PVD (**Figure 34)**. Si on rapporte la production de PVD à la croissance de la souche, la production relative de PVD est maximale en milieu CAA puisque la souche produit une quantité importante de PVD alors que la croissance est relativement faible (données non présentées). En présence de fer, la production relative est optimale avec l'ajout de 500 nM ou 5 µM de $FeCl_3$ dans le milieu CAA.

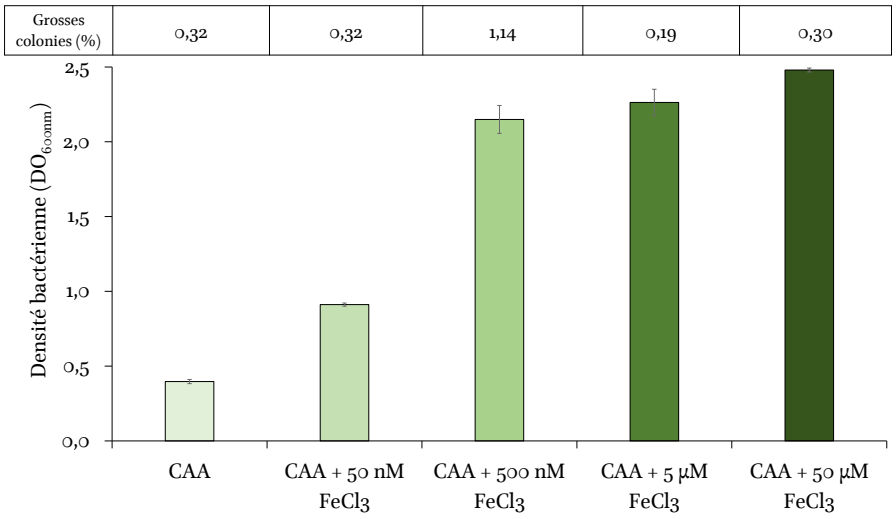


Figure 32 : Densité bactérienne de PP_*Δfur* après 24 h de croissance en milieu CAA ou avec différentes concentrations en $FeCl_3$ (50 nM à 50 µM). n = 3

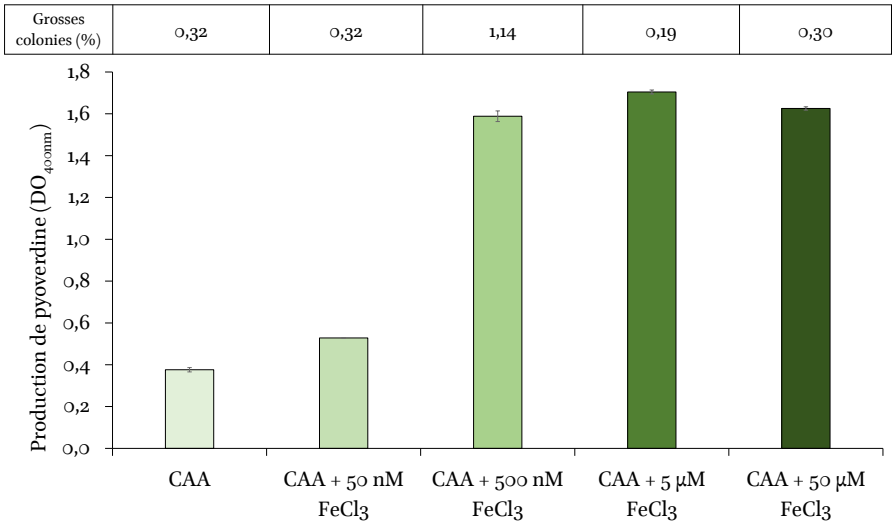


Figure 33 : Production de pyoverdine de PP_*Δfur* après 24 h de croissance en milieu CAA ou avec différentes concentrations en $FeCl_3$ (50 nM à 50 µM). n = 3

De façon intéressante, dans toutes les conditions CAA + fer testées, moins de 0,5 % de clones de phénotype *grosse colonie* ne produisant plus de PVD sont apparues, même à la plus forte concentration en fer. D'après un dosage du fer par méthode colorimétrique réalisé au laboratoire, le milieu LB contient environ 5 µM de $FeCl_3$ mais lorsque cette quantité est ajoutée en milieu minimum CAA, aucun changement de phénotype ni perte de production de PVD n'est observé comme l'illustre la **Figure 34**. Cela signifie donc que l'apparition de ce phénotype n'est pas uniquement dû à une quantité trop importante de fer mais plutôt à l'utilisation d'un milieu riche, induisant une croissance plus rapide qu'un milieu minimum et permettant potentiellement une internalisation plus rapide du fer. Ainsi, lorsque le mutant sera cultivé en milieu minimum CAA et en présence d'amiantes riches en fer durant les 24 h habituelles, une infime partie de la culture seulement serait susceptible de perdre sa capacité à produire de la PVD.

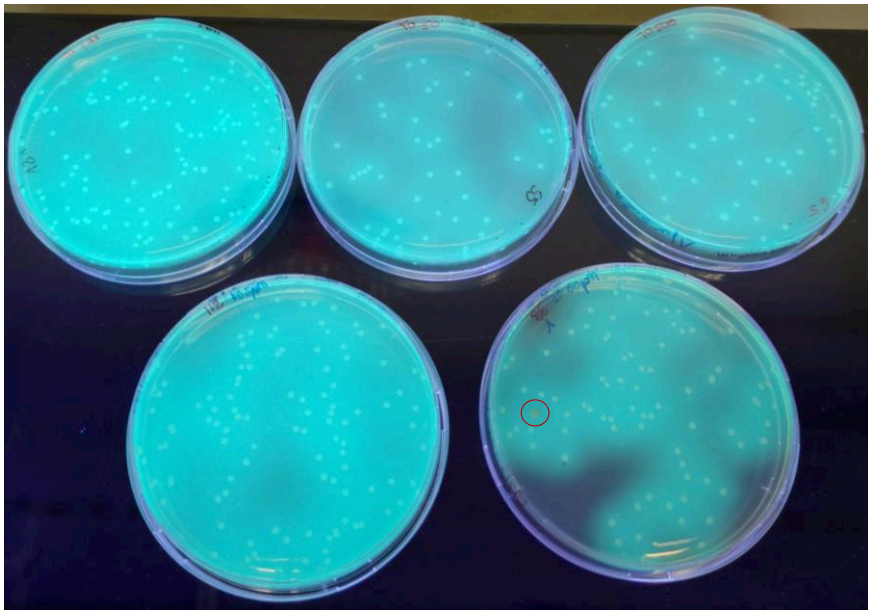


Figure 34 : Observation sous UV des dénombrements de PP_*Δfur* sur milieu CAA gélosé supplémenté de différentes concentrations en $FeCl_3$ réalisés à partir de cultures à T0 en milieux liquides correspondants. De gauche à droite : ligne supérieure : CAA, CAA + 50 nM $FeCl_3$, CAA + 500 nM $FeCl_3$. Ligne inférieure : CAA + 5 µM $FeCl_3$, CAA + 50 µm $FeCl_3$. Seule une colonie de phénotype *grosse colonie* est observé sur le milieu CAA + 50 µM $FeCl_3$. n = 3

Afin d'éviter cette répression de la production de la PVD de PP_*Δfur* liée à l'import du fer en milieu riche, nous avons tenté de déléter également le transporteur FpvA responsable de l'internalisation du complexe ferri-pyoverdine. Le double mutant PP_*Δfur_ΔfpvA* aurait alors la capacité de produire de la PVD de façon constitutive sans pour autant l'internaliser une fois complexée au fer, permettant peut-être ainsi une extraction en continu du fer des amiantes. Nous avons construit le plasmide pEXG2::*ΔfpvA* et obtenu le mutant PP _*ΔfpvA* avec un rendement de 1 clone validé pour 4 clones testés par PCR sur colonie après l'étape de contre sélection. Cependant, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir le double mutant PP_*Δfur_ΔfpvA*. D'une part, les cultures requièrent uniquement un milieu carencé en fer afin de conserver le phénotype *petite colonie* de la souche receveuse PP_*Δfur,* les conditions pour la conjugaison ne sont donc pas optimales. D'autre part, même lorsque la souche PP _*ΔfpvA* est utilisée comme souche receveuse pour la délétion de *fur,* et pouvant donc être cultivée en présence de fer, aucun clone n'est obtenu. *P. putida* n'étant pas décrit comme pouvant utiliser les voies d'import de l'hème ou du fer ferreux, la délétion du système d'import de la PVD ne lui permet peut-être plus d'internaliser les nutriments nécessaires à sa

croissance. De plus, KT2440 est décrit comme ne produisant aucun sidérophore secondaire lui permettant d'internaliser les quantités de fer nécessaires à sa croissance de façon indépendante de sa production de PVD. Nous avons alors décidé de cultiver le mutant PP_*Δfur* uniquement en milieu CAA carencé en fer ou supplémenté de 50 nM de $FeCl_3$.

2.3 Caractérisation du mutant PP_Δ*fur*

L'obtention d'un mutant délété de *fur* n'étant pas aisé chez les *Pseudomonas*, nous avons décidé de publier les résultats obtenus ci-dessous. Ce paragraphe est donc présenté sous la forme d'un article scientifique rédigé et destiné à être soumis prochainement dans le journal « Frontiers in Microbiology ».

2.3.1 Introduction de l'article

Le régulateur Fur joue un rôle principal dans l'expression d'une grande majorité des gènes impliqués dans l'acquisition du fer mais il est également bien connu pour son implication dans le métabolisme central des *Pseudomonas.* Il est notamment décrit comme essentiel pour la croissance solide de certaines espèces et impliqué dans la régulation des ROS, le quorum sensing ou encore la virulence (Hassett *et al.*, 1996; Pasqua *et al.*, 2017; Vasil, 2007). Cependant, chez KT2440, le rôle du régulateur Fur est moins bien décrit, même concernant la régulation de la voie pyoverdine. Nous avons ainsi cherché à mettre en avant le rôle de ce régulateur dans le métabolisme central de KT2440 à travers la construction du mutant PP_*Δfur*. L'article décrit la construction et la caractérisation de ce mutant.

Dans un premier temps, l'étude est consacrée à l'étude de l'impact de la délétion de *fur* sur la croissance et la production de PVD en milieu minimum, supplémenté ou non de fer, et en fonction de la source de carbone. La caractérisation vis-à-vis de la mobilité et de la capacité à former du biofilm sont également investiguées pour les 2 souches dans des milieux riches ou pauvres, supplémentés ou non en fer. Ensuite l'importance de Fur dans la production et détoxification des ROS est investiguée. Enfin, des analyses protéomiques afin de visualiser l'impact de cette délétion

sur l'ensemble du protéome en fonction des conditions de culture ont permis un premier bilan sur le rôle de Fur chez *P. putida* KT2440.

2.3.2 Contribution des auteurs

Ma contribution a été dans la construction et la caractérisation du mutant, la mise en forme des résultats, leur interprétation et la rédaction de l'article. Le Dr. Coraline Rigouin et le Dr. Valérie Geoffroy ont participé à l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article.

Involvement of Ferric uptake regulator in *Pseudomonas putida* fitness

Lemare Marion, Forster Anne, Geoffroy Valérie. A., Rigouin Coraline

CNRS-UMR7242 Biotechnologie et signalisation cellulaire, 300 bd Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France. Université de Strasbourg, Ecole Supérieure de biotechnologie de Strasbourg, 300 Bd Sébastien Brant, 6767412 Illkirch, France

SUMMARY

In *Pseudomonas,* Fur (Ferric uptake regulator) is the main protein involved in iron homeostasis. Fur can act as a negative regulator of genes involved in iron acquisition and is described to positively regulate the cellular response to oxidative stress. Fur is also reported to play a broader role by participating in the regulation of various cellular responses. In *Pseudomonas putida* KT2440, the main *Pseudomonas* strain utilized in biotechnology due to its remarkable potential in bioremediation, the role of Fur has not been studied. Due to its presence in diverse habitats and interactions with other organisms, this strain often experiences iron deprivation, compelling cells to adapt in order to obtain sufficient iron for survival while mitigating its toxicity. The study focuses on examining the impact of Fur deletion on the fitness of the *P. putida* KT2440. The growth, production of the siderophore pyoverdine (the primary strategy for iron acquisition by the cell), motility and biofilm formation, are investigated. Additionally, the importance of Fur in the production and detoxification of reactive oxygen species by the cell is examined., Finally, we conducted proteomic analyses to visualize the impact of the deletion on the entire proteome under different culture conditions to provide an initial assessment of the role of Fur in *P. putida* KT2440.

KEY WORDS

Ferric uptake regulator, *Pseudomonas putida*, iron, siderophore, proteomic

INTRODUCTION

Iron, a metal with specific redox properties, is the fourth most abundant element of the Earth's crust. It is essential for the growth and the survival of most microorganisms (Weber et al., 2006). Iron has the particularity of being able to change its oxidation state, which can go from the (0) state to Fe(VI), which makes it a metal of choice in processes using electron transfer

(Sánchez et al., 2017). It is thus involved in cellular respiration, photosynthesis and the activity of cytochromes and many enzymes involved in DNA synthesis or DNA repair use iron as a cofactor (Puig et al., 2017). Paradoxically, despite the major role played by iron in biological processes, ferrous iron Fe(II), which is more easily assimilated by organisms, has limited bioavailability due to its tendency to form insoluble Fe(III) hydroxides under aerobic conditions and at neutral pH. Considering that microorganisms require iron at an optimal growth concentration of around 10^{-6} M while the bioavailable iron concentration is approximately 10^{-18} M, microorganisms have evolved diverse iron acquisition mechanisms to overcome this challenge (Raymond and Carrano, 1979; Braun and Killmann, 1999). However, despite the need for iron, the element can be toxic for the cells because it induces reactive oxygen species (ROS) by Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO\bullet$). ROS interact with DNA causing mutations, oxidize proteins and trigger lipid peroxidation which affects dynamic nature and fluidity of the membrane (Winterbourn, 1995; Cabiscol et al., 2000; Zhang et al., 2020). Consequently, iron homeostasis in bacteria must be tightly controlled in order to fit cell requirements while avoiding toxicity. Proteins involved in this regulation in bacteria are transcriptional regulators belonging to the Fur (Ferric Uptake Regulator) and DtxR (Diphtheria toxin regulator) families (Hantke, 2001; Fillat, 2014). Fur is present in a large number of microorganisms (Escolar et al., 1999). It is a tetrameric protein that uses Mn(II) or Fe(II) as a cofactor to bind DNA. This assembly leads to the dissociation of the tetramer into active dimers which then bind to regulatory elements located upstream of a target gene. Consequently, it prevents the binding of RNA polymerase through steric hindrance, effectively repressing gene transcription (Ochsner and Vasil, 1996; Hassan and Troxell, 2013). Fur DNA binding sites, called Fur-boxes, are located approximately 19 bp before the target gene. They are defined by the palindromic sequence TGATAATnATTATC (Escolar et al., 1999; Steingard and Helmann, 2023). Thus, through the action of Fur, the expression of genes displaying a Fur-Box is subject to regulation dependent on intracellular Fe(II) concentration, which is notably the case of the majority of the genes involved in iron acquisition (Hassan and Troxell, 2013). The main iron acquisition strategy in bacteria involves the production and utilization of siderophores, small low molecular weight organic molecules (< 2500 Da) with a very high affinity for ferric iron (Kraemer, 2004). These siderophores are secreted into the surrounding medium, where they chelate the ferric iron and re-enter the cell *via* specific transporter to meet bacterial needs. In addition to controlling iron acquisition, Fur is known in bacteria to be involved in other cellular processes such as defense against oxygen radicals, chemotaxis, metabolic pathways, bioluminescence, acid shock response, mobility and the production of toxin and other virulence

69 factors (Escolar et al., 1999). Evidence of the Fur can also act as direct transcriptional activator
70 by binding upstream of genes or indirectly by repressing the expression of microRNA involved
71 in the repression of some genes (Lee and Helmann, 2007; Hassan and Troxell, 2013).
72 *Pseudomonas* is a genus of Gram negative bacteria composed of numerous species, most of
73 them found ubiquitously on Earth. *Pseudomonas* species colonize diverse terrestrial and
74 aquatic habitats, play diverse functions due their metabolic versatility and are found in positive
75 or negative interactions with bacteria, plants and humans (Silby et al., 2011). Regardless of the
76 life conditions, *Pseudomonas* species encounter iron deprivation and must adapt to acquire the
77 iron they need to survive and proliferate. Fur is recognized in *Pseudomonas* as a major regulator
78 in iron acquisition and utilization, playing a crucial role in maintaining iron balance within the
79 cell responding to changes in iron availability (Visca and Imperi, 2018). Nevertheless, the
80 involvement of FUR in various cellular functions, such as the regulation of oxidative stress,
81 biofilm formation, and virulence, varies across different species. For example, the presence of
82 Fur has proven to be necessary for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas*
83 *syringae* pv. tomato DC300 (Butcher et al., 2011; Pasqua et al., 2017). On the contrary, Fur is
84 not essential in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528 (Cha et
85 al., 2008; Wang et al., 2009). In addition to its known role as negative regulator, Fur can act as
86 an activator indirectly by repressing microRNA such as PrrF1 et PrrF2, that act as
87 posttranscriptional repressors of genes involved in iron storage, oxidative stress and cellular
88 respiration (Vasil, 2007).
89 *Pseudomonas putida* is a species that develop in various habitats, including soil, water and
90 plant rhizospheres (Silby 2011). They are mostly non virulent for human and recognized as a
91 plant growth-promoting bacteria (Timmis, 2002; Molina et al., 2020). More specifically, the
92 strain *P. putida* KT2440 is the best-characterized member exhibiting robust growth, remarkable
93 resistance to oxidative stress (Kim and Park, 2014) and possesses numerous metabolic
94 pathways that enable it to utilize diverse carbon sources, making it an attractive candidate for
95 biotechnological applications (Nelson et al., 2002; Nikel and de Lorenzo, 2018). Its well-
96 characterized genetics and physiological properties has allowed to extensively engineer this
97 strain to enhance its capabilities, such as improving the production of valuable compounds and
98 developing environmentally friendly processes (Nikel et al., 2016). However, iron homeostasis
99 in this bacteria is only partially characterized and the role of Fur in iron acquisition and its
100 involvement in additional cellular functions is not known. Understanding the regulatory
101 mechanisms controlled by FUR in *P. putida* can provide insights into how this bacterium adapts
102 to varying iron concentrations and how it efficiently utilizes iron for its growth and survival.

Such knowledge can contribute to the development of strategies for improving bioremediation processes and optimizing biotechnological applications.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of the mutant PP_Δfur

Deletion of the gene was performed by inserting the suicide vector pEXG2::Δfur in the KT2440 strain, followed by homologous recombination. To obtain the pEXG2::Δfur plasmid, two regions of 550 bp flanking the *fur* gene were amplified by PCR from KT2440 genomic DNA with the Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific™) using the primers PP_fur_Am_F and PP_fur_Am_R and PP_fur_Av_F and PP_fur_Av_R (Supplemental Table 1). Plasmid pEXG2 was linearized and amplified by PCR using the Phusion High-Fidelity DNA polymerase and primers pEXG2_F and pEXG2_R_2 and then treated with *DpnI* (ThermoScientific™). NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs™) was carried out to assemble the three fragments and generate the pEXG2::Δfur plasmid. Top10 cells were then transformed with the assembly and used in triparental conjugation with *P. putida* KT2440 as receiver strain and *E. Coli* HB101 prK600 as the helper strain (Kessler et al., 1992). Briefly, for the conjugation, the three strains were grown overnight under agitation at 30°C in Luria Bertani broth (LB) and 500 µL of each culture were mixed and centrifuged at 9,871 x g for 2 min. The pellet was then resuspended in 30 µL of fresh LB broth and plated as a drop on the center of an LB plate before incubating for 5 h at 30°C. The resulting colony was recovered with an inoculation loop, resuspended in 1 mL LB, and 100 µl spread on LB plate with 30 $\mu g \cdot mL^{-1}$ gentamicin (Gm) and 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ chloramphenicol (Chl) and then incubated at 30°C for two days to select for *P. putida* KT2440 that integrated the plasmid. Few colonies were then resuspended gently in 1 mL of LB broth, grown for 4 h at 30°C under agitation and then pelleted twice, resuspended in 50 µL fresh LB medium, and streaked onto LB agar with 6% (w/v) sucrose for counter-selection to force plasmid excision. Colonies that lost Gm resistance were selected and the deletion was verified by colony PCR using TaqOzyme purple mix (Ozyme) and the primers PP_fur_Am_F and PP_fur_Av_R (Supplemental Table 1) and sequencing (Eurofins genomic).

Growth conditions and pyoverdine production in CAA medium

P. putida KT2440 was grown for 24 h at 30 °C in LB under agitation (220 rpm). The mutant PP_Δfur was grown in the same conditions but in an iron-poor casamino acid (CAA) medium (composition in $g \cdot L^{-1}$: casamino acids 5, $K_2HPO_4.3$ H2O 1.46, $MgSO_4.7$ H2O 0.25) supplemented with 50 nM of $FeCl_3$. To induce pyoverdine production, the previous pre-cultured cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed twice with sterile CAA medium and 100 µL of the washed pre-culture were added to 10 mL of sterile CAA medium, and then incubated for 24 h at 30°C under agitation in order to have an iron-poor-preculture. For growth assays, these double-pre-cultured cells were washed again twice with CAA medium before being used in culture. For the 24-h kinetic, pre-cultured cells were adjusted to an OD600nm of 0.1 in LB or CAA medium, supplemented with $FeCl_3$ for a final concentration of 50 nM or 5 µM $FeCl_3$, and incubated for 24 h at 30°C under agitation in 50 ml Falcon tubes. Each sample was prepared in biological triplicate for each cell culture condition. The bacterial density was regularly measured at OD600nm in a spectrophotometer (Biophotometer Eppendorf). In order to estimate the pyoverdine production, the OD400nm of the supernatant was measured after centrifugation of the culture during 5 min at 9.871 x g (SPECORD 205 Analytik Jena)

Influence of the carbon source

In order to assess the impact of the carbon source on the growth and the pyoverdine production of PP_Δfur in comparison with KT2440 WT, both strains were grown in iron-poor minimum media (composition in $g \cdot L^{-1}$: $K_2HPO_4.3$ H_2O 7.43, $KH_2PO_4.6$ H_2O 3, $MgSO_4.7$ H_2O 0.20, $(NH_4)_2SO_4$ 1) supplemented with carbon source: succinate 75 mM (MMsuccinate), citrate 50 mM (MMcitrate) or benzoate 43 mM (MMbenzoate). The carbon source concentrations were chosen to have 300 mM carbon equivalent in each medium to ensure optimal carbon supply for biomass growth (Mendonca et al., 2020). These media are compared with the CAA medium described previously. Both bacteria were grown for 24 h at 30°C in each iron-poor minimum medium under agitation (220 rpm). Pre-cultured cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed once with sterile appropriated minimum medium and 100 µL of the washed pre-culture were added to 10 mL of the same sterile medium, and then incubated for 24 h at 30 °C under agitation. Double-pre-cultured cells were washed again once with appropriate minimum medium before being used in culture. For the 24-h kinetic, pre-cultured cells were adjusted to an OD600nm of 0.05 in each of the minimum medium and incubated for 48 h at 30°C under agitation in 50 ml Falcon tubes. Each sample was prepared in biological

duplicate for each cell culture condition. The bacterial density was regularly measured at OD600nm in a spectrophotometer (Biophotometer Eppendorf). In order to estimate the pyoverdine production, the OD400nm of the supernatant was measured after centrifugation of the culture during 5 min at 9,871 x g (SPECORD 205 Analytik Jena)

Motility assays

For motility assay, precultured cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed twice with sterile CAA medium and 100 µL were added to 10 mL of LB or CAA supplemented or not with 50 nM or 5 µM $FeCl_3$ and then incubated for 24 h at 30°C under agitation. After incubation, OD600nm of the cultures were adjusted to the smallest one in LB or CAA supplemented or not with 50 nM or 5 µM $FeCl_3$. For the inoculation of semi-solid plates for swimming assay, a sterile toothpick was used, being careful not to touch the bottom of the plate. After being soaked in the bacterial culture, it was stabbed in the center of the Petri dish, without touching the bottom of the plate. Plates were incubated upright for 24 h at 30°C (Ha et al., 2014). For the semi-solids medium, we used LB or CAA, supplemented or not with 50 nM or 5 µM $FeCl_3$, with 0.3 % agar, corresponding to the optimal conditions for swimming motility. For the study of swarming motility, 0.5 % of agar was used in the same media and plates were incubated with a droplet of 2.5 µL of bacterial culture and then incubated during 24 h at 25°C (Matilla et al., 2007). For the twitching assay, 1.0 % of agar was used in the same media and a sterile toothpick was used, touching the bottom of the plate. Plates were incubated upright for 24 h at 30°C in a humid chamber (Turnbull and Whitchurch, 2014). Each sample was prepared in biological triplicate for each cell culture condition.

Biofilm assays

Pre-cultures were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed twice with sterile CAA medium and 100 µL were added to 10 mL of LB or CAA supplemented or not with 50 nM or 5 µM $FeCl_3$ and then incubated for 24 h at 30°C under agitation. After 24 h, cultures were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed twice with the corresponding medium and the OD600nm of each culture was adjusted to 0,1. For this experiment, 9 x 200 µL of each adjusted-culture (LB or CAA supplemented or not with 50 nM or 5 µM FeCl3) were added in a 96-well plate (Greiner, PS flat-bottom microplate) and then incubated 24 h without agitation to determine the biofilm biomass. For that, supernatants were carefully removed and cleaned with H_2O and remaining biofilms were dried during 1 h at 60°C. 220 µL of 0.1 % crystal violet were added in each well, incubated at room temperature for 10 min and then

removed. 3 water-washes were necessary to remove all non-specific crystal violet coloration before fixing it during 1 h at 37°C. Coloured-biofilms were dissolved using 220 µL 33 % acetic acid per well. 200 µL of each well were transferred in a new 96-well plate (Greiner, PS flat-bottom microplate) and the biomass of biofilm was estimated by reading the OD500 using a Tecan microplate reader (Infinite 200 Pro, Tecan) (Pompilio et al., 2008; O'Toole, 2011).

Proteomic analysis

Pre-cultured cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed twice with sterile CAA medium and 100 µL of the washed pre-culture were added to 10 mL of sterile CAA medium, and then incubated for 24 h at 30°C under agitation in order to have an iron-poor-preculture. After 24 h, cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min and washed twice with sterile CAA medium. Cells were diluted to an OD600nm of 0.1 and grown in CAA medium, supplemented or not with 5 µM $FeCl_3$ at 30°C under agitation for 8 h. 5.10^8 cells from each culture were used for proteomic analysis and each sample was prepared in biological triplicate for each cell culture condition. Cell pellets were resuspended in 100 µL of lysis buffer (8M urea, 2M thiourea, 1% CHAPS and 20mM Tris-HCl pH 7.6) supplemented with universal nuclease and DNase. A Bradford assay was used to determine protein concentration in each sample, using bovine serum albumin as a standard. Proteins were precipitated overnight with 5 volumes of glacial 0.1 M ammonium acetate in methanol 100 %. Samples were pelleted by centrifugation at 12,000 x g for 15 min at + 4°C and washed twice with 0.1 M ammonium acetate in 80 % methanol, before being finally dried under vacuum (Speed-Vac concentrator, Eppendorf). Resulting pellets were resuspended using 100 µL of 50 mM ammonium bicarbonate.Proteins were then reduced using 5 mM dithiothreitol at 95°C during 10 min and further alkylated using 10 mM iodoacetamide at room temperature during 20 min. Finally, a digestion was performed overnight on intact proteins, using 150 ng of sequencing-grade trypsin (Promega). The proteomic datasets were obtained by the injection of 1000 ng of each peptidic mixture on a TripleTOF 5600 mass spectrometer (Sciex) coupled to a U3000-RSLC liquid chromatography (Thermo-Fisher Scientific) as described previously (Perraud et al., 2022). The mass spectrometric data were deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXDxxxx (for reviewers: login = xxxxx, password = xxxxx). The raw data obtained were converted into .mgf files with the ProteoWizard msConvert tool and searched against the *P. putida* UniprotKB sub-database with a decoy strategy (UniprotKB release 2021-09-23, taxon 160488, *P. putida* strain ATCC 47054, 5527 forward protein sequences). Peptides and proteins were identified with

Mascot algorithm (version 2.6.2, Matrix Science, London, UK). The following parameters were used: (i) Trypsin/P was selected as enzyme, (ii) 3 missed cleavages were allowed, (iii) methionine oxidation, acetylation of protein N-term and carbamidomethylation of cysteine were set as variable modifications, (iv) mass tolerance for precursor ions was set at 20 ppm, and at 0.5 Da for fragment ions. Mascot data were further imported into Proline v1.6 software (Bouyssié et al., 2020). Proteins were validated on Mascot pretty rank equal to 1, score >25 and 1% FDR (False Discovery Rate) on both peptide spectrum matches (PSM score) and protein sets (Protein Set score). The total number of MS/MS fragmentation spectra was used to quantify each protein from at least three independent biological replicates. After a normalization of the data matrix with the total number of spectra in one sample, the BasicSC spectral count values were submitted to a negative-binomial test using an edgeR GLM regression through R (Kuhn et al., 2023). For each identified protein, the statistical test between two conditions returns an adjusted P-value (p-value corrected by Benjamini–Hochberg), as well as a protein fold-change (FC): these 2 values are then used to draw a Volcano plot in order to highlight proteins regulated in both tested conditions.

ROS measurements

ROS detection assay kit from Abcam was used as indicated in the provided protocol. Double-pre cultured cells were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min, washed once with sterile CAA medium and diluted to reach an OD600nm of 0.01 in 10 mL of CAA medium and then incubated overnight at 30°C under agitation (220 rpm) for the assay. 1.5 µL of overnight cultures adjusted at an OD600nm of 1.0 were pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min and washed once with sterile Phosphate buffer saline (PBS) and then incubated with 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA) reagent (20µM) for 30 min at 37°C in the dark. Then cells are pelleted by centrifugation at 9,871 x g for 10 min and 1.5 mL of the buffer 1 X was added. 100 µL of each condition are stimulated with iron, *tert*-Butyl hydroperoxide (TBHP) 1 mM or H_2O_2 10 mM as positives controls of the ROS production for 4 h at room temperature and fluorescence was read as indicated using a Tecan microplate reader (Infinite 200 Pro, Tecan).

RESULTS

Growth and siderophore production

In order to investigate the role of Fur in *P. putida* KT2440, we built a mutant in which the gene encoding the regulator Fur is deleted. The resulting strain was named PP_Δfur. When grown on agar minimal medium CAA, colonies of PP_Δfur were smaller than the wild type strain *P. putida* KT2440 (KT2440 WT) and showed a bigger surrounding yellow halo and an exacerbated fluorescence, suggesting an increased production of the siderophore pyoverdine. Microscopic observations of PP_Δfur colonies during the exponential phase of growth in iron-depleted conditions confirmed the reduced size of the cell and a more rounded shape (data not shown). These phenotypic changes between KT2440 WT and PP_Δfur suggest that the deletion has an impact on the cell morphology. To further compare the growth of both strains, they were cultivated in CAA supplemented or not with 5 µM $FeCl_3$. In the presence of iron, the growth PP_Δfur is delayed compared to KT2440 WT and stops at lower cell density (figure 1). Previous experiments (data not shown) allowed us to confirm that despite the difference in cell morphology, the correspondence between the OD600nm and the number of bacteria per unit volume is the same for the two strains. Data shows that the growth rate of PP_Δfur is impacted, measured at 0.0101 min^{-1} compared to 0.0153 min^{-1} obtained for KT2440 WT, representing generation times of 68.2 min and 45.3 respectively. In the absence of iron, the growth of both strains is affected with a significant increase of the generation time to 94.9 min for PP_Δfur and 61.8 min for KT2440 WT. These data suggest that the deletion of Fur in *P. putida* impacts both cell morphology and growth.

PVD production by KT2440 WT and PP_Δfur was monitored in iron-depleted or iron-replete media after 24h of growth (figure 2). For KT2440 WT, as expected, the production of PVD relative to the growth decreases when iron concentration increases. For PP_Δfur the relative amount of PVD produced is directly correlated to the concentration of iron in CAA medium. Higher level of PVD are observed when CAA is supplemented with iron, suggesting that PVD production by PP_Δfur is stimulated by the presence of iron. However, in LB medium, which contains iron at approximately 5 µM, PVD production is significantly lower than in CAA supplemented with iron at 5 µM. The observed difference in PVD production between PP_Δfur under different iron concentrations suggest that iron alone may not be the sole factor stimulating PVD production. We hypothesize that the carbon source present in the medium could also play a significant role in regulating PVD production.

To study this hypothesis, KT2440 WT and PP_Δfur were grown in several media only differing by the carbon source: amino acid (CAA), succinate, citrate and benzoate. Such gluconeogenic substrates are known to improve PVD production in *P. putida* (Mendonca et al., 2020). As depicted in figure S1A the growth of both strains was equivalent in CAA. When succinate is the carbon source, the both strains grows at higher density, when citrate is the carbon source, PP_Δfur growth is delayed compared to KT2440 WT, and when benzoate is the carbon source, PP_Δfur strain is not capable of growing. PVD production was also monitored for both strains in the same conditions. Figure S1B shows that in CAA both strains produce PVD at the same level. In citrate, PVD production by PP_Δfur was delayed, which correlate with the growth. Noteworthy, when succinate is the carbon source, PP_Δfur does not produce PVD despite the fact it grows normally. This suggests that the deletion of Fur affects the cell's central carbon as PP_Δ*fur* demonstrates an inability to utilize specific carbon sources. These results provide further evidence regarding the influence of carbon sources on PVD production and shed light on the role of FUR regulating genes involved in this pathway.

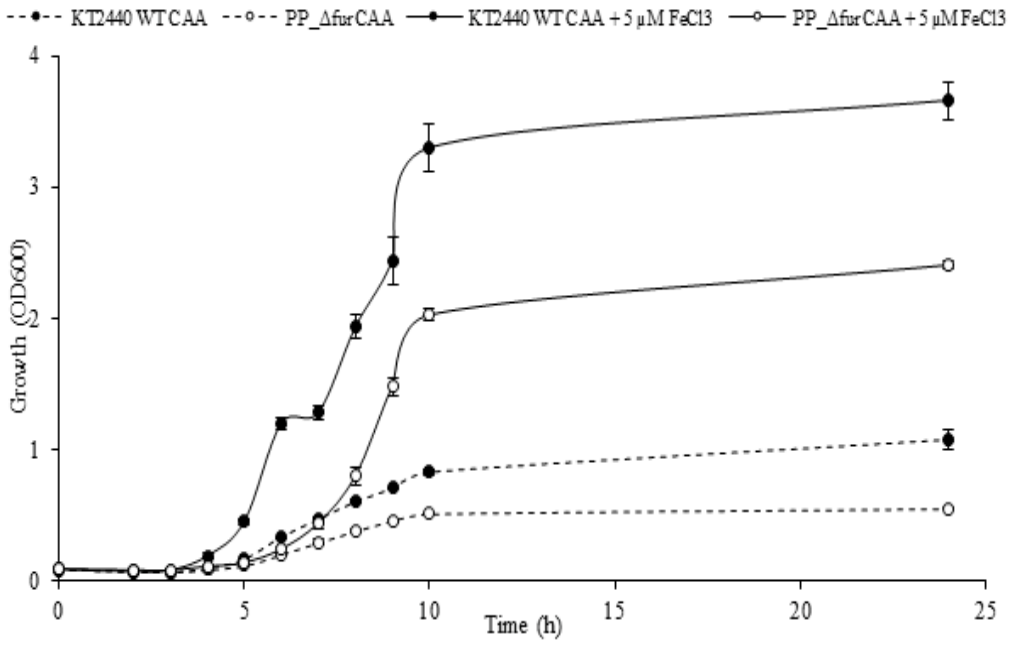


Figure 1: Growth of the strains KT2440 WT (black dots) and PP_Δfur (white dots) in CAA supplemented (plain line) or not (dash line) of 5µM FeCl3 during 24 h under agitation (220 rpm). Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

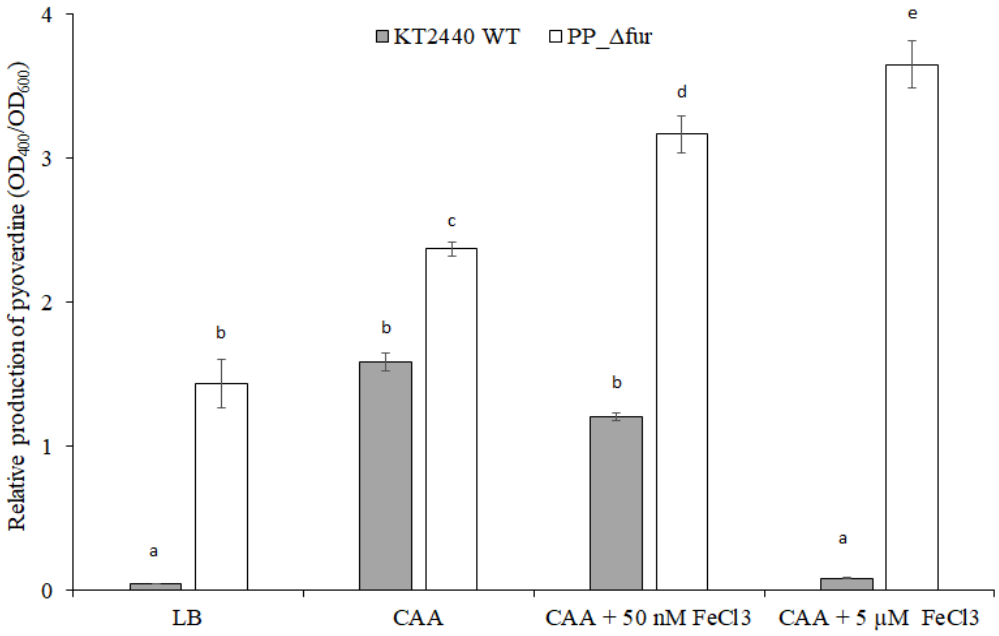


Figure 2: Pyoverdine production relative to growth (OD400/OD600) after 24 h of incubation at 30°C under agitation (220 rpm) for the strains KT2440 WT (grey) and PP_Δfur (white) in LB medium or CAA supplemented or not of 50 nM or 5 µM $FeCl_3$. Error bars indicate the standard errors of the means of three biological replicates.

Motility, biofilm formation and ROS detoxification

In order to investigate the importance of Fur in bacterial motility, the KT2440 WT and PP_Δfur strains were grown in solid media to monitor their swimming, swarming and twitching capacity. Regardless of the tested conditions (rich and minimal iron-replete or iron-depleted media), our investigation revealed that both KT2440 WT and PP_Δfur exhibited an inability to perform swarming and twitching motility (data not shown). In terms of swimming ability, both strains demonstrate increased mobility in a nutrient-rich medium compared to a minimal medium, regardless of iron supplementation (figure 3A). The PP_Δfur strain exhibits reduced swimming compared to the WT strain in both iron-replete and iron-depleted CAA media. These results suggest that Fur plays a role in the regulation of cell motility but that this capacity does not entirely relies on Fur since the strain is still able to move. The capacity of PP_Δfur to form biofilm was also investigated and compared to that of KT2440 WT. Biofilm formation was the highest for both strains in a rich medium and no difference was found between the two strains (figure 3B). In a minimal medium with low iron concentration, the biofilm formation of PP_Δfur is reduced compared to the WT. However, at high concentration, the biofilm formation of PP_Δfur is enhanced. The decreased capacity of PP_Δfur to form biofilm in minimal medium may be correlated to the reduced mobility measured for the PP_Δfur strain.

We next monitored the production of ROS in both the KT2440 WT and PP_Δfur strains. ROS inducers were added to the cells in order to evaluate the capacity of both strain to handle ROS generation. Our experiment provides evidence on the fact that despite the addition of ROS inducer, the level of ROS in both strains does not increase (figure 4). In addition, regardless of the presence or absence of ROS inducers, ROS level was found higher in the PP_Δfur cells. This suggest that KT2440 WT is not sensitive to oxidative stress and that PP_Δfur is only partially involved in the detoxification process.

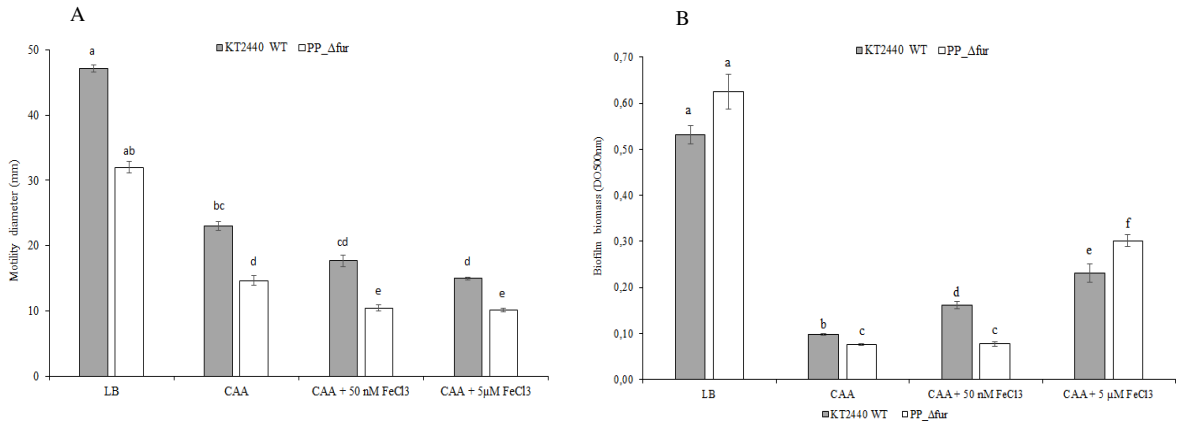


Figure 3: Swimming motility (A) and biofilm formation (B) of the strains KT2440 WT (grey) and PP_Δfur (white) after 24 h of incubation at 30°C in LB medium or CAA supplemented or not of 50 nM or 5 µM $FeCl_3$. Error bars indicate the standard errors of the means of two biological replicates.

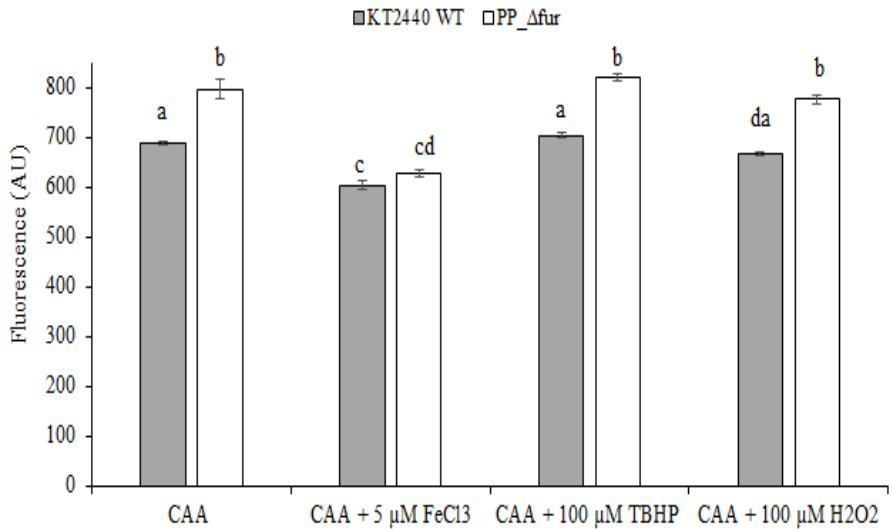


Figure 4: Oxidative stress of the strains KT2440 WT (grey) and PP_Δfur (white) after 4 h of stress induction (5 µM $FeCl_3$, H_2O_2, TBHP) in CAA medium. Error bars indicate the standard errors of the means of two biological replicates.

Comparative proteomics analysis

To provide a more comprehensive insight into the functional differences arising from the deletion of Fur in *P. putida* KT2440, a comparative proteomic analysis was performed between the KT2440 WT and the PP_Δfur strains. First, we analyzed the proteome of the PP_Δfur strain in comparison to the one of the WT strain when grown in an iron-depleted medium (CAA). We found 42 proteins that are significantly differentially expressed by both strains as depicted in figure 5A. In order to link the proteomic results to the data presented above, proteins were classified in groups biochemically relevant to our study: proteins involved in cell motility, in defense mechanism, in biofilm formation and in pyoverdine pathway. Proteins that could not be classified in the groups were classified as "other". In the absence of iron, only few proteins belonging to these groups were found differentially expressed by the two strains. Of note, the isocitrate lyase AceA, an enzyme involved in glucose synthesis, annotated as having a role in biofilm formation but described in *P. aeruginosa* as playing a role in metal protection, is overexpressed in PP_Δfur compared to KT2440 WT. Interestingly, this protein is also found overexpressed in KT2440 WT in the presence of iron compared to the condition with no iron (data not shown) suggesting a role in metal protection mediated by Fur. Proteins involved in PVD production are not overexpressed in PP_Δfur compared to the WT strain, which correlates with the amount of PVD produced in iron-depleted medium that was found to be the same for both strains (figure 2). Several proteins are under-expressed in PP_Δfur compared to KT2440 WT. Two of these proteins are classified into defense mechanisms (PP_0235, 1-Cus peroxiredoxin) and sodB (superoxide dismutase B) suggesting that Fur may exert a positive regulation on these proteins.

Next, we analyzed the proteome of PP_Δfur in comparison to the one of KT2440 WT when grown in an iron-replete medium (Figure 5B). 355 proteins are differentially expressed by the two strains. Most of the proteins that are found overexpressed in PP_Δfur compared to KT2440 WT are proteins of the PVD pathway. This is in accordance with the fact that Fur negatively regulates the expression of the genes of the PVD pathway and in accordance with what was seen in figure 2: an increased PVD production for the PP_Δfur strain compared to the WT in an iron-replete medium. Surprisingly, the transcriptional factor PvdS, known to be directly under the control of Fur, is not overexpressed in PP_Δfur strain compared to KT2440 WT (and barely overexpressed by KT2440 WT when grown in the absence of iron (data not shown)). This suggests that *pvdS* is subject to another regulation independent of Fur and that the genes of the PVD pathway may be directly regulated by Fur as they are found overexpressed in a Δ*fur* mutant uncorrelated to PvdS amount. Interestingly, we found that a lot of proteins are

down-regulated in the PP_Δfur strain compared to the WT strain in the presence of iron. Among these proteins, only a few of them could be classified in our groups: seven proteins involved in defense mechanisms and nine proteins involved in cell motility. This suggests that in the presence of iron, Fur is used by the cell to trigger the expression of proteins involved in cell defense and motility. This is in accordance with the decrease of motility measured for the PP_Δfur strain in CAA supplemented by iron (figure 5A) and with the increase of ROS measured in the PP_Δfur strain (figure 4).

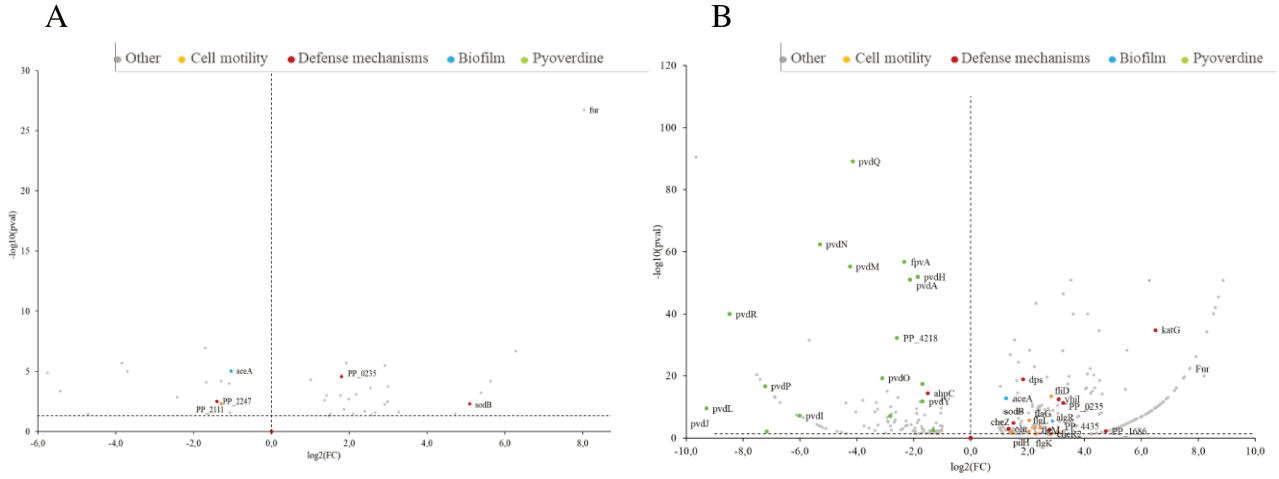


Figure 5: Analysis of changes in the expression of proteins dependent on the expression of *fur* gene in *P. putida* KT2440. Proteomic analyses were performed on KT2440 WT and PP_Δfur cells grown overnight in CAA medium (A) or CAA medium supplemented with 5 µM of $FeCl_3$ (B). Average values measured for KT2440 WT were plotted against average values measured for PP_Δfur. Average values represent the average of the relative intensity of each protein, normalized against all proteins detected by shotgun analysis (n=3). In orange, proteins involved in cell motility; in red involved in defense mechanisms, in blue and green involved in biofilm and PVD systems respectively

DISCUSSION

Our study addresses, for the first the time, the role of the regulator Fur in *P. putida* KT2440. By constructing a strain deleted of this regulator, we have provided evidence that Fur is not essential for the survival of *P. putida* KT2440 whether it is in liquid or in solid media. In *P. aeruginosa* PAO1 only a conditionally deleted *fur* mutant could be obtained and was able to proliferate in liquid medium or biofilm (Pasqua et al., 2017). This confirm once again the observed dissimilarity among *Pseudomonas* species regarding the essentiality of Fur (Visca and Imperi, 2018). However, the deletion of Fur in *P. putida* KT2440 had significant effects on cell morphology, growth and metabolism indicating the implication of Fur in maintaining normal fitness of the cell. As expected, PP_Δfur produced PVD constitutively, confirming the

negative regulation of Fur on the PVD pathway. The investigation of the capacity to utilize various carbon sources revealed that PP_Δfur strain displayed altered growth and PVD production in specific carbon sources such as citrate, succinate and benzoate. These findings provide insights into the importance of Fur in central carbon metabolism and the correlation between carbon utilization and PVD production. The inability of PP_Δfur to utilize certain carbon sources indicates the regulatory role of Fur in carbon source utilization, affecting both growth and PVD production. Mendonca et al. have studied the metabolic routes used by *P. putida* KT2440 depending of the available carbon source (Mendonca et al., 2020). In accordance with their work, we did find that gluconeogenic substrates promote the growth of *P. putida* KT2440 although this enhancement was not correlated with increased PVD production. They showed that iron deficient cells prefer gluconeogenic substrates over glucose and that this preference is due to the expression of enzymes involved in transport and catabolism of the substrates. Our findings suggest that these protein expressions could be regulated by Fur since PP_Δfur does not grow as well as the wild type strain on gluconeogenic substrates. Proteomic analysis of the strains cultivated in succinate or citrate would certainly confirm this hypothesis. In addition, our study supports the hypothesis that Fur is involved in the regulation of genes involved in the metabolism of aromatic carbon source (Joshi et al., 2014).

We next investigated the role of Fur in cell motility and biofilm formation. The capacity to swarm and swim are directly correlated to the production of an active flagella and the presence of the flagella is necessary to establish the first step of the biofilm in *Pseudomonas* (Valentin et al., 2022). In *P. synringae* pv. tabaci 11528, Fur regulates the swarming motility and the production of siderophore (Cha et al., 2008). In *Pseudomonas putida* KT2440, PVD production is necessary for swarming capacity (Matilla et al., 2007). Despite our conditions that were adjusted to identify swarming motility as described by Matilla et al., we found *P. putida* KT2440 and the PP_Δfur incapable of swarming. The absence of Fur in *P. putida* decreases the capacity of strain to swim correlated to an altered capacity to form biofilm in a minimal medium at low iron concentration. However, it is surprising to observe that in the presence of high concentration of iron, PP_Δfur shows altered swimming capability but an enhanced capacity to form biofilm. It is known that iron concentration and biofilm formation are linked in *Pseudomonas*. In *P. aeruginosa* PAO1, iron regulates biofilm formation and cell attachment and biofilm formation are necessary for full PVD production (Banin et al., 2005; Kang and Kirienko, 2017) and in *P. putida* GB-1 it has been shown that iron sequestration prevents biofilm formation (Lee et al., 2014). Our proteomic analysis reveals that nine proteins involved

in motility - including flaG and flgL for synthesis of the flagella- are significantly less abundant in the absence of Fur when cell grow in iron rich medium. This confirms the hypothesis that Fur is positively involved in cell motility. Only two proteins annotated as involved in biofilm formation were found to be differentially expressed in *P. putida* KT2440 and PP_Δfur. In particular, algR is found less abundant in PP_Δfur. This regulatory protein is involved in the expression of many different genes in *P. aeruginosa* in particular in initial biofilm formation (O'Toole and Kolter, 1998). The potential interconnection between AlgR and Fur for the regulation of biofilm in *P. putida* remains unexplored and requires further investigation.

The link between oxidative stress and Fur has been proposed in several species of *Pseudomonas*. Hassett et al. showed that Fur-depleted *Pseudomonas aeruginosa* has a higher level of ROS in a rich medium (Hassett et al., 1996). The involvement of two small regulatory RNAs (PrrF1 and PrrF2) is described. In iron deficiency conditions, Fur represses PrrF1 and PrrF2, thus inducing the expression of genes involved in the storage of iron or the defense against oxidative stress such as sodB (Vasil, 2007). In our study, we observed that PP_Δfur has a higher level of ROS regardless of the presence of iron. This is consistent with our proteomic analysis which indicates that several proteins involved in defense mechanisms, particularly the superoxide dismutase SodB responsible for ROS detoxification are expressed at lower levels in PP_Δfur compared to KT2440 WT, irrespective of the presence of iron. This confirms that Fur positively regulated these enzymes and in the presence of lower amount of those enzyme, the cell become more sensitive to stress.

Of note, we observed that when PP_Δfur is cultured in rich a medium for several generations, the strain undergoes mutations leading to the repression of its PVD production. In particular, we discovered mutations in the *pvdS* gene (data not shown) resulting in the absence of *pvdS* transcript or truncated protein. The is likely a strategy that the strain employs to limit the import of iron through PVD synthesis which becomes toxic at high concentrations. Interestingly, the apparition of such spontaneous mutants of PP_Δfur was not observed in minimal medium supplemented with high iron concentration, suggesting that iron toxicity occurs only when cells grow rapidly. Finally, it is interesting to note that PvdS, the transcriptional factor involved in PVD production is not found overexpressed in PP_Δfur compared to KT2440 WT although most of proteins of PVD biosynthesis are expressed in higher level. We hypothesize that *pvdS* may be subject to other regulation dependent of iron but independent of Fur and that genes of the PVD pathway are directly regulated at their transcriptional level by Fur or another transcriptional factor under the regulation of Fur. This directly implies that the PVD regulation pathway in *P. putida* differs from the one of *other Pseudomonas* (Schalk 2020).

Overall, our study reveals that Fur has complex effects on the behavior *of P. putida* KT2440 in response to iron levels, affecting different cellular processes in diverse ways. Further investigation and analysis would be required to understand the underlying mechanisms responsible for these contrasting outcomes.

REFERENCES

Banin, E., Vasil, M. L., and Greenberg, E. P. (2005). Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 11076–11081. doi: 10.1073/pnas.0504266102.

Bouyssié, D., Hesse, A.-M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., et al. (2020). Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* 36, 3148–3155. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa118.

Braun, V., and Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Science* 24, 104–109. doi: 10.1016/S0968-0004(99)01359-6.

Butcher, B. G., Bronstein, P. A., Myers, C. R., Stodghill, P. V., Bolton, J. J., Markel, E. J., et al. (2011). Characterization of the Fur Regulon in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 ▿ . *J Bacteriol* 193, 4598–4611. doi: 10.1128/JB.00340-11.

Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. 3, 3–8.

Cha, J. Y., Lee, J. S., Oh, J.-I., Choi, J. W., and Baik, H. S. (2008). Functional analysis of the role of Fur in the virulence of Pseudomonas syringae pv. tabaci 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366, 281–287. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.021.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., and de Lorenzo, V. (1999). Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J Bacteriol* 181, 6223–6229.

Fillat, M. F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 546, 41–52. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.029.

Ha, D.-G., Kuchma, S. L., and O'Toole, G. A. (2014). Plate-Based Assay for Swimming Motility in Pseudomonas aeruginosa. *Methods Mol Biol* 1149, 59–65. doi: 10.1007/978-1-4939-0473-0_7.

Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4, 172–177. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00184-3.

Hassan, H., and Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00059 [Accessed May 5, 2023].

Hassett, D. J., Sokol, P. A., Howell, M. L., Ma, J. F., Schweizer, H. T., Ochsner, U., et al. (1996). Ferric uptake regulator (Fur) mutants of Pseudomonas aeruginosa demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* 178, 3996–4003. doi: 10.1128/jb.178.14.3996-4003.1996.

Joshi, H., Dave, R., and Venugopalan, V. P. (2014). Pumping iron to keep fit: modulation of siderophore secretion helps efficient aromatic utilization in Pseudomonas putida KT2440. *Microbiology* 160, 1393–1400. doi: 10.1099/mic.0.079277-0.

Kang, D., and Kirienko, N. V. (2017). High-Throughput Genetic Screen Reveals that Early Attachment and Biofilm Formation Are Necessary for Full Pyoverdine Production by Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology* 8. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01707 [Accessed July 17, 2023].

Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1992). A general system to integratelacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of thePm promoter of theTOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molec. Gen. Genet.* 233, 293–301. doi: 10.1007/BF00587591.

Kim, J., and Park, W. (2014). Oxidative stress response in Pseudomonas putida. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 6933–6946. doi: 10.1007/s00253-014-5883-4.

Kraemer, S. M. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 66, 3–18. doi: 10.1007/s00027-003-0690-5.

Kuhn, L., Vincent, T., Hammann, P., and Zuber, H. (2023). Exploring Protein Interactome Data with IPinquiry: Statistical Analysis and Data Visualization by Spectral Counts. *Methods in Molecular Biology* 2426, 243–265.

Lee, J.-W., and Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20, 485–499. doi: 10.1007/s10534-006-9070-7.

Lee, S.-W., Parker, D. L., Geszvain, K., and Tebo, B. M. (2014). Effects of exogenous pyoverdines on Fe availability and their impacts on Mn(II) oxidation by Pseudomonas putida GB-1. *Front Microbiol* 5, 301. doi: 10.3389/fmicb.2014.00301.

Matilla, M. A., Ramos, J. L., Duque, E., de Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-González, M. I. (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of Pseudomonas putida. *Environmental Microbiology* 9, 1842–1850. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01286.x.

Mendonca, C. M., Yoshitake, S., Wei, H., Werner, A., Sasnow, S. S., Thannhauser, T. W., et al. (2020). Hierarchical routing in carbon metabolism favors iron-scavenging strategy in iron-deficient soil *Pseudomonas* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 32358–32369. doi: 10.1073/pnas.2016380117.

Molina, L., Segura, A., Duque, E., and Ramos, J.-L. (2020). The versatility of Pseudomonas putida in the rhizosphere environment. *Adv Appl Microbiol* 110, 149–180. doi: 10.1016/bs.aambs.2019.12.002.

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

Nikel, P. I., Chavarría, M., Danchin, A., and de Lorenzo, V. (2016). From dirt to industrial applications: Pseudomonas putida as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr Opin Chem Biol* 34, 20–29. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.05.011.

Nikel, P. I., and de Lorenzo, V. (2018). Pseudomonas putida as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to trans-metabolism. *Metab. Eng.* 50, 142–155. doi: 10.1016/j.ymben.2018.05.005.

Ochsner, U. A., and Vasil, M. L. (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in Pseudomonas aeruginosa: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4409–4414. doi: 10.1073/pnas.93.9.4409.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp*, 2437. doi: 10.3791/2437.

O'Toole, G. A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295–304. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x.

Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., et al. (2017). Ferric Uptake Regulator Fur Is Conditionally Essential in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* 199, e00472-17. doi: 10.1128/JB.00472-17.

Perraud, Q., Kuhn, L., Fritsch, S., Graulier, G., Gasser, V., Normant, V., et al. (2022). Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* . *Environmental Microbiology* 24, 878–893. doi: 10.1111/1462-2920.15372.

Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., and Di Bonaventura, G. (2008). Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia* : the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiology Letters* 287, 41–47. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01292.x.

Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A. M., and Martínez-Pastor, M. T. (2017). The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics* 9, 1483–1500. doi: 10.1039/c7mt00116a.

Raymond, K. N., and Carrano, C. J. (1979). Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* 12, 183–190. doi: 10.1021/ar50137a004.

Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M., and Dominguez-Vera, J. M. (2017). Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* 69, 382–388. doi: 10.1002/iub.1602.

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., and Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35, 652–680. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x.

Steingard, C. H., and Helmann, J. D. (2023). Meddling with Metal Sensors: Fur-Family Proteins as Signaling Hubs. *Journal of Bacteriology* 205, e00022-23. doi: 10.1128/jb.00022-23.

Timmis, K. N. (2002). Pseudomonas putida: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4, 779–781. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00365.x.

Turnbull, L., and Whitchurch, C. (2014). "Motility assays: twitching motility," in *Pseudomonas Methods and Protocols* (Humana Press), 73–87.

Valentin, J. D. P., Straub, H., Pietsch, F., Lemare, M., Ahrens, C. H., Schreiber, F., et al. (2022). Role of the flagellar hook in the structural development and antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *ISME J* 16, 1176–1186. doi: 10.1038/s41396-021-01157-9.

Vasil, M. L. (2007). How we learnt about iron acquisition in Pseudomonas aeruginosa: a series of very fortunate events. *Biometals* 20, 587–601. doi: 10.1007/s10534-006-9067-2.

Visca, P., and Imperi, F. (2018). An essential transcriptional regulator: the case of Pseudomonas aeruginosa Fur. *Future Microbiology* 13, 853–856. doi: 10.2217/fmb-2018-0081.

Wang, H., Hu, Y., Zhang, W., and Sun, L. (2009). Construction of an attenuated Pseudomonas fluorescens strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine* 27, 4047–4055. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.023.

Weber, K. A., Achenbach, L. A., and Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* 4, 752–764. doi: 10.1038/nrmicro1490.

Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 82/83, 969–974. doi: 10.1016/0378-4274(95)03532-X.

Zhang, S., He, Y., Sen, B., and Wang, G. (2020). Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Bioresource Technology* 307, 123234. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123234.

SUPPLEMENTARY DATA

Table 1: list of primers and plasmids used in this study

Primers		
Name	**Sequence**	**Reference**
pEXG2_F	agctcgaattcggtaccttaattaatttccacg	Mathieu, 2019
pEXG2_R2	gatcctctagagtcgacctgc	This work
PP_fur_am_F	caggtcgactctagaggatcggcctggctcggtggccg	This work
PP_fur_am_R	cgcacgtacattgagaccggctttgcgcaattcgc	This work
PP_fur_av_F	ccggtctcaatgtacgtgcgtaagaagaagtaacgg	This work
PP_fur_av_R	taaggtaccgaattcgagctctggcgaaggtggcgtcg	This work
Plasmids		
Name	**Caracteristics**	**Reference**
pEXG2	(oriTIncP-1), ColE1, sacB+, GmR	Rietsch *et al.*, 2005
pRK600	oriV(ColE1), mob(RK2), tra(RK2); CmR	Kessler *et al.* , 1992

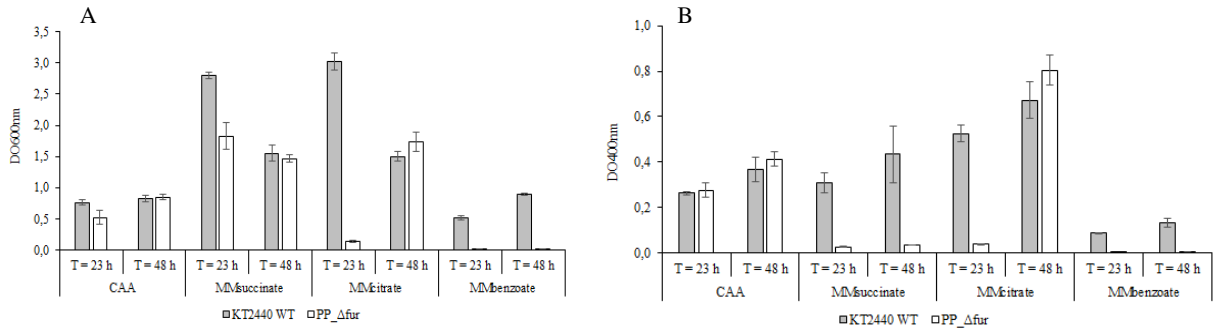


Figure 2S: Growth (**A**) and production of pyoverdine (**B**) after 23 and 48 h of incubation at 30°C under agitation (220 rpm) of the strains KT2440 WT (grey) and PP_Δ*fur* (white) in minimum medium CAA, MMsuccinate, MMcitrate or MMbenzoate. Error bars indicate the standard errors of the means of two biological replicates.

2.3.3 Résumé des résultats obtenus

Ces travaux ont permis d'étudier le rôle du régulateur Fur dans le métabolisme général de *Pseudomonas putida* KT2440. Nous avons ainsi développé une souche de *P. putida* appelée PP_Δ*fur* viable bien que ne possédant plus le gène codant pour le régulateur Fur. Nous avons pu montrer que la délétion de *fur* impacte à la fois la morphologie et la croissance de la souche qui est retardée. Comme attendu, la production de pyoverdine du mutant n'est plus dépendante de la présence de fer et augmente en fonction de la concentration en fer du milieu. Ces résultats sont confirmés par les analyses protéomiques montrant la surexpression de la voie pyoverdine de PP_Δ*fur* bien que *pvdS* ne soit pas surexprimé.

De plus, la source de carbone présente dans le milieu de culture impacte également la croissance ainsi que la production de pyoverdine de PP_Δ*fur*, suggérant que le fer n'est pas le seul facteur stimulant la production de pyoverdine et que la délétion de *fur* impacte le métabolisme central de la souche. En effet, la souche se trouve également impactée dans sa capacité à se déplacer en swimming, suggérant un impact de la délétion sur le flagelle. Cependant, la formation de biofilm, requérant un flagelle fonctionnel, n'est impacté que dans des conditions de carence en fer. Fur n'est donc pas essentiel à la formation de biofilm qui semble plutôt dépendante de la concentration en fer du milieu.

Enfin, PP_Δ*fur* semble produire une quantité plus importante de ROS que KT2440 WT, que la souche subisse un stress oxydatif ou non. Fur étant impliqué dans la défense contre le stress oxydatif, notamment via l'induction de l'expression de *sodB* par exemple, son absence entraine alors une accumulation plus importante de ROS au sein de la cellule. Les résultats des analyses protéomiques confirment également qu'en absence de fer, des protéines impliquées dans les mécanismes de défense, notamment *sodB* sont sous-exprimées chez PP_Δ*fur* comparée à KT2440 WT.

3 Délétion de la capacité à produire de la pyoverdine

Afin de vérifier que KT2440 n'est en effet capable de ne produire que la PVD comme sidérophore, et que le mécanisme principal de dissolution du fer des amiantes est dû à la production de PVD, nous avons construit une souche délétée du gène *pvdA* impliqué dans la biosynthèse de la PVD. Pour rappel, PvdA permet de synthétiser un acide aminé non protéinogène qui sera ensuite intégré par un NRPs dans la chaîne peptidique en cours de synthèse afin de former la PVD. Si la PVD est le seul système, alors le mutant devrait être incapable de dissoudre le fer des amiantes.

3.1 Construction du mutant PP_Δ*pvdA*

Une cassette de substitution contenant un gène *pvdA* délété a été construite par amplification par PCR des séquences en amont grâce aux amorces PP_*pvdA*_am_F et R et en aval du gène grâce aux amorces PP_*pvdA*_av_F et R (Voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.3**). Un clonage grâce au kit NEBuilder® permet d'assembler les séquences amplifiées et le plasmide pEXG2 afin d'obtenir le plasmide pEXG2::Δ*pvdA* (voir **Matériel et Méthodes, Figure 40C).** La souche *E. coli* TOP10 est ensuite utilisée pour réaliser la transformation bactérienne avec le plasmide permettant d'obtenir de nombreux clones *E. coli* TOP10 pEXG2::Δ*pvdA* résistants à la gentamycine. Un plasmide a été extrait d'un clone résistant afin de valider par séquençage la construction (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.7**). Le clone validé a été utilisé pour réaliser la conjugaison tri-parentale afin d'obtenir le mutant PP_Δ*pvdA* correspondant à la souche *P. putida* KT2440 dans lequel le gène *pvdA* est délété, (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 4.2.6**). Après les étapes de sélection et contre-sélection, des centaines de clones sont obtenus et 20 sont utilisés afin de vérifier la perte de la résistance à l'antibiotique. Sur ces clones, 5 sont positifs et sont sélectionnés pour vérifier l'insertion de la cassette grâce à une PCR sur colonie utilisant les amorces précédentes. Un seul clone délété de *pvdA* est alors envoyé à séquencer afin de valider la délétion de *pvdA* et donc le mutant PP_ *ΔpvdA*. La région chromosomique de *pvdA* chez la souche sauvage et la souche PP_ *ΔpvdA* est présentée en **Figure 35 A et B respectivement**.

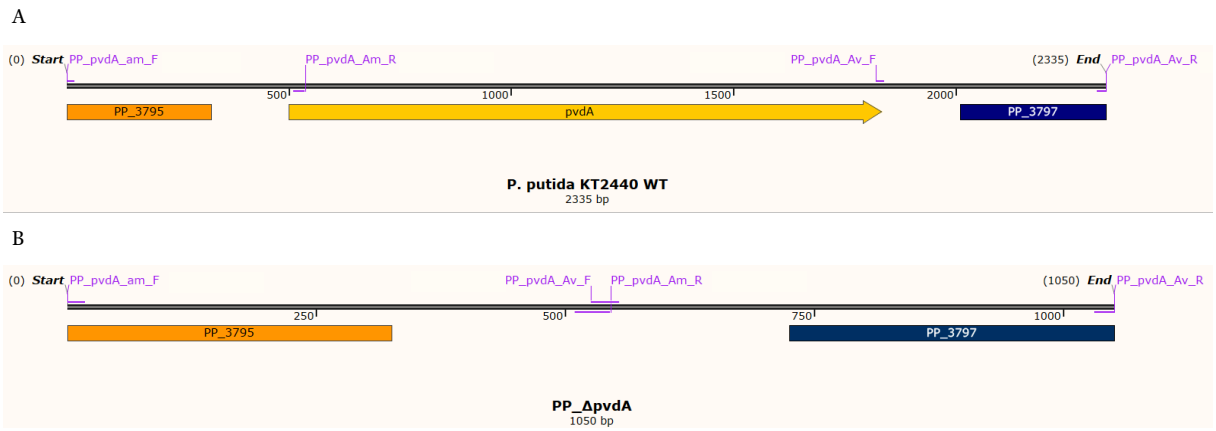


Figure 35 : Région chromosomique de *pvdA* chez la souche KT2440 WT, avant (A) et après (B) sa délétion. Le gène en amont de la séquence d'intérêt est illustré en orange et celui en aval est en bleu

3.2 Croissance et production de pyoverdine par le mutant PP_Δ*pvdA*

La croissance et la production de PVD de PP_Δ*pvdA*, ont été analysées en comparaison avec KT2440 WT en milieu riche LB et en milieu CAA carencé en fer en microplaque. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 36.**

En milieu riche LB, la production de PVD de KT2440 WT et de PP_Δ*fpvA* est totalement réprimée puisque les ratios sont de 1,30 et 1,32 respectivement, comme nous avions déjà pu l'observer et le définir dans le **paragraphe 1.2.** Afin de s'assurer que ce résultat soit bien dû à la délétion du gène *fpvA* et non à une répression par le fer, la souche est cultivée en milieu carencé CAA. KT2440 WT présente un ratio beaucoup plus élevé puisqu'il atteint 4,8, correspondant ainsi à une production optimale de PVD par la souche. La souche mutante quant à elle présente toujours un ratio de 1,4 même en absence de fer, confirmant son absence de production de PVD en toutes conditions.

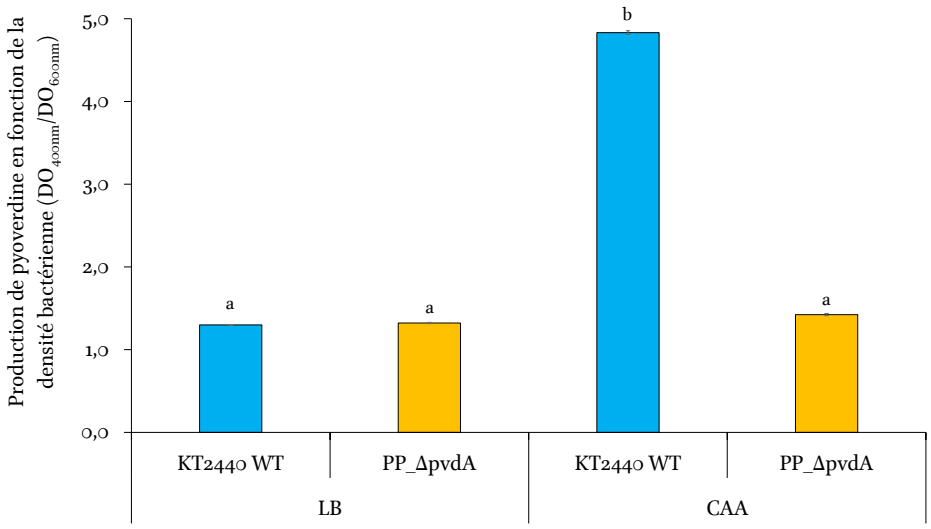


Figure 36 : Production de pyoverdine de KT2440 WT (bleu) et PP_Δ*pvdA* (jaune) en fonction de la densité cellulaire après 24 h en milieu LB ou CAA. n = 3

3.3 Production de sidérophore secondaire

Afin de vérifier que KT2440 WT n'est pas capable de produire un autre sidérophore, nous avons réalisé un test CAS en milieux CAA solides et liquides. Le test CAS est une méthode permettant de détecter si des molécules chélatrices de fer sont présentes dans une culture. Le milieu présente initialement une couleur bleue du au complexe colorant-fer et vire au rouge suite à la capture du fer par un chélateur plus puissant, dans notre cas un sidérophore. Les observations qualitatives des milieux solides sont présentées en **Figure 37A** et les résultats quantitatifs obtenus en milieu liquide en **Figure 37B.**

Sur les tests réalisés en milieu solide, KT2440 WT présente un halo orangé considérable correspondant à la chélation du fer du milieu par un sidérophore mais le plus gros halo est obtenu par PP_Δ*fur*. PP_Δ*fpvA* ne produit aucun halo rouge, signifiant qu'elle ne produit pas de sidérophore dans ce milieu. Ces résultats sont également confirmés grâce à un test CAS quantitatif en milieu CAA liquide puisque KT2440 WT et PP_Δ*fur* présentent les DO_{630nm} les plus importantes, correspondant à une production de sidérophore, tandis que la DO_{630nm} du milieu inoculé par PP_Δ*fpvA* est 6 fois moins importante. Ce test standardisé nous permet de nous assurer que PP_Δ*fpvA* ne produit aucun autre sidérophore et cela permet d'affirmer que KT2440 n'est capable de produire que de la PVD comme molécule chélatrice du fer.

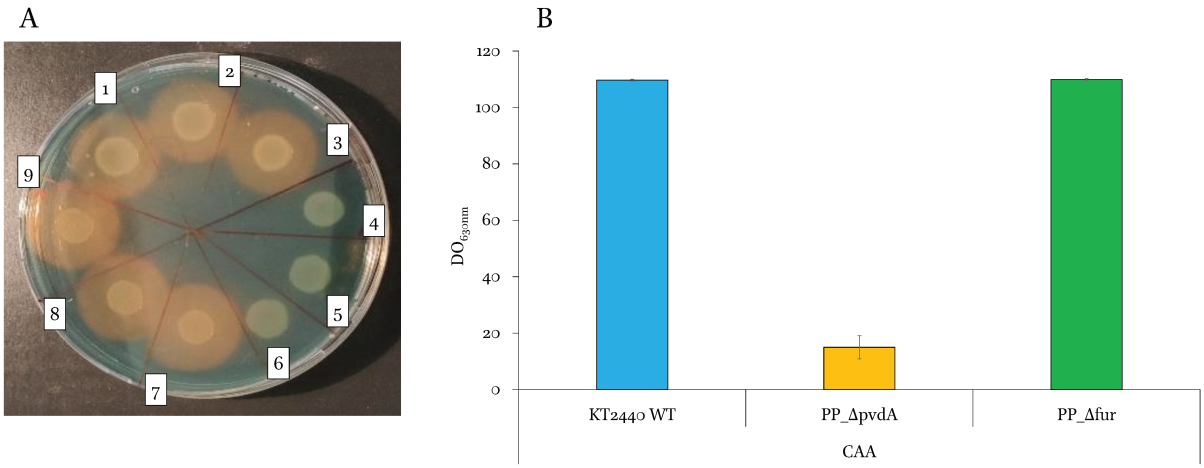


Figure 37 : Tests CAS réalisés en milieu CAA gélosé (A) et liquide (B). Sur le milieu gélosé, les colonies 1 à 3 sont des triplicats biologiques de KT2440 WT, les colonies 4 à 6 correspondent à PP_Δ*pvdA* et les colonies 7 à 9 à PP_Δ*fur*. n = 3

Ce chapitre nous permet de conclure que *P. putida* KT2440 ne produit que de la PVD comme molécule capable de chélater le fer extracellulaire afin de répondre à ses besoins. Afin de produire de la PVD malgré la présence de fer *via* l'induction de *pvdS*, l'utilisation d'un promoteur constitutif afin de remplacer la région de régulation par le fer est plus adaptée qu'un promoteur inductible. Cependant, le système PVD semble être naturellement optimisé puisqu'aucune stratégie ne permet de surproduire de la PVD en présence de fer par rapport à la souche sauvage. Bien que les protéines de la voie pyoverdine soit surexprimées chez PP_*Δfur*, *pvdS* n'est, de manière surprenante, pas surexprimé dans cette souche. Cela permettrait d'expliquer pourquoi PP_P_{BAD} et PP_Pc ne sont pas capables de surproduire de la pyoverdine par rapport à KT2440 WT. Cela suggère que chez *P. putida*, contrairement à *P. aeruginosa* chez qui l'induction de *pvdS* entraine une surproduction de pyoverdine (Lemare *et al.*, 2022), des gènes de la voie PVD sont directement régulés par Fur et que le niveau de *pvdS* influe peu. Il serait ainsi intéressant de faire des expériences de RT-qPCR sur KT2440 WT et PP_*Δfur* afin de regarder le niveau de transcrits de *pvdS* ainsi que d'autres gènes du système pyoverdine tels que *pvdI* et *pvdN* qui sont respectivement des gènes impliqués dans la biosynthèse et la maturation de la pyoverdine et qui étaient surexprimés chez PP_*Δfur* dans les analyses protéomiques.

Au-delà de son rôle dans le système pyoverdine, ce travail nous a également permis de conclure sur l'importance de *fur* dans le métabolisme central de KT2440, son importance dans la croissance,

la mobilité ainsi que la résistance au stress oxydatif. Bien qu'un milieu riche comme le milieu LB ait montré une instabilité dans le phénotype du mutant PP_*Δfur*, le mutant est stable en milieu minimum et ne semble pas présenter de problèmes concernant la résistance aux ROS.

Ainsi, la meilleure compréhension du système pyoverdine chez *Pseudomonas putida* KT2440 ainsi que l'optimisation de la production de PVD en présence de fer nous permettra alors d'améliorer l'extraction du fer des fibres amiantées dans une visée de bioremédiation. Cet axe de recherche sera traité dans le **Chapitre 3** qui s'intéresse, notamment, aux capacités d'altération des déchets amiantés à matrice minérale de PP_*Δfur* qui semble être le candidat idéal.

4 Matériel et Méthodes

4.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées et construites durant ce travail sont répertoriées dans le **Tableau 2.** Les souches de *Pseudomonas* ainsi que les bactéries lactiques sont exclusivement cultivées à 30 °C et les souches d'*Escherichia coli* à 37 °C. Toutes les souches sans exception sont cultivées sous agitation (220 rpm).

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées dans ce travail

Souches bactériennes		
Nom	**Génotype - Description**	**Référence**
HB101	*E. coli* possédant le plasmide pRK600 pour la conjugaison tri-parentale. Ch^{IR}	Kessler *et al.*, 1992
KT2440	*Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC 47054), souche de référence, phénotype sauvage	Nelson *et al.*, 2002
L. brevis	*Lactobacillus brevis* (ATCC 14869), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. casei b135	*Lactobacillus casei* b135 (ATCC 334), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. casei b69	*Lactobacillus casei* b69 (ATCC 393), souche de référence, phénotype sauvage	Olivier Cunrath, UMR 7242
L. fermentum	*Lactobacillus fermentum* (DSM 20052), souche de référence, phénotype sauvage	Olivier Cunrath, UMR 7242
L. lactis	*Lactobacillus lactis* (ATCC 11464), souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
L. lactis 99	*Lactobacillus lactis* 99, souche de référence, phénotype sauvage	
L. paracasei	*Lactobacillus paracasei* (ATCC SD5275), souche de référence, phénotype sauvage	Olivier Cunrath, UMR 7242
L. paracasei subsp paracasei	*Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (CIP 103918), souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
L. paraplantarum	*Lactobacillus paraplantarum* (CIP 104452), souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
L. parvulus	*Lactobacillus parvulus* (ATCC 19371), souche de référence, phénotype sauvage	Olivier Cunrath, UMR 7242
L. pentosus	*Lactobacillus pentosus* (NFB 363) souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
L. plantarum	*Lactobacillus plantarum* (ATCC 14617), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. plantarum subsp argentoratensis	*Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis* (DSM 16365), souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
L. rhamnosus	*Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. reuteri	*Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. sakei sakei 484	*Lactobacillus sakei sakei* 484 (ATCC 15521), souche de référence, phénotype sauvage	Aerial, Strasbourg
L. salivarius	*Lactobacillus salivarius*, souche de référence, phénotype sauvage	
PAO1	*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692), souche de référence, phénotype sauvage	Stover *et al.*, 2000
PaM1	PAO1 dont le promoteur de *pvdS* a été substitué par le promoteur $AraC/P_{BAD}$	Lemare *et al.*, 2022
P. pentosaceus	*Pediococcus pentosaceus* (ATCC 25744), souche de référence, phénotype sauvage	Françoise Bringel, UMR 7156
PP_P_{BAD}	KT2440 dont le promoteur de *pvdS* a été substitué par le promoteur AraC/PBAD	Mathieu, 2019
PP_Pc	KT2440 dont le promoteur de *pvdS* est sous le contrôle du promoteur Pc	Mathieu, 2019
PP_Δ*fur*	KT2440 dont le gène *fur* est délété	Ce travail
PP_Δ*pvdA*	KT2440 dont le gène *pvdA* est délété	Ce travail
Top 10	*E. coli* Top 10 utilisée pour les transformations bactériennes par choc thermique	Ce travail

4.2 Biologie moléculaire

Le mutant PP_P_{BAD}, a été construit avant mon arrivée au laboratoire par Sébastien Mathieu mais n'avait pas été caractérisé (Mathieu, 2019). Concernant le mutant PP_Pc, seul le plasmide a été

construit par overlap extension PCR et digestion/ligation avant mon arrivée par Sébastien Mathieu (Mathieu, 2019). J'ai ainsi utilisé le plasmide pEXG2::Pc existant afin de construire la souche mutante PP_Pc. Ces deux plasmides sont illustrés ci-dessous. Les autres mutants ont été construits entièrement durant ma thèse.

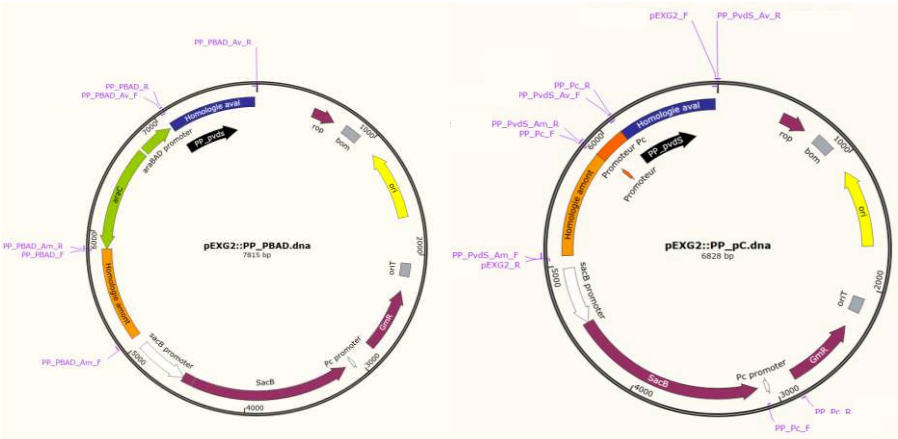


Figure 38 : Plasmides pEXG::PP_P_{BAD} (A) et pEXG::PP_Pc (B)

4.2.1 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir de 500 µL d'une pré-culture de nuit, à l'aide du kit « NucleoSpin® : Tissue » (Macherey and Nagel™) d'après le protocole du fournisseur. L'ADN est élué dans 2 fois 50 µL de tampon d'élution préchauffé à 70 °C puis stocké à -20 °C. Une mesure de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific™) permet de quantifier le matériel génétique.

Pour les PCR sur colonie, l'ADN matrice est extrait directement d'une colonie bactérienne par lyse. La colonie est remise en suspension dans 10 µL d'eau distillée puis chauffée 10 min à 90 °C. Après une centrifugation, l'ADN génomique est récupéré dans le surnageant bactérien puis stocké à -20 °C.

4.2.2 Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisé grâce au kit « NucleoSpin® Plasmid Purification » (Macherey and Nagel™) d'après le protocole du fournisseur. L'ADN est élué dans 2 fois 50 µL de

tampon d'élution préchauffé à 70 °C puis stocké à -20 °C. Une mesure de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific™) permet de quantifier le matériel génétique.

4.2.3 Amplification d'ADN par PCR

Les amplifications d'ADN par PCR sont réalisées d'après les protocoles et les programmes des fournisseurs des différentes polymérases utilisées. Elles sont réalisées dans un volume final de 50 µL dans un thermocycleur TRIO (Biometra®). Pour les amplifications classiques, l'enzyme utilisée est la Phusion® High Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific™) car elle permet de générer des amplicons avec une précision, une sensibilité et une spécificité de séquence très élevée. Le mélange réactionnel contient 200 µM de désoxyribonucléotides (dNTPs), 1 µM de chaque amorce (**Tableau 3)**, 1 unité d'enzyme, du tampon 1 X, 3 % de DMSO et de 5 à 100 ng d'ADN matrice. Les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 98 °C pendant 30 secondes (s), 30 cycles d'amplification composés chacun d'une dénaturation de 10 s à 98 °C, une hybridation d'une durée de 10 à 30 s en fonction de la taille de la séquence et dont la température est spécifique à chaque couple d'amorce et une élongation à 72 °C de 15 à 30 s / kb de produit à amplifier. Une élongation finale de 5 minutes est réalisée à 72 °C.

Les PCR sur colonies sont réalisées grâce à l'aide pré-mix Taq'Ozyme PurpleMix 2 (Ozyme™). La Taq polymérase de ce mix permet d'amplifier des fragments d'ADN riches en GC (comme c'est le cas pour les *Pseudomonas*) et pouvant faire jusqu'à 5 kb. Le mix réactionnel est identique au précédent mais présente l'avantage d'être prêt à l'emploi et standardisé, permettant ainsi de diminuer les erreurs de pipetage. De plus, il contient déjà le colorant servant à marquer l'ADN afin de le visualiser sur gel d'agarose. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95 °C durant 2 minutes (min), 30 cycles d'amplification (95 °C - 30 s ; X °C - 30 s ; 72 °C - 1 min / kb) et 5 min d'élongation à 72 °C. Pour amplifier les plasmides, l'enzyme CloneAmp™ (Takara™) est utilisée car elle présente l'avantage d'amplifier efficacement de grands fragments de façon très rapide. Elle se présente sous la forme d'un pré-mix auquel est ajouté la même quantité d'ADN matrice et d'amorces. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 98 °C durant 30 s, 30 cycles d'amplification (98 °C - 10 s ; X °C - 10 s ; 72 °C - 30 s / kb) et 5 min d'élongation à 72 °C.

ableau 3 : Amorces et plasmides

Oligonucléotides			
Nom	**Séquence**	**Tm (°C)**	**Référence**
pEXG2_F	agctcgaattcggtaccttaattaatttccacg	65,8	Mathieu, 2019
pEXG2_R2	gatcctctagagtcgacctgc	61,8	Ce travail
PP_verifHRpvdS_F	tcggcgacatcagcacgcaag	61,9	Mathieu, 2019
PP_verifHRpvdS_R	tggcaagatgattggctacatgc	60,6	Mathieu, 2019
pEXG2_seq_R	ccccgccagcctagccgg	67,4	Mathieu, 2019
pEXG2_seq_F	aataatagtgaacggcag	49,1	Mathieu, 2019
PP_fur_am_F	caggtcgactctagaggatcggcctggctcggtggccg	80,2	Ce travail
PP_fur_am_R	cgcacgtacattgagaccggctttgcgcaattcgc	74,2	Ce travail
PP_fur_av_F	ccggtctcaatgtacgtgcgtaagaagaagtaacgg	71,7	Ce travail
PP_fur_av_R	taaggtaccgaattcgagctctggcgaaggtggcgtcg	57,9	Ce travail
PP_fur_F	atggttgaaaatagcgaatt	49,1	Ce travail
PP_fur_R	ttacttcttcttacgcacg	52,4	Ce travail
PP_pvdA_Am_F	ggatccccgggctcgagctcgcacctatcgctgccgcc	82,4	Ce travail
PP_pvdA_Am_R	cgcgggtcagtctttgatggtttcctgctgtgagga	74	Ce travail
PP_pvdA_Av_F	ccatcaaagactgacccgcgcctgacccc	73,7	Ce travail
PP_pvdA_Av_R	taaggtaccgaattcgagctgcgtcgggctggtgccgtca	77,6	Ce travail

Plasmides		
Nom	**Résistance**	**Référence**
pEXG2	Gm^{15}, sacB+	Rietsch *et al.*, 2005
pRK600	Chl^{25}	Kessler *et al.* , 1992

Electrophorèse en gel d'agarose

Les produits d'amplification PCR et de clonage sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, préparé dans du tampon TAE. Ce tampon contient 40 mM de Tris, 20 mM d'acétate et 1 mM d'EDTA. L'ajout de SybrSafe™ 1 X permet de révéler l'ADN après migration (20-30 min à 135 V), sous exposition aux UV (365 nm ; E-box™ VX5 Vilber™). 5 µL de marqueur de poids moléculaire GeneRuler DNA Ladder 1kb (ThermoScientific™) sont utilisés.

Purification d'ADN

Les amplicons et les produits de clonage d'intérêt sont purifiés grâce au kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up » (Macherey and Nagel™). Le protocole « Gel extraction and purification » est utilisé pour les extractions de bande d'intérêt du gel selon les instructions du fournisseur. Une mesure de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop permet de quantifier les ADNs.

4.2.4 Clonage par méthode du NEBuilder

Les clonages sont réalisés grâce au kit « NEBuilder® Hifi DNA Assembly Cloning Kit » (New England BioLabs™) suivant le protocole du fournisseur. En amont, le plasmide pEXG2 est linéarisé par PCR en utilisant les amorces pEXG2_F et pEXG2_R2 puis traité durant 3 h à 37 °C par 2 µL de l'enzyme de restriction *DpnI* (ThermoScientific™). *DpnI* digère spécifiquement l'ADN méthylé pour éliminer l'ADN matrice après l'étape d'amplification. Les amorces utilisées pour ce clonage possèdent environ 20 pb d'homologie avec la séquence à amplifier et au moins 15 pb d'homologie avec le fragment adjacent à assembler. L'ajout de ces queues flanquantes sur les amorces permet d'avoir de courtes séquences homologues à l'extrémité du fragment à assembler, comme illustrer ci-dessous.

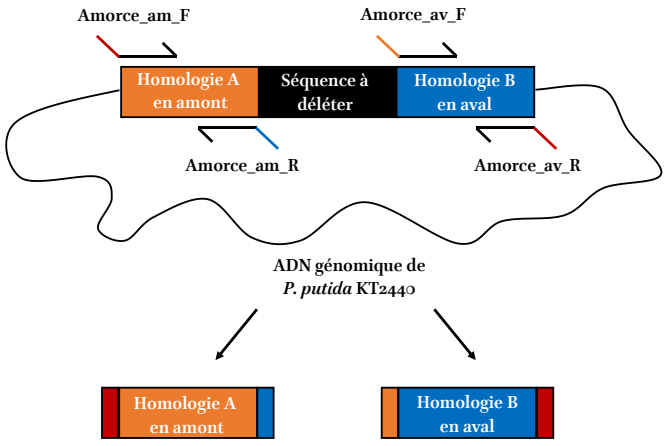


Figure 39 : Représentation schématique de l'amplification d'ADN par PCR à l'aide d'amorces possédant des queues flanquantes afin d'obtenir des séquences d'homologies aux extrémités des fragments à assembler

Cela permet ainsi la fusion des cassettes de substitution par homologie grâce au kit de clonage. Pour la réaction de clonage on utilise entre 50 et 100 ng du vecteur pEXG2 et une quantité deux fois inférieure de chaque fragment. La réaction de clonage a lieu durant 1 h à 50 °C. Cette méthode permet d'assembler efficacement de multiples fragments de grande taille en une seule réaction. Le kit contient une exonucléase qui va permettre de créer des extrémités 3' simple brin cohésives sur chaque fragment amplifié, une polymérase qui comble les trous une fois les fragments assemblés par homologie de séquence (grâce aux queues flanquantes), une ligase pour relier de façon covalente les fragments. Le plasmide formé pourra alors être intégré dans la bactérie par transformation. Toutes ces étapes sont illustrées ci-dessous.

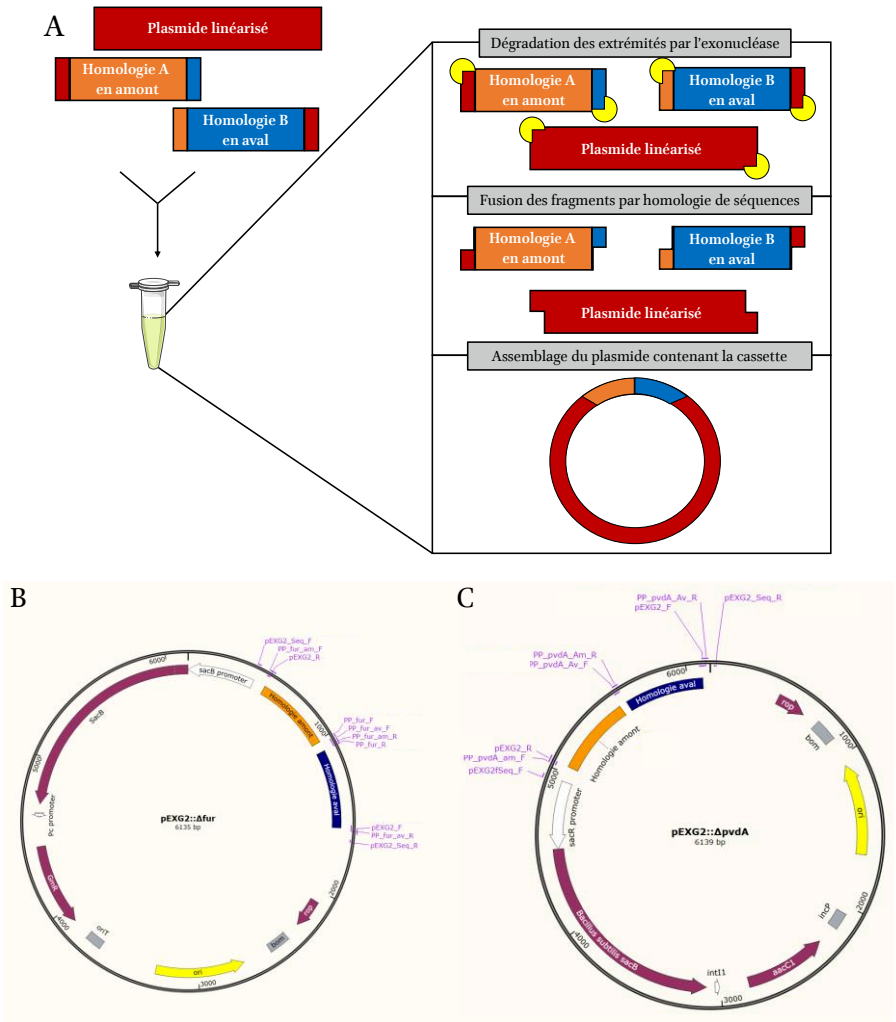


Figure 40 : Représentation schématique de la réaction de clonage par méthode du NEBuilder (A) et plasmides pEXG::*Δfur* (B) et pEXG::*ΔpvdA* (C) obtenus

4.2.5 Transformation bactérienne par choc thermique

Les cellules transformées sont des *E. coli* Top 10 rendues chimio-compétentes d'après le protocole suivant. Les cellules sont précultivées une nuit dans 5 mL de LB (Lysogeny Broth : composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 20 g Lysogeny Broth Lennox (AthenaES)) puis 500 µL de la préculture sont utilisés pour ensemencer 50 mL de LB avant d'être incubé à 37 °C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,5. La culture est séparée en 2 x 25 mL et la croissance est alors stoppée par immersion des tubes dans un bain de glace durant 30 min. Les culots cellulaires sont séparés du surnageant de culture grâce à 10 min de centrifugation à 2208 x g à 4 °C. Les culots sont resuspendus dans 25 mL d'un mélange 85 % $CaCl_2$ 100 mM / 15 % glycérol réfrigéré et incubés 45 min sur glace avant d'être centrifugés 10 min à 2208 x g et 4 °C. Les culots sont repris dans 2,5 mL du même mélange puis aliquotés et stockées à -80 °C. La transformation est réalisée avec un volume de 5 µL de la construction précédemment obtenue et 100 µL de cellules compétentes. Pour cela, le mélange ADN-cellules est homogénéisé délicatement avant d'être incubé 30 min sur glace. Ensuite, un choc thermique est réalisé durant 45 s à 42 °C, suivi d'une incubation sur glace de 3 min. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du milieu LB préchauffé à 37 °C et incubées durant 1 h à 37 °C. Après une centrifugation de 5 min à 2152 x g, le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µL de LB puis étalé sur milieu sélectif LB (composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 35 g LB Lennox agar (Euromedex™)) contenant 15 µg/mL de gentamycine (Gm) pour sélectionner les clones ayant acquis la résistance. L'insertion de la séquence est vérifiée par PCR sur les colonies résistantes et un clone est envoyé en séquençage pour vérifier l'absence d'erreur dans la séquence nucléotidique.

4.2.6 Conjugaison tri-parentale

L'insert du vecteur chez KT2440 est réalisé par conjugaison tri-parentale. La souche KT2440 est utilisée comme receveuse, une souche de *E. coli* HB101 portant le plasmide pRK 600 est utilisée comme souche helpeuse. La souche donneuse est la souche d'*E. coli* Top 10 précédemment transformée avec le plasmide d'intérêt. Les trois souches sont cultivées durant la nuit dans 5 mL de milieu LB puis 500 µL de chaque culture à DO_{600nm} identiques sont mélangés puis centrifugés 2 min

à 5510 x g. Le culot est repris dans 30 µL de LB et est ensuite déposé sous forme d'une goutte au centre d'une boîte de LB agar qui sera incubée 5 h à 30 °C.

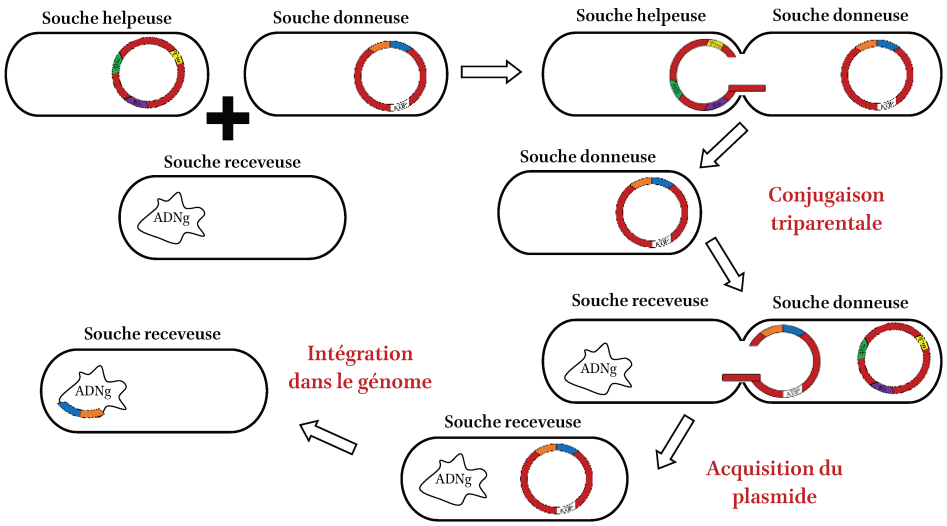


Figure 41 : Représentation schématique de la conjugaison tri-parentale. La souche donneuse est *E. coli* Top10 transformée avec le plasmide d'intérêt qui contient l'insert. La souche helpeuse est *E. coli* HB101 possède les éléments génétiques nécessaires à l'initiation du transfert de plasmide de la souche donneuse vers la souche receveuse grâce au plasmide pRK600. L'étape d'intégration dans le génome de la souche receveuse d'intérêt est détaillée en **Figure 42.**

Après ces 5 h de conjugaison, le spot obtenu est mis en suspension dans 1 mL de LB préalablement chauffé à 37 °C puis 100 µL sont étalés sur des boîtes de LB agar contenant les antibiotiques appropriés. Cette étape permet de sélectionner les clones ayant acquis le plasmide grâce au premier événement de crossing-over (**Etape 1 de la Figure 42**) et donc la résistance à l'antibiotique associé (Gm^{30} pour pEXG2) et d'éliminer les *E. coli* (grâce à l'ampicilline (Amp^{50})) (**Etape 2 de la Figure 42).** Une contre sélection est ensuite réalisée sur milieu LB-NaCl agar + sucrose 6 % (composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 10 g bacto-tryptones (Gibco) ; 5 g extrait de levures (Euromedex™) ; 15 g agar ; 150 mL sucrose 40 %) (**Etape 3 de la Figure 42)** afin de permettre le deuxième événement de crossing-over (**Etape 4 de la Figure 42)** et ainsi l'élimination du reste de la séquence du plasmide, la séquence d'intérêt ayant été intégrée dans le génome de la souche receveuse (**Etape 5 de la Figure 42).** La souche receveuse a donc perdu la sensibilité au sucrose conférée par le plasmide pEXG2. Les clones isolés et ayant donc également perdus la résistance à la Gm sont ensuite validés par un

isolement sur milieu LB agar + Gm[15] puis grâce à une PCR avec des amorces spécifiques avant d'être envoyés à séquencer. Les clones conformes sont conservés à - 80 °C dans un 1 mL d'un mélange milieu de culture + glycérol 20 %. Le principe de la conjugaison triparentale est schématisée ci-dessous.

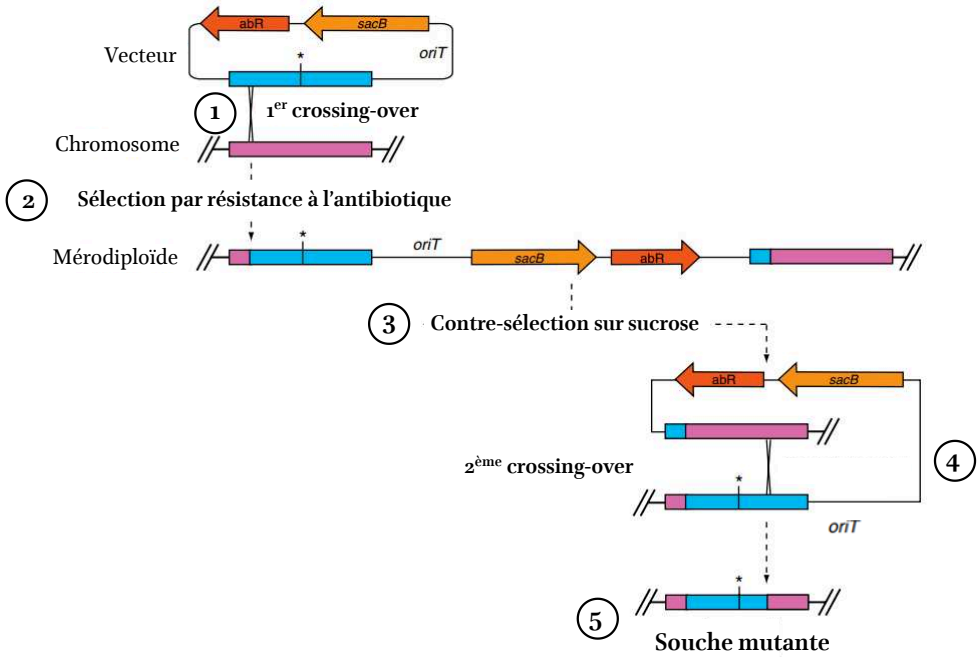


Figure 42 : Représentation schématique de l'étape d'intégration de la cassette de substitution dans le génome de la souche receveuse *via* une double recombinaison homologue grâce à deux événements de crossing-over. L'astérisque représente la mutation introduite dans l'insert. Les lignes pointillées indiquent les résultats de la recombinaison homologue qui sont sélectionnés à chacune des étapes clés (d'après (Hmelo *et al.*, 2015)

4.2.7 Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage de l'ADN est effectué par l'entreprise Eurofins™ par la méthode de Sanger grâce aux amorces présentées dans le **Tableau 3.**

4.3 Microbiologie

Toutes les cultures de *Pseudomonas* en tube FALCON™ 50 mL sont réalisées à 30 °C sous agitation (220 rpm) sauf indication contraire.

4.3.1 Suivi de la croissance et de la production de pyoverdine en microplaques

Ces expériences ont été réalisées uniquement avec les souches KT2440 WT et PP_P_{BAD} et ont pour but de déterminer les quantités de fer et d'arabinose entraînant une croissance et une production optimale de PVD. Les bactéries sont décongelées dans 5 mL de milieu LB dans un tube FALCON™ 50 mL. Après 24 h d'incubation, les pré-cultures sont centrifugées 10 min à 8603 x g puis les culots bactériens sont lavées 2 fois dans 10 mL de milieu CAA (composition pour 1 l d'eau purifiée (FranceEau) : 5 g Bacto™-Casaminoacides (BD) ; 1,46 g $K_2HPO_4.3H_2O$ (Carlo Erba) ; 0,25 g $MgSO_4.7H_2O$ (Merk)). Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL du même milieu et 100 µL sont prélevés et ajoutés dans 10 mL de CAA stérile puis les tubes FALCON™ 50 mL sont incubés durant 24 h à 30 °C à 220 rpm. Les culots sont ensuite lavés par 10 mL de CAA et l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm}) est ajustée à 0,1. Les cultures sous agitation sont réalisées en présence de différentes concentrations en $FeCl_3$ (0 à 100 µM ; FeCl3 (Euromedex™)) ou d'arabinose (0 à 2 % ; L-arabinose (BioBasic)) en microplaque 96 puits à fond rond où chaque puit est ensemencé à une DO_{600nm} de 0,01 dans un volume final de 200 µL de CAA. Un suivi de la croissance bactérienne (DO_{600nm}) ainsi que de la production de PVD (DO_{400nm}) est effectué automatiquement par le lecteur de microplaque (TECAN™) toutes les 30 min. L'avantage de cette technique est la possibilité de suivre, sur de nombreux échantillons, les différentes DO en simultané et en continu.

4.3.2 Suivi de la croissance et de la production de pyoverdine en tubes FALCON™

Ces expériences ont été réalisées avec toutes les souches et ont pour but d'observer la croissance et la production de PVD en milieu CAA et dans différentes conditions. Les bactéries sont décongelées dans 5 mL de milieu LB dans un tube FALCON™ 50 mL. Concernant la souche PP_Δ*fur,* après avoir investigué l'évolution de ses phénotypes en fonction des différentes quantités de fer utilisées dans les milieux de culture, nous avons décidé de la décongeler dans un milieu CAA supplémenté de 50 nM $FeCl_3$. Après ces 24 h d'incubation, les cultures sont centrifugées 10 min à 8603 x g puis les culots bactériens sont lavées 2 fois dans 10 mL de milieu CAA. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL du même milieu et 100 µL sont prélevés et ajoutés dans 10 mL de CAA stérile puis les cultures en tubes FALCON™ 50 mL sont incubées durant 24 h. Les culots sont

ensuite lavés avec 10 mL de CAA et l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm}) est ajustée à 0,5. Les souches sont alors cultivées avec du DO_{600nm} initiale de 0,05 en tube FALCON™ 50 mL dans 10 mL de milieu CAA (tube FALCON™) puis incubées durant 30 h. Le milieu de culture CAA est supplémenté de différentes quantités de $FeCl_3$ ou de 1 % d'arabinose (w/v). A intervalle régulier, des échantillons de culture sont prélevés et la densité optique est mesurée par lecture de l'absorbance à 600 nm au spectrophotomètre (Biophotometer Eppendorf). L'échantillon est ensuite centrifugé 10 min à 8603 x g et le surnageant est filtré puis 100 µL sont placés dans un puit d'une microplaque 96 puits à fond plat et la production de PVD est estimée par lecture de la DO_{400nm} au lecteur de microplaque (TECAN™).

4.3.3 Dénombrements en milieu solide

Les dénombrements sont réalisés à l'ensemencement des cultures (T 0) ou après 24 h (T 24) ou 48 h (T 48) d'incubation. Les dénombrements sont réalisés par méthode des gouttes. Les cultures sont diluées en cascade jusqu'à la densité cellulaire souhaitée et 6 gouttes de 20 µL de chaque dilution d'intérêt sont déposées sur des boites de milieu LB ou CAA (composition pour 1 l d'eau purifiée : milieu CAA liquide + 15 g agar (Euromedex™)), supplémenté ou non de différentes concentrations de $FeCl_3$. L'objectif est de diluer les cultures afin d'obtenir entre 1 et 100 colonies comptables par goutte. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C environ 24 h. Les colonies sont ensuite comptées manuellement au sein de chaque goutte puis moyennées pour l'ensemble de 6 gouttes. Le calcul du nombre d'unité formant colonie (UFC) est réalisé en prenant en compte les dilutions successives dont les colonies sont isolées les unes des autres et donc comptables.

4.3.4 Test CAS

Le test Chrome Azurol S (CAS) est une méthode colorimétrique permettant de détecter si des molécules chélatrices de fer sont présentes dans une culture (Schwyn and Neilands, 1987). Il s'agit de la méthode standard utilisée pour mettre en avant la présence de sidérophores. Pour cela, on met en contact un surnageant de culture bactérienne avec un mélange contenant un complexe stable Colorant(CAS)-Fer-Détergent. Le milieu présente initialement une couleur bleue due au complexe

précédent et vire au rouge suite à la capture du fer par un chélateur plus puissant. La présence du détergent permet de stabiliser le complexe. Si un sidérophore se trouve dans notre surnageant de culture, il rentre alors en compétition avec le colorant présent dans le réactif. Les sidérophores possédant une affinité très importante pour le fer, alors si la cellule en produit, la solution réactive deviendra rouge en présence du surnageant bactérien puisque le fer sera libéré du colorant. Le test peut être réalisé en milieu solide ou liquide. Les différents réactifs sont préparés en amont. Le détergent est composé de 10 mM de Bromure d'hexadécyltriméthylammonium (HDTMA) 10 mM dans de l'eau purifiée (FranceEau). La solution de Fer(III) est à 1 mM, dans de l'HCl 0,01 N et le colorant est composé de CAS aqueux concentrée à 2 mM, diluée avec de l'eau bidistillée. Enfin la solution de pipérazine anhydre est préparée à partir de 4,30 g diluée dans 34,75 mL d'eau purifiée (FranceEau).

Les cultures bactériennes sont décongelées et précultivées en tube FALCON™ 50 mL dans des conditions identiques à celles des paragraphes précédents. Après 24 h de culture, les DO_{600nm} des précultures sont ajustées entre elles puis 1 mL de chaque préculture est centrifugé durant 10 min à 8603 x g.

Pour le test en milieu liquide, 1,5 mL de la solution de Fer(III) et 7,5 mL de CAS sont mélangés puis ajoutés goutte à goutte dans 6 mL du détergent. En parallèle, 6,5 mL d'HCl 37 % sont additionnés à la solution de pipérazine et ce mélange est ajouté au précédent avant d'y ajouter 100 mL d'eau purifiée (FranceEau). La solution Fe-CAS-HDTMA est stockée en milieu sec à l'abri de la lumière et à température ambiante. Afin d'accélérer la réaction, on ajoute 4 mM d'acide 5-sulfosalycilique à la solution CAS (soit 4,4 mg pour 5 mL de CAS). Pour la réaction, on mélange, dans une microplaque 96 puits à fond rond, 100 µL de réactif CAS-Fe-HDTMA avec 100 µL de surnageant de culture puis on incube 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La production de sidérophore est estimée *via* la DO_{630nm} au lecteur de microplaque (TECAN™).

Concernant le test en milieu solide, il faut dans un premier temps préparer les boîtes de milieu gélosé contenant les différents réactifs. Pour la préparation des réactifs, il faut dissoudre 605 mg de CAS dans 500 mL d'eau purifiée (FranceEau) puis ajouter 100 mL de la solution de Fer(III) avant d'incorporer 400 mL d'eau purifiée (FranceEau) contenant 729 mg de HDTMA. La solution Fe-CAS-HDTMA est autoclavée puis refroidie à environ 55°C. En parallèle, 6 g de NaOH sont dissous dans

750 mL d'eau purifiée (FranceEau) puis 30,24 g d'acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique (PIPES) en solution y sont ajoutés. Afin, on y ajoute 100 mL de milieu de culture (CAA (BD) par exemple) et 15 g d'agar (Euromedex™) avant d'autoclaver le tout. Lorsque le milieu est refroidi, on ajoute 100 mL de la solution Fe-CAS-HDTMA à la solution de gélose PIPES puis on coule le tout dans des boîtes de Pétri stérile, alors conservée à 4°C à l'abris de la lumière. Pour la détection des sidérophores en milieu solide, on dépose sur la boîte 10 µl de surnageant de culture sous la forme d'une goutte et on incube 24 h à 30 °C avant d'examiner les changements de couleur (bleu à orange) autour des spots.

Chapitre 3

Altération des déchets amiantés à matrice minérale : le flocage

1 Caractérisations préliminaires

1.1 Caractérisation des déchets de flocage

Les déchets de flocage utilisés durant l'ensemble de ma thèse ont été caractérisés en amont par la société SOMEZ et des observations réalisées par MET sont présentées en **Figure 43** (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 6.9**). Les déchets sont constitués de fibres amiantées de type chrysotile (CHR) uniquement. Les fibres sont enchevêtrées dans une matrice de gypse (Gy) formant des structures géométriques régulières, mesurant de quelques centaines de nm à plusieurs mm. La minéralisation du déchet a été réalisée par le Dr. Sébastien David sur 5 échantillons durant son doctorat. Le fer et le magnésium qu'ils contiennent ont été dosés par méthode colorimétrique. Ce déchet (CHR-Gy) contient ainsi, en moyenne, 4,6 mg de fer et 74 mg de magnésium par g de flocage. Ainsi chaque échantillon de 0,20 g de CHR-Gy utilisé pour les expériences d'altération contient environ 920 µg de fer et 14800 µg de magnésium.

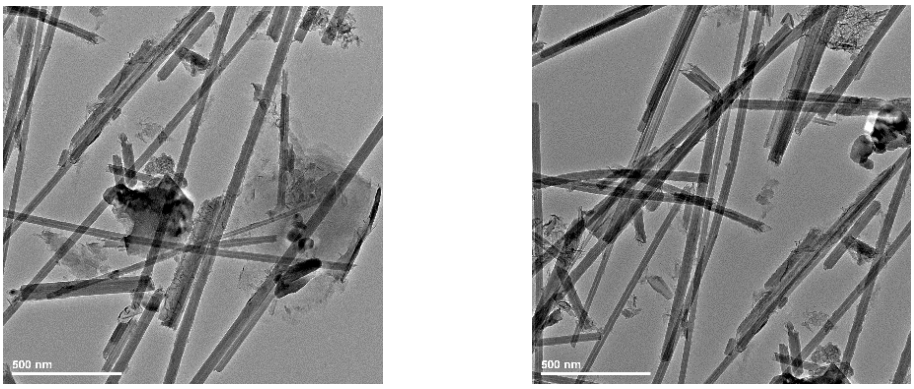


Figure 43 : Déchets de flocage (CHR-Gy) non altérés, lavés avec du milieu CAA-Mg observés par MET. Cet échantillon a été utilisé pour réaliser une analyse par MET-EDS de la composition du déchet avant altération.

L'analyse par MET-EDS des déchets de CHR-Gy permet d'obtenir les pourcentages massiques des composants principaux (voir **Matériel et Méthodes**). Les déchets sont ainsi composés de 39,8 % de silice, constituant principal des fibres, 54 % de magnésium, élément présent en grande quantité dans la couche de brucite des fibres, 3,9 % de fer majoritairement contenu dans les fibres et 2,9 % de calcium, composant majoritaire du gypse.

1.2 Etude de la dépendance au magnésium des différentes souches de *Pseudomonas*

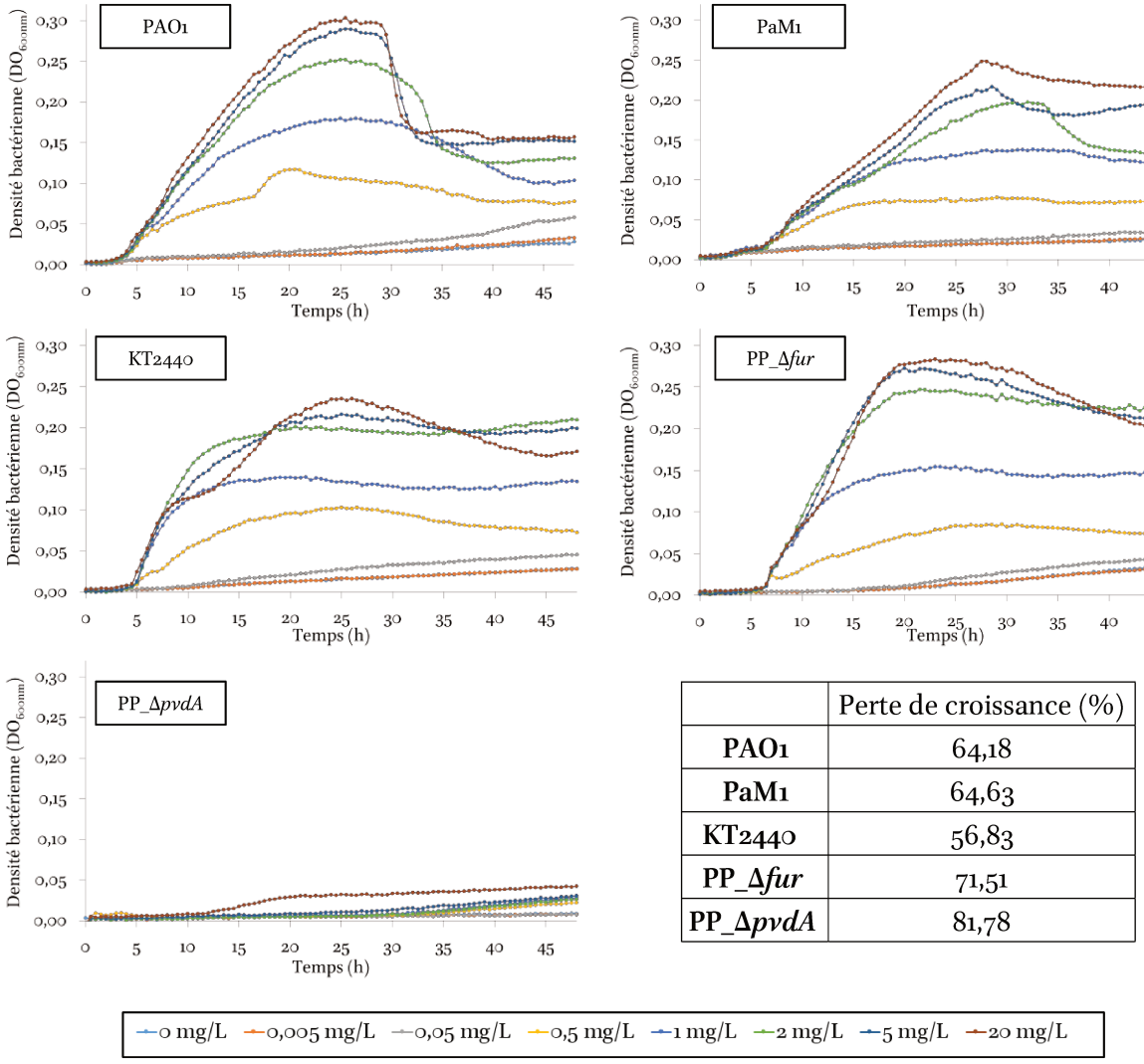
Le milieu CAA, milieu minimum utilisé dans notre étude pour carencer en fer les micro-organismes, contient 250 mg/L de magnésium, assurant une croissance satisfaisante. Cependant aucune donnée concernant la quantité minimale requise pour obtenir une croissance bactérienne n'est connue. Afin de sélectionner, parmi notre collection, la souche dont la croissance est la plus dépendante en magnésium, nous avons réalisé des cinétiques de croissance en milieu CAA supplémenté de différentes concentrations en $MgSo_4$ (0 à 20 $mg.L^{-1}$) qui sont présentées en **Figure 44.**

Les résultats montrent que l'ajout de magnésium ne stimule la croissance qu'à partir d'une concentration de 0,5 $mg.L^{-1}$. Une baisse de croissance, plus ou moins marquée en fonction des souches, est observée entre 2 et 1 $mg.L^{-1}$ de magnésium, notamment pour PP_Δ*fur* dont la densité bactérienne est réduite de moitié lorsque le milieu ne contient que 1 $mg.L^{-1}$ de magnésium. Le mutant PP_Δ*pvdA,* incapable de produire de la PVD, présente une croissance très faible à la plus forte concentration en magnésium testée. La souche semble donc être la plus dépendante en magnésium. De plus, lorsque l'on compare sa croissance avec ou sans magnésium, à la croissance de toutes les autres souches avec moins de 0,5 $mg.L^{-1}$, on observe que PP_Δ*pvdA* présente une densité cellulaire deux fois inférieure à celle des autres souches (DO_{600nm} = 0,005 à 24 h contre environ 0,01 pour les autres souches). Cela peut s'expliquer par le fait que le milieu CAA présente toujours des traces de fer (de l'ordre de 20 nM) qui peut être utilisé par les autres souches grâce à leur sidérophore afin de permettre une meilleure croissance. A l'inverse, PP_Δ*pvdA* ne produisant aucun sidérophore n'est alors pas capable de complexer ces traces de fer pouvant impacter doublement le manque de magnésium. Il est d'ailleurs connu que *P. aeruginosa* PAO1 incapable de produire ses systèmes d'import du fer est incapable de se développer en milieu minimum (Diggle *et al.*, 2007).

Afin de comparer les souches, le pourcentage de perte de croissance entre 20 et 0,5 mg/L de magnésium a été calculé après 24 h de culture et sont également présentés en **Figure 45.** Ces calculs confirment que PP_Δ*pvdA* est la souche la plus dépendante en magnésium avec une perte de 82 %. Cependant, de par sa faible croissance même en milieu riche en magnésium ainsi que son incapacité à produire des sidérophores pour chélater le fer du milieu et subvenir à ses besoins, la souche ne

semble pas être la plus adaptée au développement d'un procédé de bioremédiation des déchets de CHR-Gy. La souche ayant une croissance significative et étant la plus impactée par la diminution de la concentration en magnésium est PP_Δ*fur* avec un pourcentage de perte de croissance de 72 %.

Les souches les moins dépendantes en magnésium sont les souches sauvages, avec *P. putida* KT2440 suivie de *P. aeruginosa* PAO1 (57 et 64 % respectivement). Ces résultats montrent qu'en plus de produire de la PVD de façon constitutive, PP_Δ*fur* pourrait être une souche d'intérêt pour extraire le magnésium des déchets de CHR-Gy.



	Perte de croissance (%)
PAO1	64,18
PaM1	64,63
KT2440	56,83
PP_Δ*fur*	71,51
PP_Δ*pvdA*	81,78

Figure 44 : Cinétique et pourcentage de perte de croissance des différentes espèces de *Pseudomonas*, en milieu CAA-Mg, additionné de différentes concentrations de $MgSo_4$, allant de 0 à 20 mg/L. Le tableau représente le pourcentage de perte de croissance entre 20 et 0,5 mg/L après 24 h de culture. n = 3

2 Altération des déchets de flocage par *Pseudomonas putida*

Dans cette partie, nous allons comparer l'altération de déchets de flocage (CHR-Gy) en présence de *P. putida* KT2440 WT et des mutants PP_Δ*fur* et *PP_*Δ*pvdA* en milieu CAA exempt de magnésium (CAA-Mg). Compte tenu de la dépendance en magnésium évaluée précédemment pour ces souches, la dissolution du magnésium des déchets représentera l'unique source de magnésium pour les bactéries. La souche PP Δ*pvdA* a présenté une très faible croissance en milieu CAA additionné de 20 mg.L^{-1}de $MgSO_4$ comparé aux deux autres souches. Nous déterminerons ainsi la souche la plus prometteuse dans l'altération des déchets de flocage.

2.1 Suivi de l'altération des déchets de flocage

Dans un premier temps, les déchets de flocage ont été altérés en présence de KT2440 WT et de PP_Δ*fur*. Pour cela, 0,2 g de déchets ont été mis en contact avec l'une ou l'autre des souches en milieu CAA carencé en magnésium (CAA-Mg) durant 2 cycles de 24 h. A l'issu de chaque cycle, le milieu de culture est renouvelé afin de maintenir en phase de croissance les micro-organismes. L'extraction du fer et du magnésium est suivi grâce à des dosages réalisés sur le surnageant de culture ainsi que sur le culot bactérien. Cette première expérience a pour but de vérifier que notre souche PP_Δ*fur* est capable de produire constitutivement de la PVD en présence du fer libéré des amiantes et d'évaluer si cette production permet une altération plus efficace des déchets amiantés.

Les résultats concernant la croissance des souches sont présentés en **Figure 45.** La condition en milieu CAA nous permet d'avoir un témoin de la croissance des souches en situation de carence martiale. Le milieu CAA-Mg est un témoin reflétant la croissance minimale des souches. Afin d'induire une altération optimale du déchet, l'altération est donc conduite dans le milieu CAA-Mg, carencé en fer et en magnésium. Pour les deux milieux sans CHR-Gy, la souche PP_Δ*fur* présente une croissance inférieure à KT2440 WT mais qui tend à s'équilibrer lors du second cycle, notamment en milieu CAA-Mg (3.10^7 UFC.mL^{-1} pour KT2440 WT contre 6.10^7 UFC.mL^{-1} pour PP_Δ*fur*). Bien que présentant la dépendance au magnésium la plus élevée, PP_Δ*fur* croît de façon équivalent en milieu CAA et CAA-Mg lors du 2ème cycle (7.10^7 UFC.mL^{-1} en milieu CAA). L'ajout de CHR-Gy stimule la croissance des deux souches d'au moins 1 log dès le 1er cycle (4.10^8 UFC.mL^{-1} et 1.10^8 UFC.mL^{-1} pour

KT2440 WT et PP_Δ*fur* respectivement). Quelques phénotypes *grosse colonie* ont été observés lors des dénombrements de PP_Δ*fur* en milieu solide mais leur proportion reste inférieure au phénotype *petite colonie* et n'influe pas sur la production de PVD globale. Ces résultats suggèrent que la présence de CHR-Gy stimule la croissance, vraisemblablement grâce à la solubilisation de fer et de magnésium des déchets, éléments rendus biodisponibles.

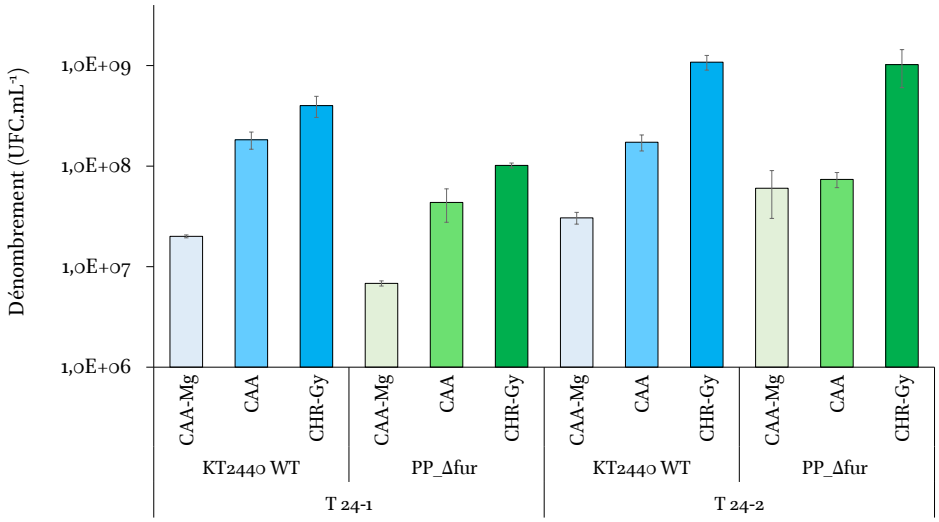


Figure 45 : Croissance de KT2440 WT (bleu) **et PP_Δ*fur*** (vert) durant 2 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg, CAA ou CAA-Mg + CHR-Gy. n =3

La production de PVD de KT2440 WT, présentée en **Figure 46** en milieu CAA-Mg est proche de la limite de détection (DO_{400nm} = 0,02 à T 24-2), vraisemblablement à cause de la faible croissance observée en **Figure 45.** Cependant, PP_Δ*fur* présentant une croissance inférieure ou égale, produit des quantités de PVD plus importante (DO_{400nm} = 0,17 à T 24-2). Cela semble signifier que PP_Δ*fur* produit une quantité plus importante de PVD par cellule. Dans le témoin CAA, la souche KT2440 WT produit une quantité plus importante de PVD lors des deux cycles, notamment dû à sa croissance plus importante (**Figure 45**). En effet, lorsque l'on rapporte la production de PVD au nombre de cellules, le ratio obtenu, représentant la production relative, est plus élevé pour PP_Δ*fur* comparée à KT2440 WT, qu'importe le cycle ou le milieu (données non présentées). De façon attendue en présence de CHR-Gy, la production de PVD par KT2440 WT est réprimée par le fer extrait des amiantes. Pour PP_Δ*fur*, la production de PVD est stimulée par l'ajout de CHR-Gy dans le milieu,

confirmant ainsi que notre souche est capable de produire de la PVD de façon constitutive en présence du fer des amiantes. Bien que le ratio obtenu en présence de CHR-Gy soit supérieur à celui obtenu en CAA lors du 1er cycle, ce dernier devient inférieur lors du 2ème puisque la croissance y est d'autant plus stimulée. Cependant cela n'a pas d'impact car notre procédé est basé sur l'extraction du fer, dépendant majoritairement de la quantité de PVD produite.

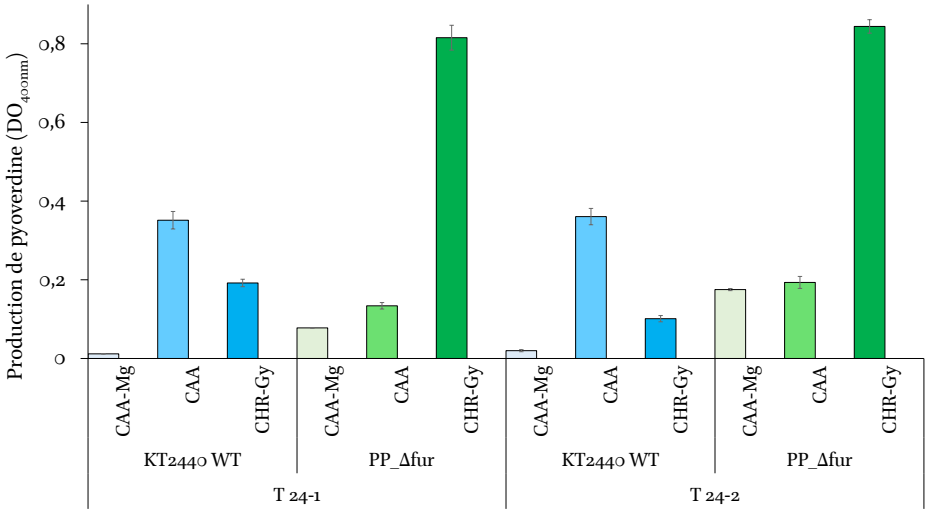
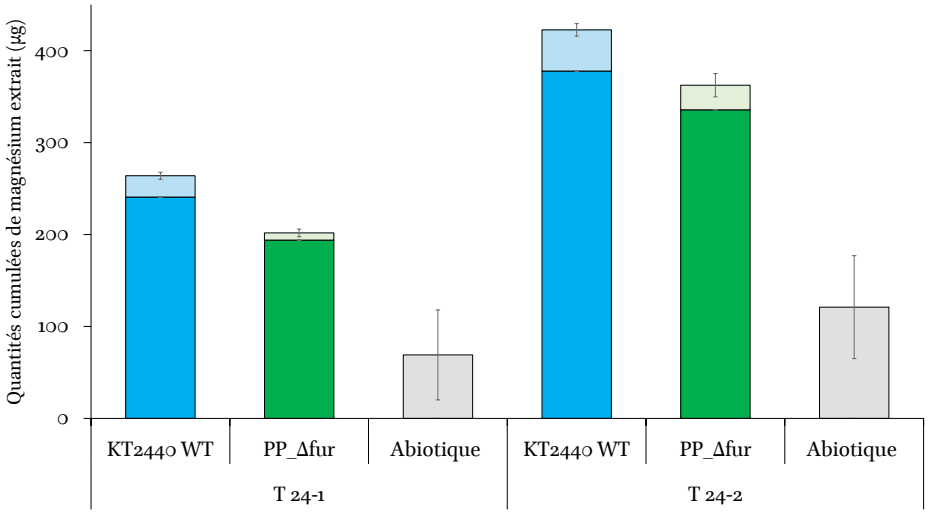


Figure 46 : Production de pyoverdine de KT2440 WT (bleu) **et PP_Δ*fur*** (vert) durant 2 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg, CAA ou CAA-Mg + CHR-Gy. n = 3

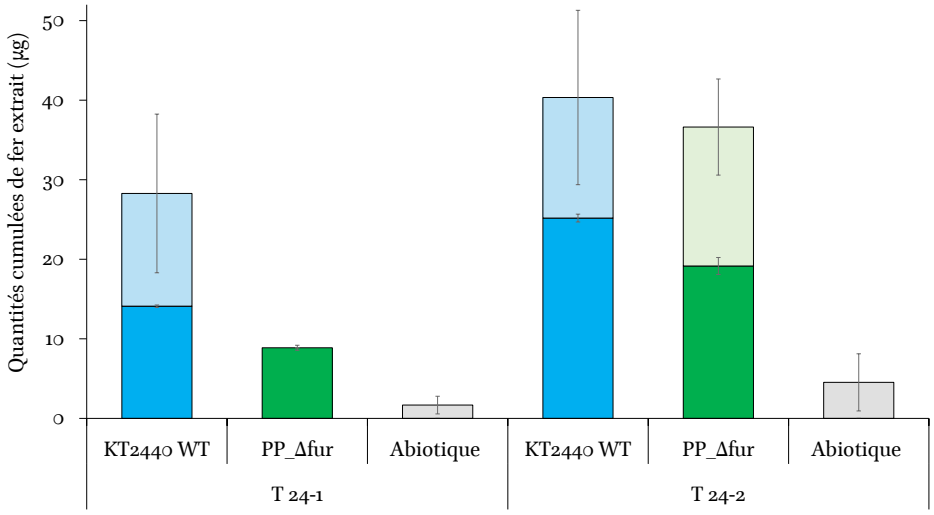
Afin de vérifier si cette production importante et constitutive de PVD par le mutant en présence de CHR-Gy permet d'altérer efficacement les déchets de flocage, nous avons suivi la dissolution du fer et du magnésium dont les résultats sont présentés en **Figures 47 et 48.**

La majorité du magnésium dissout est retrouvé dans les culots bactériens des deux souches tandis que le surnageant en présente une quantité nettement plus faible. KT2440 WT et PP_Δ*fur* entrainent une dissolution du magnésium plus importante lors du 1er cycle (respectivement 264 et 202 µg) que lors du second (159 et 161 µg). Le milieu CAA-Mg contribue également à la dissolution du magnésium (121 µg au total) ce qui n'est pas négligeable car cela représente environ un quart de la dissolution entrainée par KT 2440 WT et un tiers de celle de PP_Δ*fur* (423 µg et 362 µg respectivement au total). Au total, le milieu a dissous 0,78 % du magnésium, KT2440 WT 2,72 % et PP_Δ*fur* 2,33 %.



Figures 47 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par **KT2440** WT (bleu), PP_Δ*fur* (vert) et par le témoin abiotique CAA-Mg (gris) durant 2 cycles de 24 h. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

Concernant la dissolution du fer, la majorité du métal est retrouvé dans les surnageants de culture des souches, en quantité légèrement plus importante lors du 1er cycle pour KT2440 WT et lors du second pour PP_Δ*fur*. En effet, lors du 1er cycle de contact de PP_Δ*fur,* la présence de fer n'avait pas été détectée dans le surnageant de culture, signifiant que la totalité du fer aurait été internalisée par la souche, ce qui n'est plus le cas lors du cycle 2 (17,5 µg dans le surnageant du cycle 2 et environ 9 µg dans le culot de chaque cycle). A l'inverse, lors du second cycle, très peu de fer est retrouvé dans le surnageant de culture de KT2440 WT (0,99 µg). De plus, la quantité retrouvée dans le culot bactérien est légèrement inférieure à celle du 1er cycle (11,1 µg et 14,1 µg respectivement). Ainsi, cette absence de fer dans le surnageant du 2ème cycle ne signifie pas que la souche aurait internalisé tout le fer extrait mais plutôt que la dissolution du fer est largement inférieure lors du 2ème cycle pour la souche sauvage. L'extraction tendrait peut-être à diminuer au fil des cycles pour KT2440 WT tandis qu'elle augmenterait pour PP_Δ*fur*. Tout comme pour le magnésium, le milieu contribue à la dissolution du fer mais dans des proportions plus négligeables (4,5 µg au total). La souche sauvage a permis d'extraire 40,3 µg de fer soit 4,17 % et le mutant 36,6 µg soit 3,79 %.



Figures 48 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par KT2440 WT (bleu), **PP_*Δfur*** (vert) **et le témoin abiotique CAA-Mg** (gris) durant 2 cycles de 24 h. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

Ces résultats préliminaires nous permettent d'affirmer que la souche PP_*Δfur* est capable de produire de la PVD en présence de déchets amiantés. Les résultats obtenus pour les deux souches, concernant la solubilisation du fer ou du magnésium ne sont pas statistiquement différents. Cela signifie que la production constitutive de PVD par le mutant n'a pas permis une dissolution plus importante du déchet de flocage. Cependant, nous n'avons réalisé que deux cycles d'altération et les quantités de fer extraites pourraient augmenter au fil des cycles comme c'est la tendance entre le 1er et le 2ème cycle. Il serait ainsi intéressant de réaliser également 5 cycles de contact afin de permettre à ce mutant, dont la croissance semblait plus lente, d'extraire des quantités plus importantes de fer et de magnésium.

2.2 Comparaison de l'altération en milieu minimum citrate

Lors de la caractérisation du mutant PP_*Δfur* (voir **Partie II Chapitre 2**), nous avions remarqué que sa production de PVD était stimulée lorsque la souche était cultivée en milieu minimum citrate (MMcitrate) même si sa croissance était retardée. Nous avons ainsi utilisé le citrate comme source de carbone pour la souche de la souche PP_*Δfur* afin de le comparer avec le milieu CAA utilisé

couramment au laboratoire. La présence de déchets de flocage ayant précédemment permis de stimuler la production de PVD de PP_*Δfu* de façon plus importante qu'en CAA, ce témoin positif n'a pas été réalisé.

Les résultats concernant la croissance de PP_*Δfur* sont présentés en **Figure 49.** En raison d'un important retard de croissance en MM citrate-Mg, un premier cycle de 48 h (T 48-1) puis un second de 24 h (T 24-2) ont été réalisés dans ce milieu au lieu des 3 cycles de 24 h réalisés en CAA-Mg. La présence de CHR-Gy stimule la croissance bactérienne lors de tous les cycles d'au moins 1 log. Néanmoins, même après plusieurs cycles en présence de CHR-Gy, la croissance de PP_*Δfur* reste inférieure en milieu MM citrate-Mg ($9{,}4.10^7$ UFC.mL^{-1} à T 24-2) par rapport au CAA-Mg ($1{,}2.10^9$ UFC.mL^{-1} à T 24-3). Comme précédemment, la densité bactérienne semble augmenter au fil des cycles, signifiant que du fer et du magnésium sont continuellement rendus biodisponibles pour subvenir aux besoins nutritionnels de la bactérie.

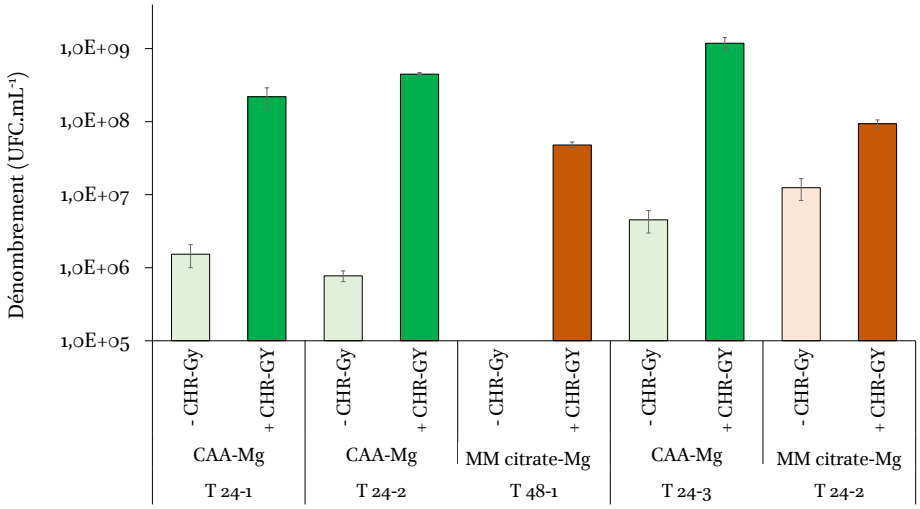


Figure 49 : Croissance de PP_Δ*fur* en présence (foncé) **ou absence** (clair) **de CHR-GY** après des cycles de 24 h en CAA-Mg (vert) ou de 48 h suivi de 24 h pour en MM citrate-Mg (marron). n = 3

La production de PVD est présentée en **Figure 50.** En raison d'une croissance de la souche très faible en MM citrate-Mg, aucune production de PVD n'a pu être détectée contrairement à la croissance en milieu CAA-Mg qui permet d'atteindre une faible DO_{400nm} (0,04 lors des deux premiers cycles puis 0,08 lors du dernier). L'ajout de CHR-Gy dans les milieux entrainent une nouvelle fois une production importante de PVD, favorable à l'altération des déchets amiantés. Lorsque l'on

rapporte la production de PVD à la densité bactérienne (données non présentées), on remarque que la production a tendance à baisser au fil des cycles, qu'importe le milieu tandis que la souche semble continuer à croître d'un cycle à l'autre, conduisant à une diminution de cette production relative. En milieu CAA-Mg, PP_*Δfur* présente des ratios de production relative de 25, 18 et 4 pour les cycles T 24-1, 2 et 3 respectivement tandis qu'en MM citrate-Mg les ratios sont de 73 puis 11, confirmant une production plus importante de PVD en MM citrate-Mg par rapport au CAA-Mg lorsque cette dernière est rapportée à la croissance bactérienne.

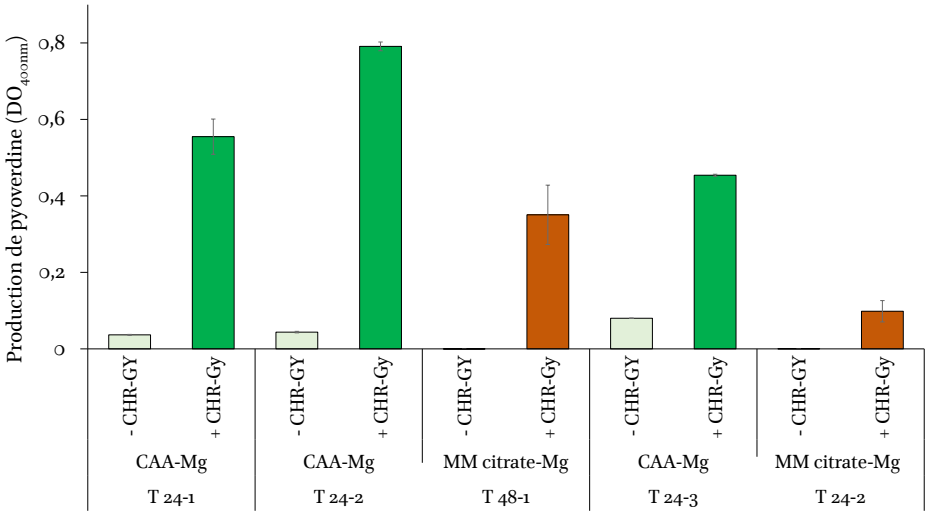


Figure 50 : Production de pyoverdine de PP_Δ*fur* en milieu en présence (foncé) **ou absence** (clair) **de CHR-GY** après des cycles de 24 h en CAA-Mg (vert) ou de 48 h suivi de 24 h pour en MM citrate-Mg (marron). n = 3

Les quantités de magnésium extraites sont présentées en **Figure 51**. La majorité du magnésium dissout par PP_*Δfur* en milieu CAA-Mg est à nouveau retrouvé dans le culot bactérien, montrant l'internalisation de cet élément pour répondre aux besoins de la bactérie. Dans ce milieu, la dissolution diminue au fil des cycles, diminuant de moitié entre T 24-1 et T 24-3. Au total, lorsque le mutant est cultivé en milieu CAA-Mg, le magnésium dissout représente 1,75 % du magnésium total du déchet, soit 260 µg. Cependant, lors de cette expérience le milieu CAA-Mg abiotique a également permis d'extraire 1,71 % du magnésium soit 252 µg au total. Cela questionne l'action directe de PP_*Δfur* sur l'extraction du magnésium. En effet, l'incubation sous agitation du milieu contenant le CHR-Gy pourrait permettre de dissoudre des quantités importantes de magnésium qui serait alors

internalisées par PP_*Δfur* afin de répondre à ses besoins nutritionnels. Lorsque la souche est cultivée en MM citrate-Mg, de façon surprenante, le magnésium est retrouvé majoritairement dans le surnageant de culture et les quantités internalisées par la souche représentent à peine 1/10ème de la quantité extraite à chaque cycle. Dans ce milieu de culture, la souche a permis d'extraire 595 µg de magnésium, soit 4 % du total. Cependant, la dissolution du magnésium en MM citrate-Mg abiotique est plus de 2 fois supérieure au milieu ensemencé (1280 µg au total, soit 8,65 %) et l'extraction est trois fois plus importante lors du 1er cycle que du 2ème.

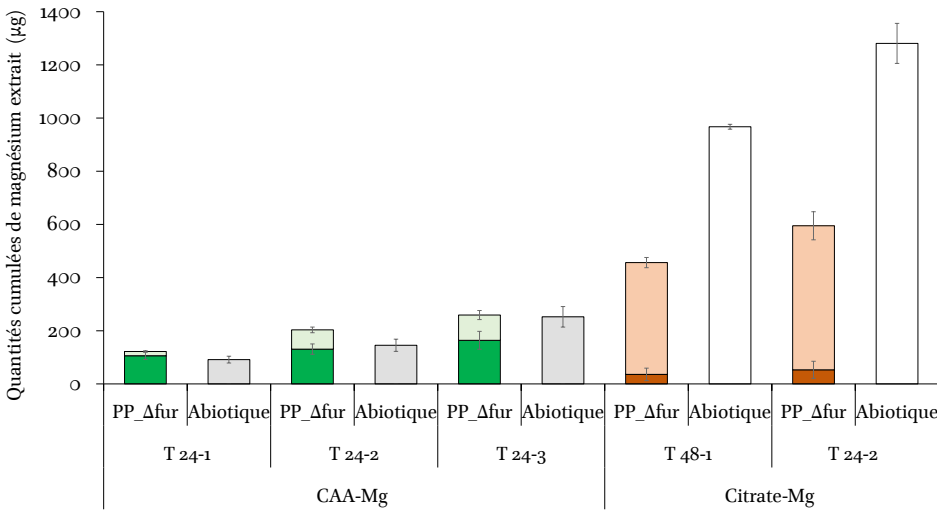


Figure 51 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par PP_Δ*fur* en milieu CAA-Mg (vert), en milieu MM citrate-Mg (marron) ou en milieu abiotique (gris) après des cycles de 24 h en CAA-Mg ou de 48 h suivi de 24 h en MM citrate-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé.

A l'inverse du magnésium, en milieu CAA-Mg la majorité du fer est retrouvée dans le surnageant de culture tout au long des cycles. PP_*Δfur* dissout 10,5 µg de fer après 24 h puis 15 µg lors du second cycle et enfin11,7 µg lors du 3ème. Lorsque nous aurons déterminé le milieu de culture le plus adapté, une multiplication des cycles d'altération permettra de voir si l'extraction diminue bien au fil des cycles et si la limite d'extraction est atteignable puisqu'en CAA-Mg la souche ne permet d'extraire que 37,1 µg, soit 4 % du fer. L'impact du milieu CAA-Mg abiotique est négligeable concernant la dissolution du fer. Cela semble confirmer l'hypothèse que le CAA-Mg a un effet uniquement sur la dissolution du magnésium, situé dans les couches externes des fibres amiantées. A l'opposé, le fer

situé dans des couches plus internes nécessite d'être réellement chélaté afin d'être extrait et un simple contact avec le milieu n'a pas d'effet. En MM citrate-Mg, l'extraction du fer est 1,5 fois plus importante pour PP_*Δfur*, et à nouveau la majorité du fer est retrouvée dans le surnageant de culture, et ce dès le 1er cycle. Dans ce milieu, la souche permet d'extraire 6,41 % du fer, soit 59 µg au total. Cependant, tout comme pour le magnésium, le milieu citrate-Mg abiotique contribue grandement à la dissolution du fer puisque des quantités encore plus importantes sont extraites lorsque la souche n'est pas inoculée.

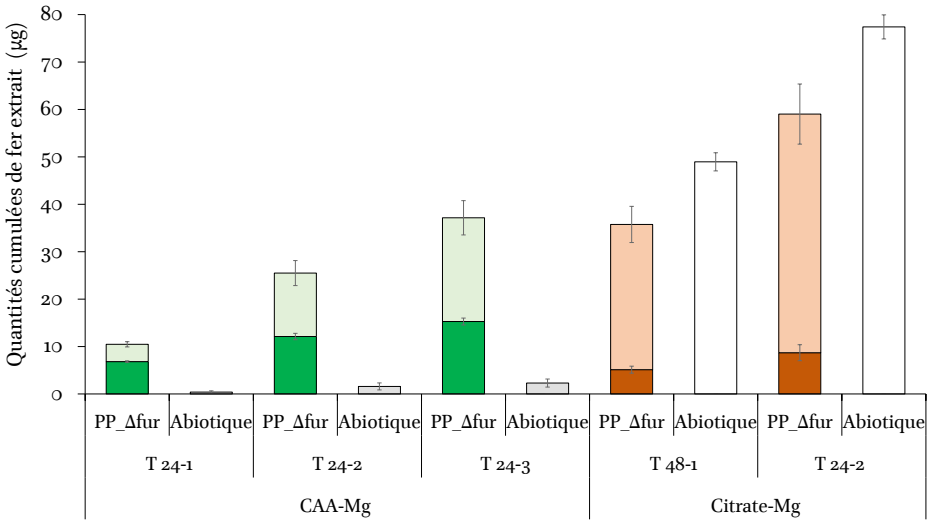


Figure 52 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par *P. putida* PP_Δ*fur* en milieu CAA-Mg (vert), en milieu MM citrate-Mg (marron) ou en milieu abiotique (gris) après des cycles de 24 h en CAA-Mg ou de 48 h suivi de 24 h en MM citrate-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé.

Le citrate est connu pour être un bon chélateur de fer jouant le rôle de sidérophore, et bien qu'il se trouve dans des concentrations relativement faibles et que le milieu soit tamponné, il permet d'extraire une quantité importante de fer des fibres (77,4 µg, soit 8,41 %). De plus, nous savons que la dissolution du magnésium, provenant de la matrice ou de la couche externe de brucite des fibres, entraine une importante déstructuration du déchet. Cela a alors pour conséquence de débobiner les fibres en structure de cigares, conduisant indirectement à la libération du fer situé dans les couches plus internes. Ainsi, l'extraction du magnésium peut être reliée à l'extraction du fer et constitue donc une preuve de l'altération des déchets amiantés. Nous pouvons également émettre l'hypothèse

qu'une dissolution importante de fer semble également perturber l'intégrité du déchet et entrainer la libération de quantités conséquentes de magnésium.

2.3 Suivi de l'altération par une souche incapable de produire de la pyoverdine

Afin de vérifier le rôle de la pyoverdine produite par *P. putida* au cours de la dégradation des déchets de flocage, nous avons réalisé 5 cycles d'altération de CHR-Gy de 24 h avec la souche PP_*ΔpvdA,* incapable de produire de la pyoverdine, en comparaison avec PP_*Δfur* qui en produit même en présence du fer libéré des amiantes.

Les résultats de croissance sont présentés en **Figure 53.** Dans le milieu CAA-Mg carencé en fer et en magnésium, la croissance de la souche PP_*Δfur* est plus faible (1.10^7 UFC.mL^{-1}) par rapport au milieu supplémenté en magnésium (2.10^8 UFC.mL^{-1}) tandis que la croissance est maximale après addition de CHR-Gy, apportant du fer et du magnésium, nécessaires à la croissance de la souche (1.10^9 UFC.mL^{-1}). Le mutant PP_*ΔpvdA* présentant une dépendance plus importante au magnésium que PP_*Δfur*, ce qui explique que sa croissance en milieu CAA-Mg est très faible (3.10^4 UFC.mL^{-1} lors du 1er cycle puis 1.10^3 UFC.mL^{-1} lors des 4 autres). L'addition de magnésium restaure la croissance qui reste néanmoins inférieure de 3 à 4 log à celle de PP_*Δfur* dans ce milieu CAA. Cependant, en présence de CHR-Gy en milieu CAA-Mg, la croissance est nettement stimulée et est comparable à celle de PP_*Δfur*. La présence de magnésium étant essentielle pour la souche, l'apport de cet élément par le CHR-Gy permet d'augmenter sa croissance d'environ 6 log par rapport au milieu CAA-Mg. La souche n'étant pas capable de produire de la pyoverdine ni aucun autre sidérophore et aucun autre système d'import du fer n'ayant été décrit actuellement chez *P. putida*, la souche doit être capable d'extraire, des déchets de CHR-Gy, d'autres éléments essentiels à sa croissance.

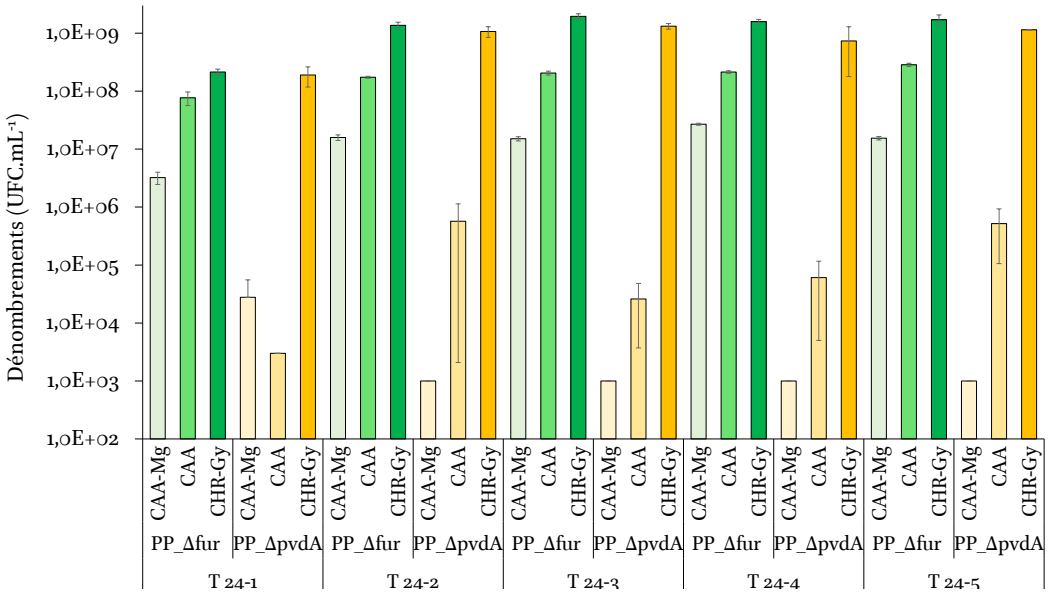


Figure 53 : Croissance de *P. putida* PP_Δ*fur* (vert) et **PP_Δ*pvdA*** (jaune) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg, CAA ou CAA-Mg + CHR-Gy. n = 3

Comme lors des expériences d'altération précédentes, nous remarquons que la production de pyoverdine de PP_*Δfur* en présence de CHR-Gy, présentée en **Figure 54**, atteint son maximum lors du 2ème cycle (DO_{400nm} = 0,61) puis diminue lors des cycles suivants et se stabilise entre le 4ème et le 5ème cycle (DO_{400nm} = 0,30). Des cycles supplémentaires permettraient de déterminer l'évolution lors des cycles suivants. La production semble stable tout au long des cycles dans les deux autres milieux. L'hypothèse est que la libération de fer entrainerait une diminution de la production de pyoverdine par un mécanisme inconnu et indépendant de la croissance puisque cette dernière est constante. Des mécanismes de quorum sensing pourraient également intervenir indépendamment du régulateur transcriptionnel Fur pour éviter à la souche de produire de la pyoverdine si le milieu est riche en fer et que la croissance de la souche est déjà optimale.

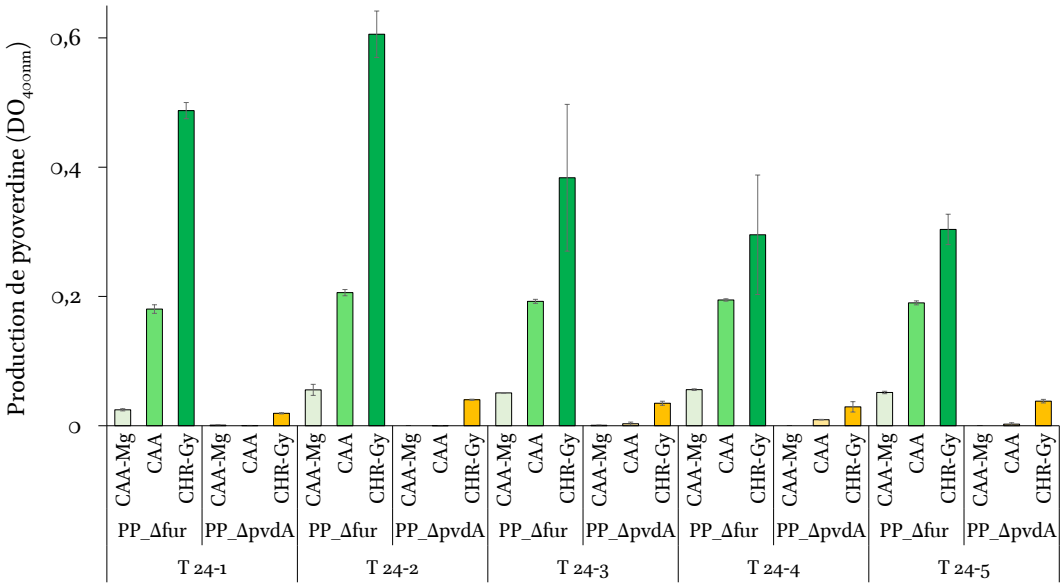
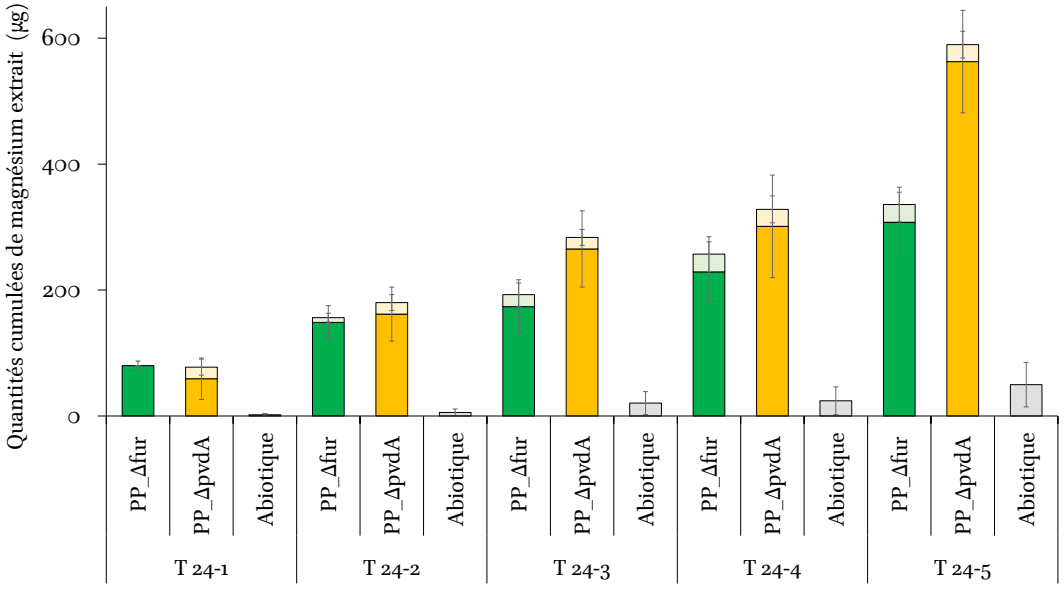


Figure 54 : Production de pyoverdine de **PP_Δ*fur*** (vert) et **PP_Δ*pvdA*** (jaune) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg, CAA ou CAA-Mg + CHR-Gy. n = 3

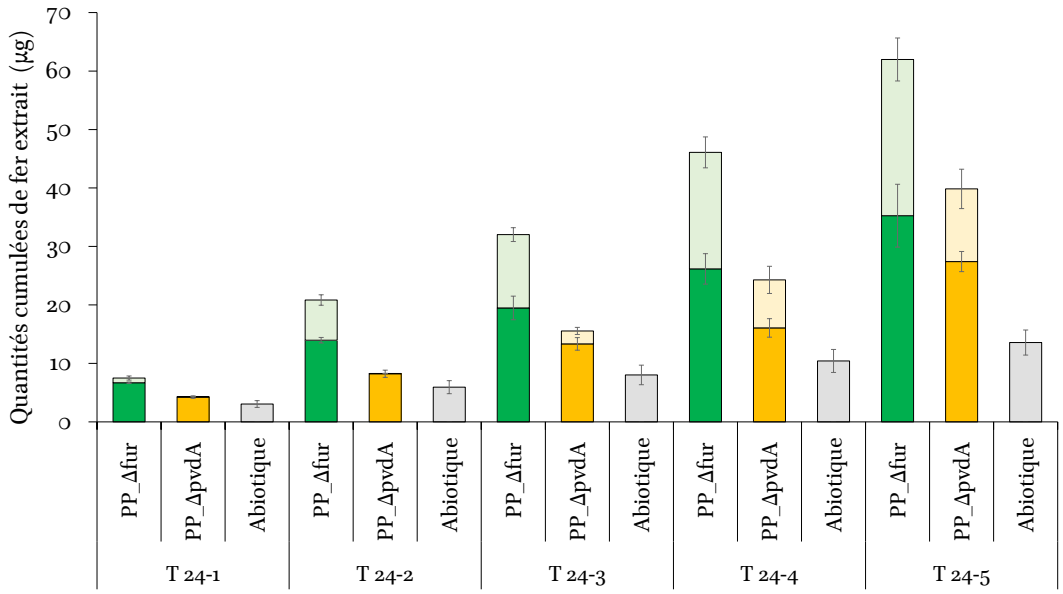
Sur la **Figure 55,** on remarque que la part la plus importante du magnésium est retrouvée dans le culot bactérien pour les deux souches, impliquant un mécanisme actif lié à la présence des bactéries qui ont besoin de cet élément pour leur développement. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus en MM citrate-Mg où la majorité du magnésium était retrouvée dans le surnageant de culture, confirmant que la dissolution était due au milieu et non aux bactéries qui n'en avaient pas besoin puisque les quantités internalisées étaient très faibles. De plus, la contribution du milieu CAA-Mg à la dissolution du magnésium est négligeable dans cette expérience, contrairement aux précédentes. Cela peut être dû à l'hétérogénéité du déchet, conduisant à des échantillons formés d'une couche de brucite plus facilement solubilisable dans le milieu. La souche PP_*Δfur* extrait environ 80 µg de magnésium dès le 1er cycle puis la quantité de Mg augmente progressivement au fil des cycles. Au total, ces 5 cycles d'altération par PP_*Δfur* permettent d'extraire 336 µg de magnésium, représentant 2 ,27 % du magnésium total dans de l'échantillon. La dissolution par le mutant PP_*ΔpvdA* suit la même tendance que le mutant PP_*Δfur* bien que les quantités extraites soient toujours supérieures. Cette augmentation soudaine lors du cycle 5 est plutôt surprenante puisqu'elle représente plus de la moitié du magnésium total extrait par la souche (261,6 µg sur 589,8 µg au total). Après vérification par PCR, la culture de PP_*ΔpvdA* était toujours pure à la fin du 5ème cycle d'altération et cette

extraction est donc bien due au mutant et à sa forte dépendance au magnésium. PP_*ΔpvdA* a ainsi permis de dissoudre 3,98 % du magnésium des fibres et est ainsi deux fois plus efficace que PP_*Δfur*.



Figures 55 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par **PP_Δ*fur*** (vert) et **PP_Δ*pvdA*** (jaune) et par le témoin abiotique CAA-Mg (gris) durant 5 cycles de 24 h. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

Cette importante extraction du magnésium lors du cycle 5 d'altération par PP_*ΔpvdA* est également corrélée à une dissolution du fer, présentée en **Figure 56**, qui est environ deux fois plus élevée (15,6 µg) que lors du 4ème (8,7 µg) ou du 3ème (7,3 µg). La majorité du fer dissout en présence de PP_*ΔpvdA* est retrouvée dans le culot bactérien, laissant penser que la dissolution active du magnésium entraine inévitablement le relargage de fer internalisé par la souche. *P. putida* KT2440 posséderait une voie d'import du fer autre que *via* des molécules chélatrices du fer puisque le test CAS s'est avéré négatif. Il serait intéressant d'étudier ses différents transporteurs grâce à des études protéomiques réalisées en présence de différentes sources de fer. PP_*ΔpvdA* a ainsi dissout 39,8 µg de fer, soit 4,33 % du fer total. PP_*Δfur* extrait 7,5 µg de fer dès le premier cycle, 13,3 µg au second puis la dissolution se stabilise autour de 14 µg pour chaque cycle et atteint ainsi une extraction totale de 62 µg de fer, soit 6,73 % du total.



Figures 56 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par ***P. putida*** **PP_Δ*fur*** (vert) et **PP_Δ*pvdA*** (jaune) et par le témoin abiotique CAA-Mg (gris) durant 5 cycles de 24 h. Les quantités dosées dans le surnageant sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

En conclusion, la présence de déchet amianté stimule la croissance bactérienne grâce au fer et au magnésium rendu biodisponibles et ne semble pas représenter de toxicité pour les différentes souches de *Pseudomonas putida*. La souche PP_*Δfur* est capable de produire de la pyoverdine de façon indépendante de la présence de fer libéré des amiantes au cours des 5 cycles de renouvellement suivis. Néanmoins il serait intéressant de réaliser plus de cycles afin de voir comment cette production évolue au fur et à mesure que du fer (et d'autres composants) sont dissouts des déchets de flocage. Malgré sa production continue de pyoverdine, PP_*Δfur* extrait des quantités de fer similaires à KT2440 WT lorsque l'on réalise 2 cycles d'altération. Ces résultats confirment la nécessité de réaliser plus de cycles afin de voir si, sur le long terme, cette production continue confère un avantage au mutant par rapport à la souche sauvage dont la production est réprimée par le fer libéré des fibres. La forte dépendance au magnésium de PP_*Δfur* permet d'en dissoudre des quantités non négligeables mais avec un rendement toutefois inférieur à celui de PP_*ΔpvdA* qui présentait une dépendance plus importante. Néanmoins, PP_*Δfur*, présente une dépendance au magnésium plus élevée que celle de *P. aeruginosa* PaM1. Les résultats obtenus avec ce mutant PaM1, présentés dans le **Chapitre 1**, confirment que l'accumulation de cycles d'altération

permet d'augmenter les quantités de fer et de magnésium extraites par les mutants en comparaison avec PAO1 WT (Lemare *et al.*, 2022). Une multiplication des cycles d'altération par PP_*Δfur* devrait alors permettre d'obtenir des résultats comparables.

La limite d'extraction du fer comme du magnésium par PP_*Δfur* ne semble pas être atteinte puisque ces éléments sont toujours extraits lors du dernier cycle et une multiplication des cycles s'avère nécessaire. De plus, le milieu minimum contenant du citrate conduit à une déstructuration importante des fibres amiantes par extraction du fer et du magnésium. Cela nous mène à l'hypothèse que l'utilisation préalable de ce milieu permettrait une destruction des fibres afin de permettre aux bactéries productrices de PVD d'atteindre des zones dans les fibres du CHR-Gy normalement trop internes afin d'extraire les métaux inaccessibles sans ce prétraitement. Enfin, déléter le système de régulation de la production de pyoverdine en présence de fer chez *P. putida* montre son efficacité dans notre contexte d'extraction du fer et du magnésium des déchets amiantés. Ces expériences permettent d'établir la preuve de concept avec la souche de *P. putida* sur les déchets de flocage. Cependant, il est nécessaire d'optimiser cette extraction afin d'obtenir des fibres dépourvues de fer et ne présentant donc plus les caractéristiques de la fibre d'amiante.

3 Dissolution de la matrice des déchets de flocage en milieux acides

Le chrysotile, seule espèce d'amiante présente dans notre déchet, est sensible à l'attaque acide. En 2012, un procédé innovant utilisant du petit lait afin de créer un environnement acide favorisant la dissolution de la matrice des matériaux contenant de l'amiante a été proposé. Ce procédé permet ainsi de libérer les fibres amiantées de la matrice dans laquelle elles sont piégées avant que ces dernières ne soient traitées par un traitement hydrothermal afin d'être rendues inertes (Balducci, 2012). Stanik et al., quant à eux, décrivent l'utilisation de *Lactobacillus casei* et de *Lactobacillus plantarum* afin de déstructurer le chrysotile. Cependant, la seule utilisation des métabolites produits par ces bactéries ne parvient pas à altérer très efficacement l'amiante (Stanik *et al.*, 2006). Ainsi, afin de développer un procédé respectueux et l'environnement et d'éviter d'avoir recours au traitement hydrothermal, l'équipe a développé un traitement utilisant du petit lait ensemencé par *Lactobacillus plantarum.* Le petit-lait, déchet de l'industrie alimentaire, contient environ 1636 mg/L de

magnésium (n = 13) et environ 2,38 mg/L de fer (n = 11). L'ensemencement par une bactérie lactique permet de maintenir un pH acide entre 3,2 et 4,9 conduisant à la dissolution de la matrice gypse ($CaSO_4$, 2 H_2O), à la libération d'une grande quantité de magnésium et ainsi à une extraction plus importante de fer des déchets de flocage compte tenu de la dissolution de la couche de brucite des fibres de chrysotile.

3.1 Altération longue durée : comparaison de la dissolution en milieu citrate et en milieu petit lait ensemencé ou non par une bactérie lactique

Dans le but d'étendre le brevet français (brevet FR2109454, 2021) portant sur le prétraitement en milieu petit-lait ensemencé par *L. plantarum* déposé par l'équipe à l'international (brevet PCT/FR2022/051706), nous avons comparé dans un premier temps cette altération à celle obtenue en milieu contenant du citrate (50 mM). En effet, l'utilisation du citrate lors des précédentes expériences d'altération du flocage par les souches de *P. putida* a conduit à une extraction importante du fer par le témoin abiotique. Le citrate, produit industriellement grâce à l'utilisation de moisissures comme *Aspergillus brasiliensis*, est en effet connu pour être un excellent chélateur de fer. Le citrate est utilisé à nouveau à une concentration de 50 mM puisque cette dernière permettait une extraction importante du fer, toutefois la solution n'est pas tamponnée car il ne s'agit pas d'un milieu de culture et présente donc un pH d'environ 2,7 (n = 12). De plus, afin de confirmer l'importance de *L. plantarum* dans la dissolution du fer et du magnésium sur le long terme, nous avons également réalisé une dissolution des déchets de flocage en milieu petit lait non ensemencé. La dissolution a également été réalisée avec de l'eau mais ce milieu n'ayant permis d'extraire ni fer ni magnésium, les résultats ne sont pas présentés. Des cycles de contact de 168 H, soit 7 jours, des déchets de flocage dans les trois conditions sont répétés et les quantités de fer et de magnésium issues de la dissolution du déchet sont présentées dans en **Figures 57** et **58**.

Concernant le magnésium, la dissolution maximale est obtenue en milieu citrate permettant de dissoudre près de 100 mg, majoritairement lors des trois premiers cycles, permettant la dissolution environ 30 mg par cycle. De plus, dès les premiers cycles d'altération, nous avons remarqué que les déchets de flocage incubés en présence de citrate étaient déstructurés et ne formaient plus un

ensemble dense de fibres emprisonnées dans une matrice fibreuse et restant dans le fond du tube mais plutôt une sorte de poudre en suspension dans tout le tube. L'utilisation du citrate semble permettre de déstructurer totalement le déchet comme le montre la **Figure 58** en comparaison avec le déchet altéré par le petit lait + *L. plantarum* dont la structure des fibres est conservée. Cependant, l'analyse minérale du déchet de flocage a déterminé une quantité de 74 mg de magnésium par gramme de CHR-Gy (soit 14,8 mg dans 0,2 g d'échantillon), ce qui est inférieur à la quantité extraite par le citrate dans cette expérience. Cela peut s'expliquer par le fait que le CHR-Gy étant un déchet hétérogène, la quantité de magnésium peut varier d'un prélèvement à l'autre. De plus, le citrate ayant déstructuré totalement le déchet, d'autres éléments pouvant biaisé le dosage colorimétrique du magnésium (comme le calcium par exemple) ont peut-être été libérés de la matrice ou des fibres. L'utilisation du petit lait seul permet de dissoudre presque la moitié du magnésium total, soit 6,9 mg avec une extraction relativement constante au fil des cycles. L'ensemencement du petit lait par *L. plantarum* permet d'atteindre 77 % d'altération soit 11,5 mg de magnésium. La dissolution la plus importante est atteinte au cycle 1 avec 3 mg puis se stabilise autour de 1,5 mg sur l'ensemble des cycles.

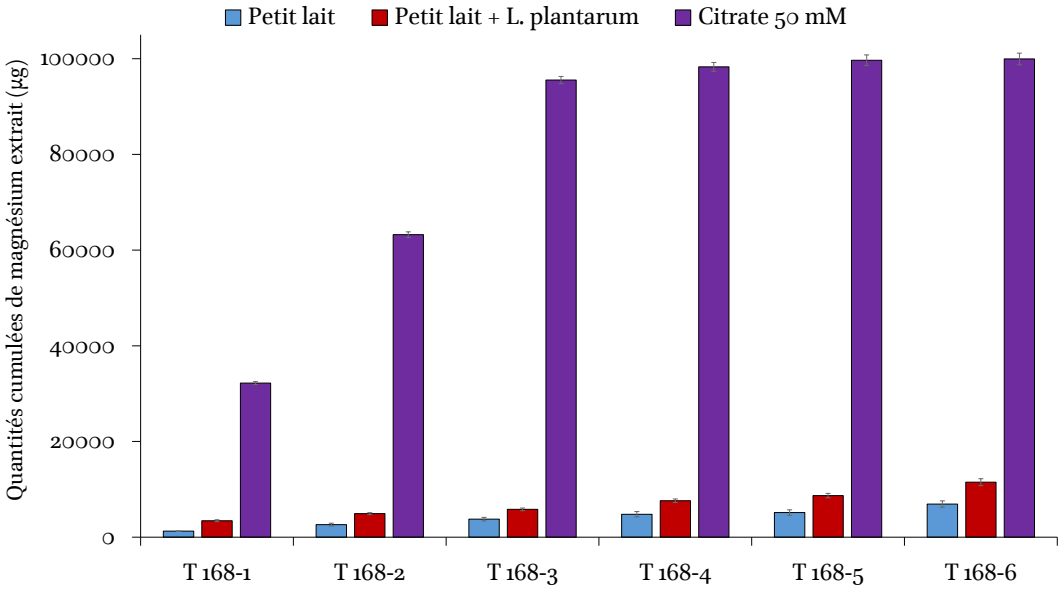


Figure 57 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par le petit lait stérile (bleu) ou ensemencé par *L. plantarum* (rouge) ou par du citrate à 50 mM (violet), durant 6 cycles de 168 h. n = 3

Concernant le fer dissous durant l'altération dans les 3 conditions, les résultats présentés en **Figure 58** ne montrent pas de différence d'efficacité entre le citrate et le petit lait + *L. plantarum* à l'issu des 6 cycles tandis que le petit lait non ensemencé dissout 1,5 fois moins de fer. Le petit lait + *L. plantarum* extrait une quantité relativement importante de fer dès le 1er cycle de 168 h (174 µg) alors qu'il faut attendre le deuxième cycle en milieu citrate pour atteindre la même extraction. Pour le petit lait + *L. plantarum* la majorité du fer est extrait lors des deux premiers cycles (115 et 174 µg) puis l'extraction ralentit et se stabilise autour de 50 µg de fer extrait à partir du 4ème cycle. Pour le milieu citrate, l'extraction se fait progressivement jusqu'à un maximum de 127 µg lors du troisième cycle puis ralentit au fil des cycles pour atteindre 16 µg lors du dernier. Au total, le milieu citrate a permis l'extraction de 43 % du fer tandis que le petit lait a atteint 25 % d'extraction dans la condition non ensemencé et 44 % lorsqu'il est ensemencé avec *L. plantarum*.

Il serait tout de même intéressant de confirmer ces dosages par des analyses ICP (« Inductively Coupled Plasma » ou analyse par plasma à couplage inductif), notamment pour la dissolution du magnésium par le citrate.

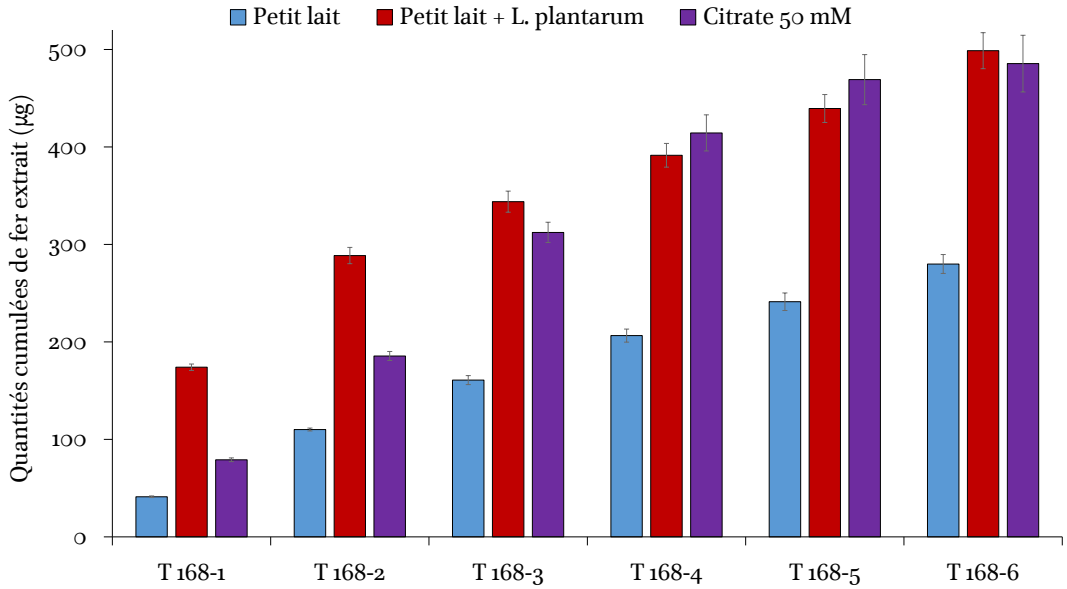


Figure 58 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-GY) par le petit lait stérile (bleu) ou ensemencé par *L. plantarum* (rouge) ou par du citrate à 50 mM (violet), durant 6 cycles de 168 h. n = 3

L'observation des déchets par MET après leur altération montre que l'échantillon altéré par l'eau (**Figure 59A**) présente de grandes fibres piégées dans une matrice formant des structures géométriques foncées. L'eau ne semble ainsi pas avoir altéré les déchets, comparé au petit lait + *L. plantarum* qui permet d'obtenir également de longues fibres mais où la matrice semble moins importante (**B**). L'utilisation de citrate entraîne une déstructuration du déchet, conduisant à une structure avec des fibres extrêmement fines enchevêtrées (**C**).

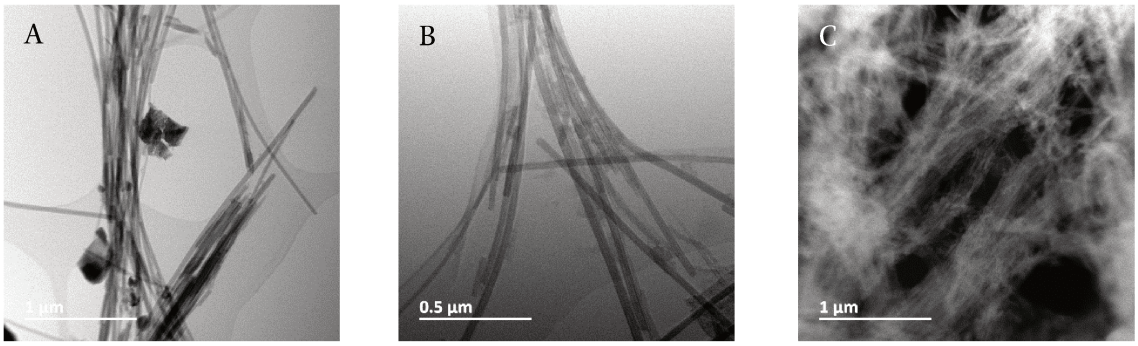


Figure 59 : Déchets de flocage (CHR-Gy) altérés par de l'eau (A), du petit lait ensemencé par *L. plantarum* (B) ou du citrate 50 mM (C) après les 6 cycles de 168 h observés par MET. Ces échantillons ont été utilisés pour réaliser les analyses par MET-EDS de la composition des déchets après altération.

Afin de quantifier les quantités de fer et de magnésium restantes au sein des fibres après altération, des analyses par MET-EDS ont été effectuées sur les fibres. Les rapports élément/silice a été calculé pour le magnésium (Mg/Si), le fer (Fe/Si) et le calcium (Ca/Si) et sont présentés en **Figure 60**. Le déchet non altéré est donc bien composé majoritairement de magnésium. Après le traitement d'altération, le ratio Mg/Si s'effondre, de façon identique pour l'eau et le petit lait + *L. plantarum* et de façon plus conséquente pour le citrate. Le ratio Fe/Silice diminue également mais de façon moins importante. Le ratio Ca/Si, représentant la matrice de gypse ($CaSO_4$) est relativement faible mais constant qu'importe le milieu d'altération utilisé.

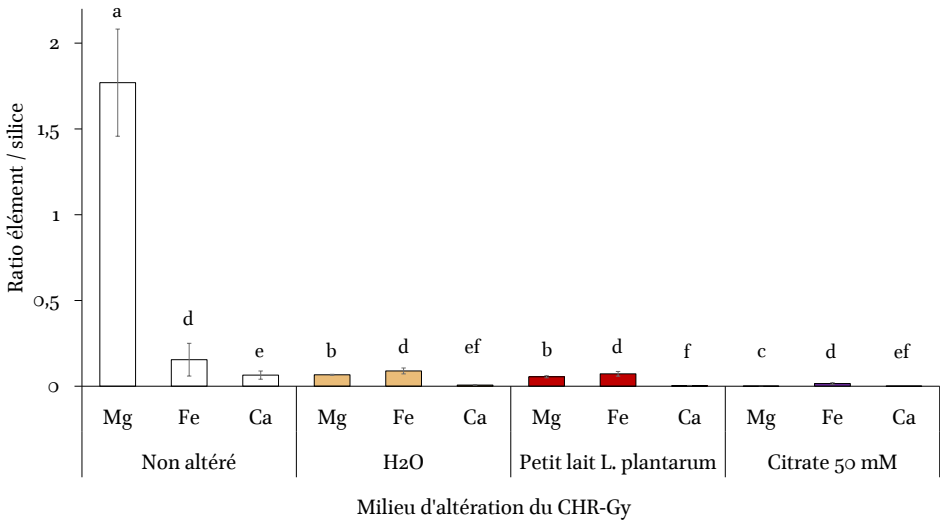


Figure 61 : Ratio magnésium/silice, fer/silice ou calcium/silice des déchets de CHR-GY non altéré, présentés dans le paragraphe 1.1 « caractérisation des déchets de flocage » (blanc), ou dissous par de l'eau purifiée en tant que témoin négatif (beige), du petit lait ensemencé par *L. plantarum* ou du citrate 50 mM durant 6 cycles de 168 h. Les analyses statistiques ont été réalisées pour chaque élément (Mg, Ca ou Fe) indépendant grâce à un test de Kruskal Wallis sur RStudio

Nous pouvons conclure que ces traitements en milieux acides semblent donc dégrader le déchet, notamment pour le citrate qui déstructure le déchet dans son intégralité et semble être le seul traitement capable d'extraire des quantités significativement différentes de magnésium. Pour la suite des expériences, nous avons décidé de nous concentrer sur l'utilisation du petit lait. En effet, son utilisation permet de revaloriser un déchet issu de l'industrie laitière et s'inscrit ainsi dans notre démarche de développement d'un procédé durable et respectueux de l'environnement. Afin de maintenir un pH acide et d'éviter l'alcalinisation du milieu due au relargage du magnésium, l'ensemencement du petit lait par une souche de bactérie lactique nous semble être une voie prometteuse.

3.2 Optimisation de l'altération en présence de petit lait ensemencé par les bactéries lactiques

Toujours dans une visée d'optimiser le procédé de dégradation des déchets amiantés et de compléter ainsi le brevet cité précédemment, nous avons testé différentes espèces de bactéries

lactiques représentant 31 souches au total. Après avoir validé la croissance des différentes souches en milieu MRS, milieu optimisé pour la croissance des lactobacilles (données non présentées), les 17 souches présentant les meilleures croissances ont été cultivées ensuite en milieu petit lait.

3.2.1 Croissance des bactéries lactiques milieu petit lait

Afin de rendre le graphique présenté en **Figure 61A** plus lisible, les souches présentant les meilleures croissances sont représentées sur un graphique indépendant (**Figure 61B**). Les courbes de croissance des différentes souches montrent que presque toutes les bactéries sont capables de se développer en milieu petit lait. Certaines souches comme *L. sakei sakei* 484, *P. pentasaceus*, *L. salivarus*, *L. lactis*, ou encore *L. fermentum* ne sont pas capables de croître dans ce milieu, même après 72 h de culture. *L. pentosus* et *L. plantarum* présente une croissance significative dès les 24 premières heures de culture, ce qui peut être un avantage pour notre procédé de bioremédiation. De plus, même après 72 h en milieu petit lait, leur croissance ne semble pas stagner, signifiant qu'elles pourront se développer durant tout le temps de contact avec les déchets amiantés. Si l'on s'intéresse maintenant aux souches dont la croissance est la plus importante, on remarque que *L. rhamnosus* présente une croissance importante dès les premières heures de culture, ce qui est une fois de plus un avantage. Cette souche présente la densité bactérienne la plus importante après 72 h, avant *L. brevis* et *L. lactis* 99. Enfin *L. paracasei* semble également être une souche intéressante car sa croissance est parmi les plus importantes durant toute la durée de la culture mais elle présente cependant une légère baisse durant les dernières 24 h de culture.

Ainsi, pour la suite de la mise au point de l'altération des déchets de CHR-Gy en milieu petit lait ensemencé de *Lactobacilles*, nous avons décidé de travailler avec :

- Des souches présentant une croissance rapide dès les premières heures de culture : *L. plantarum* et *L. pentosus*
- Des souches présentant une croissance importante durant toute l'incubation : *L. brevis, L. paracasei* et *L. rhamnosus*
- Une souche présentant une croissance moyenne et plutôt lente pour comparer l'impact sur l'altération : *L. plantarum subsp. argentoratensis*

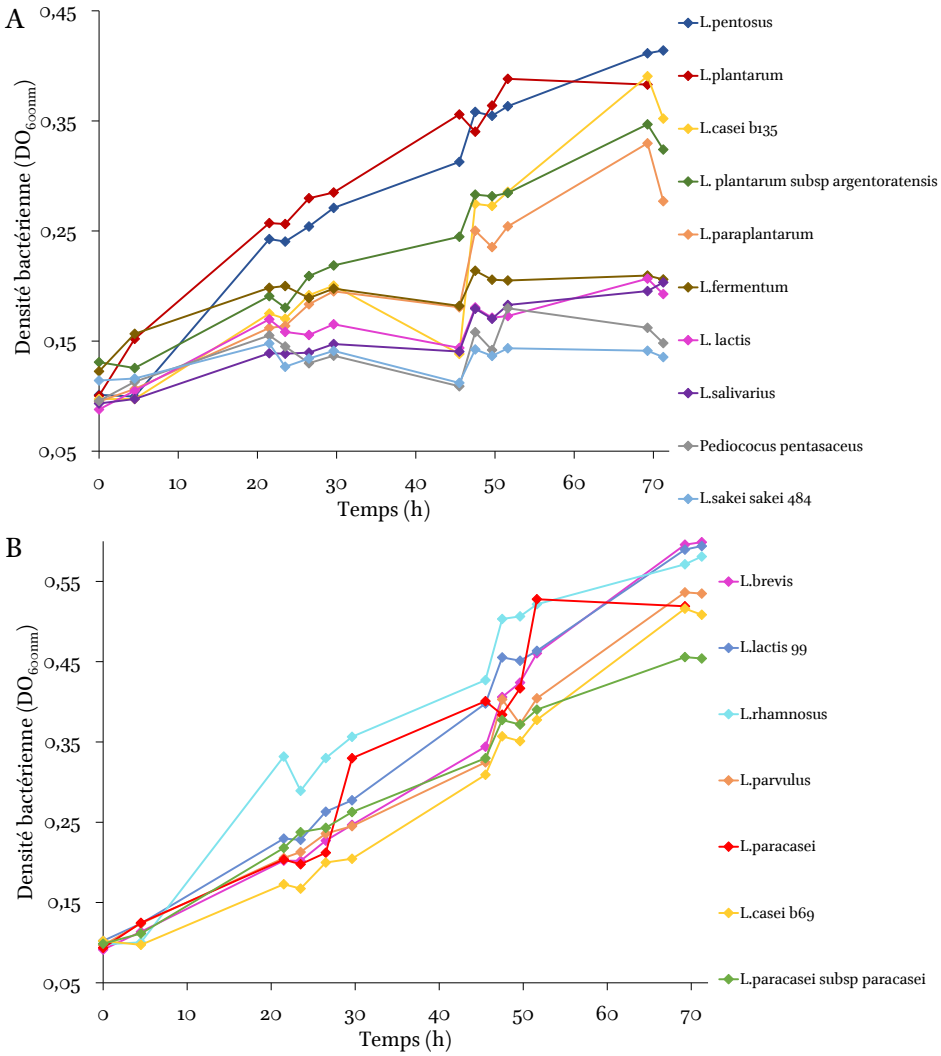


Figure 61 : Cinétique de croissance de différentes bactéries lactiques en milieu petit lait durant 72 h

3.2.2 Suivi de l'altération des déchets de flocage en milieu petit lait ensemencé par les bactéries lactiques

L'ajout de bactéries lactiques dans le petit lait permet d'extraire environ 3 fois plus de magnésium que le petit lait seul (**Figure 62**). En effet, par fermentation ces souches sont capables de maintenir un pH acide d'environ 4 dans le milieu (données non présentées) favorisant la dissolution des fibres. Le magnésium est extrait de façon conséquente lors des deux premiers cycles pour toutes les souches puis la dissolution diminue brusquement au cycle 3, passant, par exemple de 9,5 mg pour

L. pentosus à 518 µg. La dissolution est stable ensuite pour toutes les souches jusqu'au dernier cycle mais reste largement inférieure pour *L. pentosus* (354 µg contre 461 µg pour *L. paracasei* et 426 µg pour *L. p. argentoratensis*). Concernant la dissolution du magnésium, il n'y a pas de différence significatives entre les différentes souches.

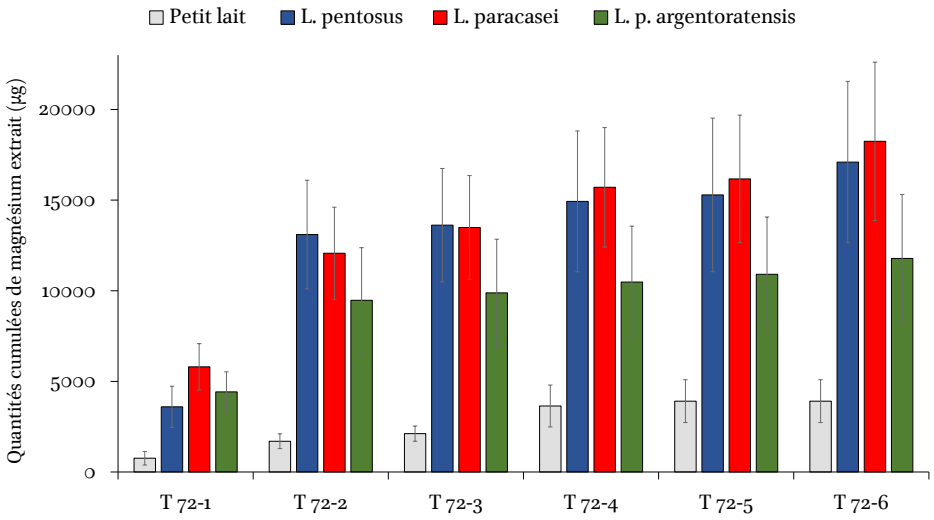


Figure 62 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait stérile (gris) ou ensemencé par *L. pentosus* (bleu), par *L. paracasei* (rouge) ou par *L. p. argentoratensis* (vert) durant 6 cycles de 72 h. n = 3

Les bactéries lactiques font parties des rares micro-organismes pour lesquelles le fer n'est pas un élément essentiel pour leur croissance. Cependant, la **Figure 62** montre qu'elles permettent une importante dissolution de magnésium. Nous avions assumé précédemment que la dissolution du magnésium de la couche de brucite entraine une déstructuration des fibres amiantées entrainant la libération de fer. Ainsi, d'après nos résultats, l'ensemencement de bactéries lactiques dans le milieu réactionnel permet d'extraire des quantités de fer nettement supérieures à la condition en présence de petit lait (**Figure 63**). Les quantités maximales de fer sont extraites lors des deux premiers cycles d'altération avec en moyenne 130 µg extrait par cycle, sans distinction parmi les souches. Les quantités extraites diminuent dès le 3ème cycle, avec environ 50 µg pour *L. paracasei* et *L. p. argentoratensis* mais seulement 35 µg pour *L. pentosus*. A partir du 5ème cycle, l'extraction par le petit lait devient plus importante (37,6 µg) que pour le petit lait ensemencé (31 µg en moyenne). De plus, les souches ayant permis de dissoudre des quantités importantes de magnésium rapidement,

la majorité du fer pouvant être dissout par ce traitement l'a peut-être été lors des premiers cycles et désormais le fer restant se trouve dans des couches inaccessibles à l'altération. Dans ce cas, une altération ultérieure par la souche PP_Δ*fur* capable de produire constitutivement de la PVD permettra peut-être, grâce à ce chélateur puissant du fer, d'extraire les dernières traces de fer inaccessibles au prétraitement en milieu acide.

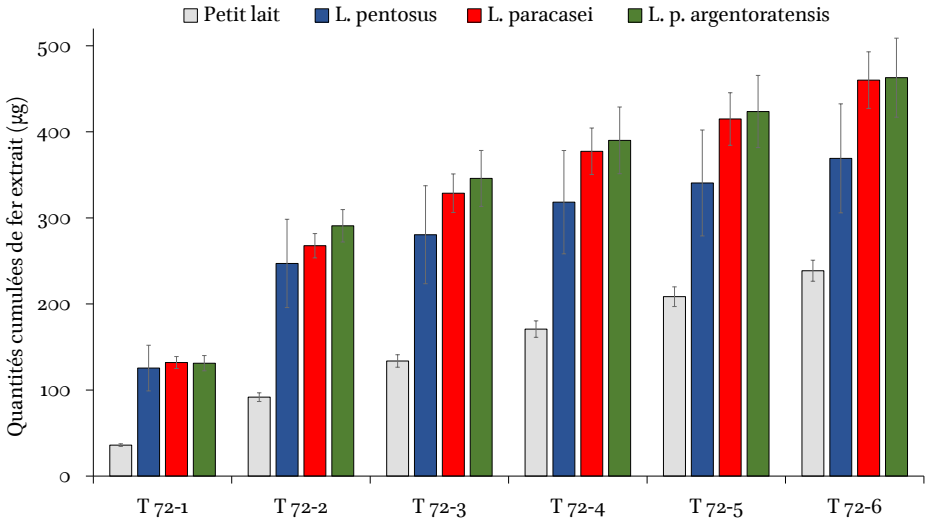


Figure 63 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait stérile (gris) ou ensemencé par *L. pentosus* (bleu), par *L. paracasei* (rouge) ou par *L. p. argentoratensis* (vert) durant 6 cycles de 72 h. n = 3

Le bilan de cette altération a permis de conclure que le petit lait seul permet d'extraire 239 µg de fer (soit 26 %), la présence de *L. paracasei* permet d'atteindre 460 µg (50 %), de *L. pentosus* 369 µg (40 %) et de *L. p. argentoratensis* 463 µg (50 %). Cependant, bien que ces résultats soient significativement différents du petit lait, l'altération totale est statistiquement identique pour ces 3 souches. Sur l'ensemble des 6 cycles, *L. paracasei* a dissout 18,2 mg, *L. pentosus* 17,1 mg et *L. p. argentoratensis* 11,8 mg contre seulement 3,9 mg de magnésium pour le petit lait. Cependant, cela représente plus de 100 % de magnésium extrait pour les deux premières souches et 79 % pour la dernière. Ces résultats doivent également être confirmés par des analyses ICP afin de déterminer si cette erreur est due à l'hétérogénéité du déchet ou à l'incertitude du dosage par colorimétrie. De plus, plusieurs mois après l'expérience, lorsque nous avons à nouveau commandé du petit lait stérile, nous nous sommes aperçu que Alsace Lait nous avait délivré du petit lait triplement concentré. C'est

ce petit lait qui a été utilisé lors de ces expériences, pouvant expliquer pourquoi les quantités de magnésium sont si importantes mais également pourquoi la filtration préalable du milieu (voir **Matériel et Méthodes paragraphe 6.2**) avait été si laborieuse. Ces résultats ne nous permettent ainsi pas de conclure sur l'extraction du fer ou du magnésium pour ces souches dans ces conditions.

Après avoir réceptionné un nouveau lot de petit lait non concentré, nous avons ensuite étudié les capacités d'altération de *L. rhamnosus* et *L. brevis*. Les souches présentant les densités bactériennes les plus importantes après 72 h de culture en milieu petit lait (**Figure 61**). Bien que les lots de milieux petit lait utilisés n'étaient pas les mêmes pour ces deux expériences, les tendances de dissolution de chaque souche pourront être évaluées. Que ce soit pour le magnésium (**Figure 64**) ou le fer (**Figure 65**), *L. rhamnosus* présente des capacités de dissolution nettement supérieures à *L. brevis.* Cependant, les deux souches présentent des profils d'extraction très différents pour les deux éléments. Comme le montre la **Figure 64**, la dissolution du magnésium par *L. rhamnosus* est la plus importante lors du premier cycle, avec presque 7 mg extraits puis diminue au fil des cycles jusqu'à une extraction nulle lors du dernier. Pour *L. brevis*, l'extraction est moyenne lors du 1er cycle et atteint son maximum lors du 2ème avec une dissolution de 83 µg de magnésium. Les quantités dissoutes diminuent au fil des cycles mais la souche est toujours capable d'extraire environ 100 µg lors du dernier cycle.

Dans le cas du fer, les profils sont similaires : la dissolution par *L. rhamnosus* est réalisée en majorité lors du 1er cycle (280 µg) puis diminue dès le 2ème cycle à 70 µg puis à 30 µg au 3ème pour atteindre 12 µg lors du dernier. A l'inverse, pour *L. brevis*, l'extraction est faible lors du 1er cycle (53 µg) puis augmente au 2ème et au 3ème pour atteindre 90 µg en moyenne avant de diminuer au fil des autres cycles jusqu'à 14 µg lors du dernier.

Au total, *L. rhamnosus* a permis d'extraire 9,7 mg de magnésium et 435 µg de fer, soit 65 et 47 % respectivement des fibres et *L. brevis* a permis, lui, d'extraire 5,6 mg de magnésium et 308 µg de fer, soit 38 % et 33 % du magnésium et du fer total.

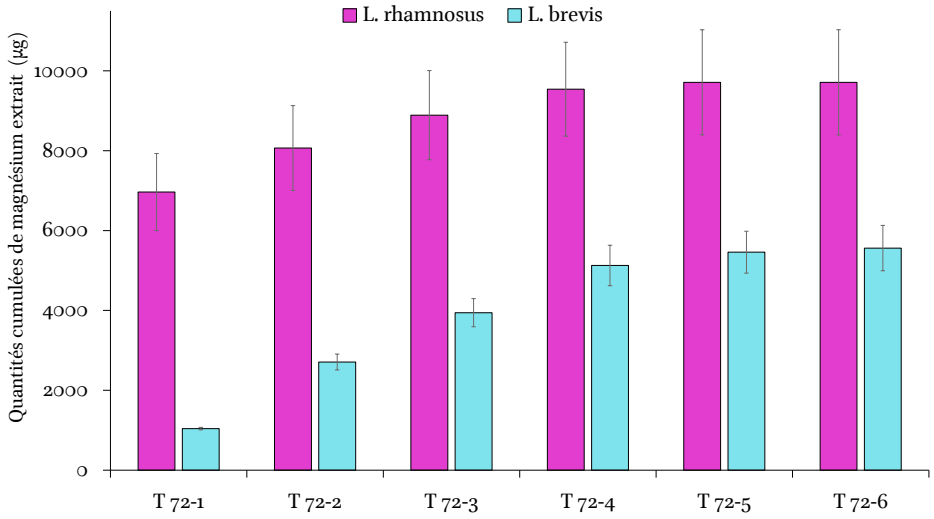


Figure 64 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) ou par *L. brevis* (bleu) durant 6 cycles de 72 h. n = 3

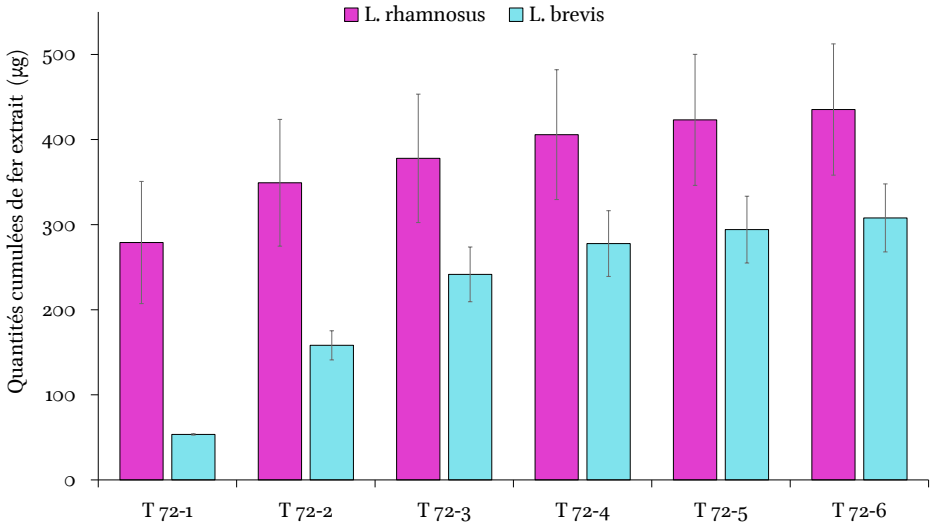


Figure 65 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait stérile ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) ou par *L. brevis* (bleu) durant 6 cycles de 72 h. n = 3

4 Combinaison des traitements biologiques pour la dégradation des déchets de flocage

Les résultats des deux approches de dégradation des déchets de flocage, l'une médiée par la présence de bactéries lactiques en milieu petit lait et l'autre par la présence de *Pseudomonas putida* produisant de la pyoverdine ont permis de valider les approches. Néanmoins, les renouvellements fastidieux et longs en batch ont limité le nombre de cycles effectués pour chaque méthode. Afin d'envisager des approches complémentaires, une combinaison des deux traitements a été réalisée afin de définir si les sidérophores étaient capables de par leur spécificité de complexation du fer d'extraire du fer après l'altération en milieu petit lait ensemencé par les bactéries lactiques. La combinaison de 4 cycles de 72 h en milieux acides suivis de 5 cycles de 24 h en présence des souches de *P. putida* a été réalisée

4.1 Suivi de l'altération en milieu petit lait ensemencé par *Lactobacillus plantarum* puis par *Pseudomonas putida*

Dans un premier temps, nous avons voulu optimiser l'altération des déchets de flocage par le petit lait ensemencé par *L. plantarum*, procédé ayant fait l'objet d'un brevet déposé par l'équipe (brevet FR2109454, 2021). Cette optimisation a été intégrée à l'extension de ce brevet à l'international, incluant désormais la dissolution par le mutant PP_*Δfur* dont la production de pyoverdine a été optimisée pour ce procédé.

Malgré les quantités importantes de fer et de magnésium extraites par le traitement primaire en milieu petit lait + *L. plantarum* des déchets de flocage, la croissance de KT2440 WT et PP_*Δfur* est toujours stimulée par l'addition de CHR-Gy en milieu CAA-Mg durant les 5 cycles, (données non présentées). Le suivi de croissance des bactéries lactiques n'a pas été réalisé puisque ces dernières sont ensemencées dans le milieu de culture dans le but de maintenir un pH acide favorable à la dissolution du chrysotile et de la matrice gypse mais il aurait été intéressant de mesurer les éléments au sein de ces bactéries, dont le fer qui n'est pas indispensable pour leur multiplication, contrairement à la majorité des micro-organismes. Comme attendu, la production de pyoverdine de

KT2440 WT est à nouveau réprimée en présence de déchets amiantés tandis que celle de PP_*Δfur* est stimulée. Cette dernière produit ainsi 10 fois plus de pyoverdine en présence de CHR-Gy par rapport au milieu CAA-Mg lors du 1er cycle et la production est environ 6 fois plus importante en présence de CHR-Gy lors de chaque cycle (données non présentées).

La dissolution du magnésium est présentée en **Figure** 66. Lors du traitement des déchets amiantés par le milieu petit lait + *L. plantarum*, la majorité du magnésium est extrait lors du 1er cycle (2860 µg) puis la dissolution ralentie et atteint 391 µg lors du 4ème cycle. Après 4 cycles de 72h, cette première dissolution permet d'extraire 5370 µg de magnésium soit 36,28 % de la quantité totale. L'ensemencement des souches de *Pseudomonas* en présence des fibres prétraitées permet encore d'extraire du magnésium dont la majorité est retrouvée dans le culot bactérien. L'extraction par KT2440 WT est relativement faible au fil des cycles puisqu'elle est comprise entre 35 et 48 µg aux cycles 2, 3 et 5. Le 1er cycle présente une extraction d'environ 61 µg qui peut s'expliquer par le fait que les cellules sont précultivées dans des conditions de carence en magnésium et ont des besoins importants. Au total, l'ajout de KT2440 WT permet d'extraire 267 µg représentant 1,80 % de magnésium supplémentaire. Les quantités de magnésium dissoute pour chaque cycle par PP_*Δfur* ont plutôt tendance à augmenter au fil des cycles, allant de 116 µg au cycle 1, à 136 µg au cycle 2 et jusqu'à 246 µg lors du 4ème. L'utilisation du mutant PP_*Δfur* permet d'extraire 3 fois plus de magnésium que la souche sauvage, ce qui représente 784 µg, soit 5,29 % du magnésium total. La contribution du milieu CAA-Mg à la dissolution du magnésium est considérée comme négligeable représentant 0,27 %.

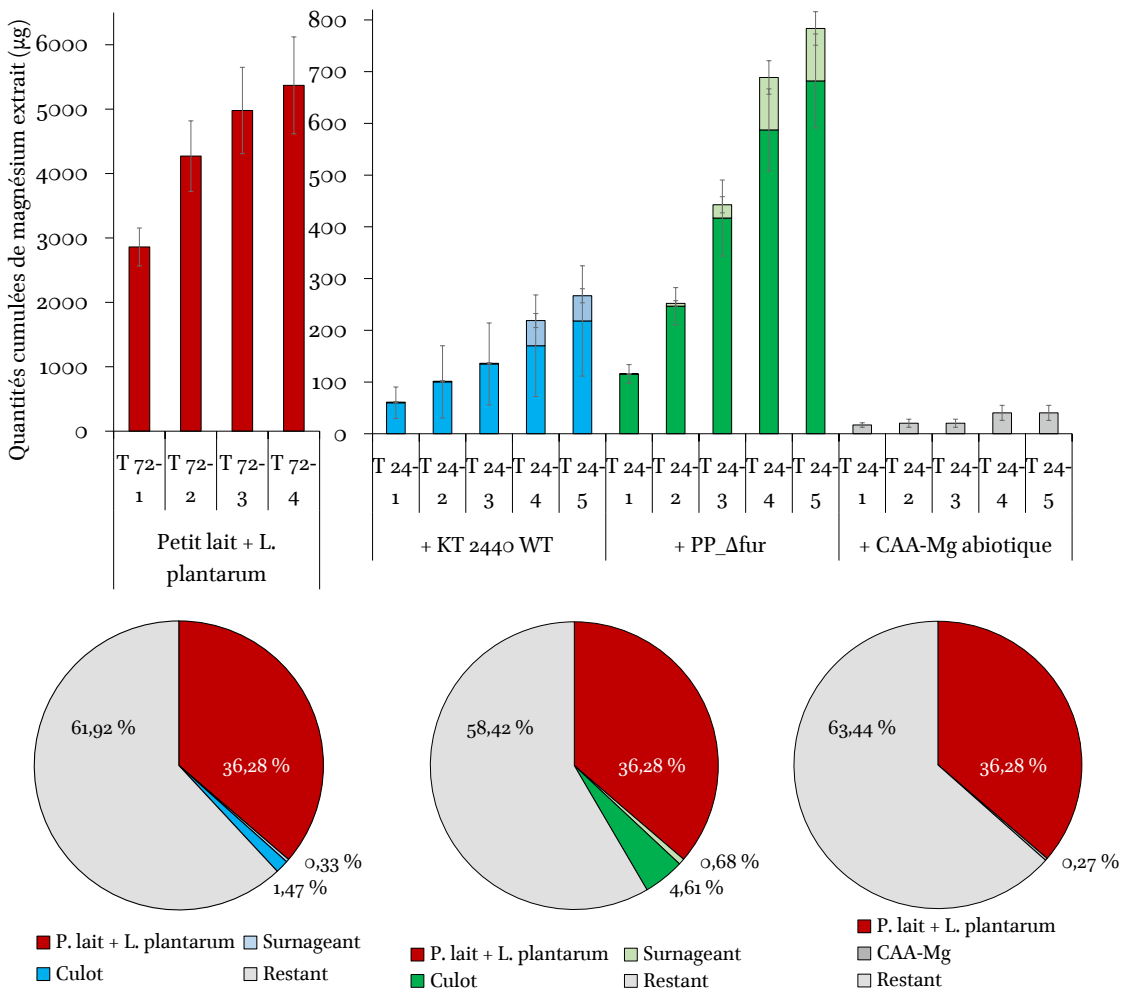


Figure 66 : Quantités cumulées de magnésium et pourcentages correspondants extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. plantarum* (rouge) durant 4 cycles de 72 h puis par KT2440 WT (bleu), PP_Δ*fur* (vert) et le milieu CAA-Mg abiotique (gris foncé) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. Les quantités restantes dans les déchets sont représentées en gris clair. n = 3

La **Figure 67** présente la dissolution du fer en présence de petit lait + *L. plantarum*, qui est importante lors du 1er cycle (266 µg) puis diminue pour atteindre 24,7 µg au cycle 4. Le prétraitement permet d'extraire presque la moitié du fer contenu dans le CHR-Gy soit 440 µg. Lorsque les fibres sont incubées avec les souches de *Pseudomonas*, le fer extrait est à nouveau retrouvé majoritairement dans les culots bactériens. La dissolution induite par KT2440 WT est très variable d'un cycle à l'autre mais les plus importantes ont lieu lors du 1er et du 3ème cycle (12 et 11,6 µg

respectivement), ce qui ne coïncide pas avec la dissolution importante du magnésium observée plutôt lors du 4ème cycle. L'extraction devient presque nulle lors du dernier cycle, qu'importe la souche utilisée. La limite d'extraction n'est toujours pas atteinte mais la dissolution du fer semble s'épuiser à partir du cycle 4. La souche PP_*Δfur* permet de dissoudre des quantités importantes, mais similaires à Kt2440 WT de fer lors du cycle 1 (12,6 µg). L'extraction diminue ensuite lors du cycle 2 (9 µg) avant d'augmenter progressivement jusqu'au cycle 4 (16 µg). Au total PP_*Δfur* a permis d'extraire 55,5 µg de fer, ce qui représente 6 % du fer total contenu dans le CHR-Gy, contre 39,2 µg de fer pour KT2440 WT.

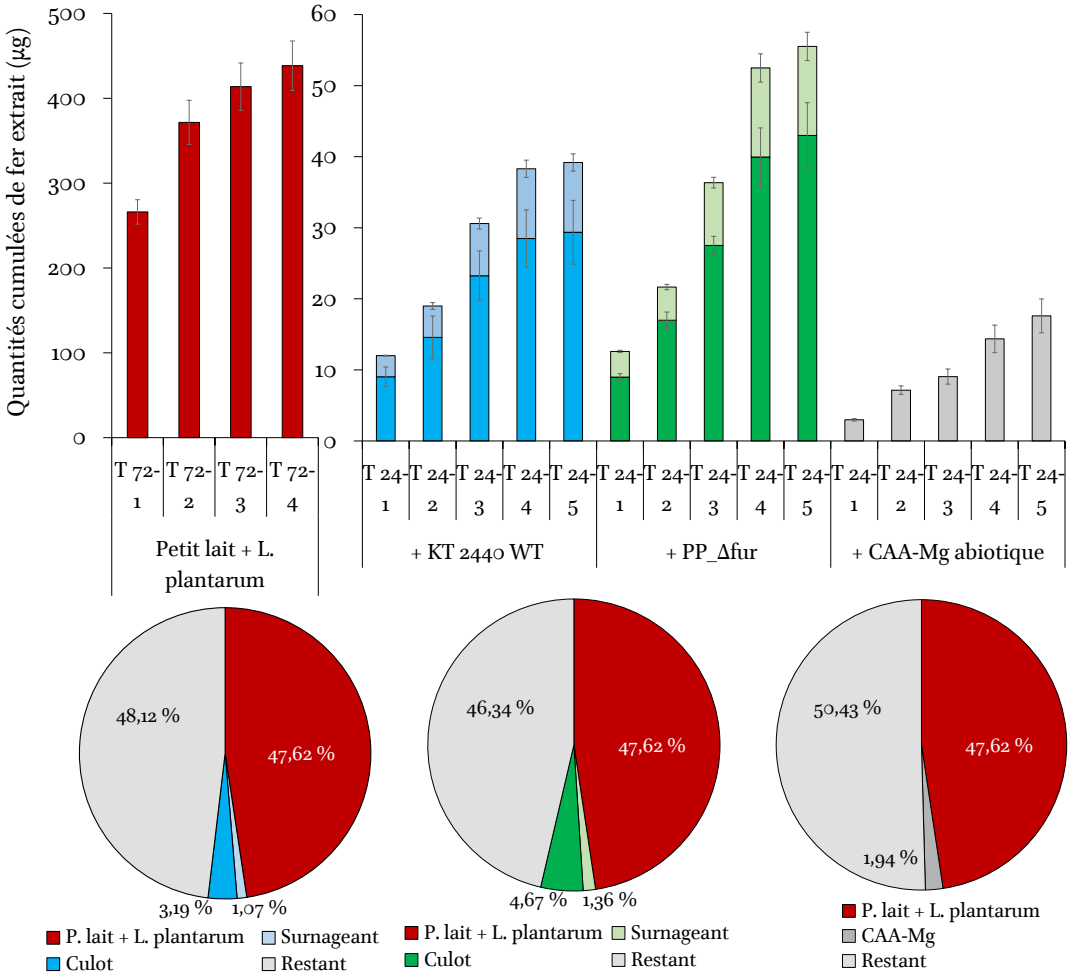


Figure 67 : Quantités cumulées de fer et pourcentages correspondants extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. plantarum* (rouge) durant 4 cycles de 72 h puis par KT2440 WT (bleu), PP_*Δfur* (vert) et le milieu CAA-Mg abiotique (gris foncé) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. Les quantités restantes dans les déchets sont représentées en gris clair. n = 3

L'altération a été suivie par les mesures de fer et de magnésium dissous dans les surnageants et dans les micro-organismes, représentant les marqueurs de l'altération des déchets. Ces mesures ont permis d'évaluer la dégradation rapidement afin de réajuster le procédé et en toute autonomie. Néanmoins, il est important de vérifier par microscopie électronique à transmission (MET) si la quantité ainsi que la répartition des éléments au sein des fibres a été modifiée selon les différents traitements appliqués. La **Figure 68** présentent les clichés des fibres traitées ou non. Les fibres altérées par les *Pseudomonas* semblent moins régulières que les fibres n'ayant connu que le traitement primaire acide en milieu petit lait ensemencé par *L. plantarum*. En effet, les fibres des images **B** et **C** présentent des contours qui ne sont plus longilignes mais plutôt crantés. Afin de déterminer le pourcentage massique de chaque composant, nous avons réalisé des analyses par microscopie électronique à transmission avec analyse chimique élémentaire (MET-EDS) de la composition des déchets traités, en comparaison avec l'échantillon non traité présenté dans le paragraphe caractérisations préliminaires.

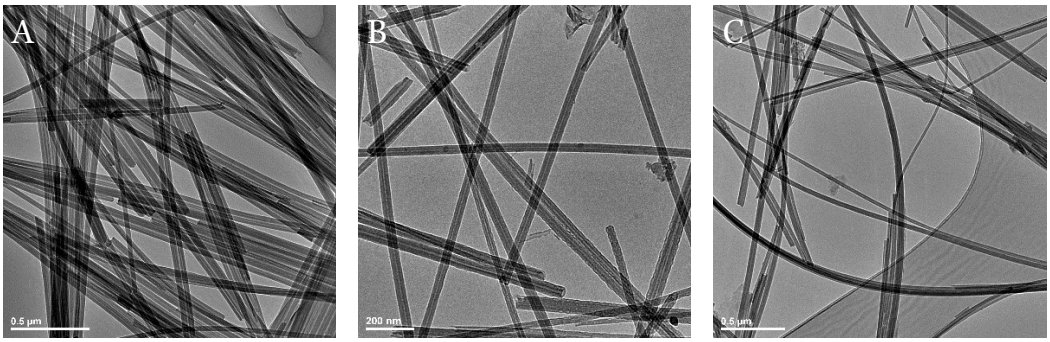


Figure 68 : Déchets de CHR-Gy altérés par du petit lait ensemencé par *L. plantarum* durant 4 cycles de 72 h puis par du milieu CAA-Mg abiotique (A), par KT2440 WT (B) ou par PP_Δ*fur* (C) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg observés par MET. Ces échantillons ont été utilisés pour réaliser des analyses par MET-EDS de la composition des déchets après altération.

Afin de quantifier les quantités de fer et de magnésium restant dans les différents échantillons de CHR-Gy traités par du petit lait + *L. plantarum* suivi ou non d'une altération bactérienne, le pourcentage massique de chaque élément est rapporté au pourcentage massique de silice, le principal constituant des fibres du déchet. Ces résultats d'altération sont comparés avec un échantillon CHR-Gy brut, non altéré et sont présentés en **Figure 69.**

Dans l'échantillon de CHR-Gy non altéré, le ratio Mg/Si est largement supérieur au ratio Fe/Si (1,77 et 0,15 respectivement), illustrant le peu de fer contenu dans ces déchets, malgré la haute toxicité qu'ils représentent. Le ratio Mg/Si obtenu pour le traitement combinant l'altération primaire suivie de KT2440 WT est semblable au ratio Mg/Si non altéré alors que plus d'un tiers du magnésium a été dissout. La même tendance avait été observée dans les études concernant *P. aeruginosa* (David, 2019). Les fibres étant des silicates magnésiens très riches en magnésium, ces résultats tendent à montrer que la quantité de Mg extraite reste insuffisante comparé à la richesse en Mg de ces fibres. Le ratio Fe/Si semble quant à lui correct puisqu'il est inférieur de moitié à celui de l'échantillon non altéré, ce qui correspond à l'altération d'environ 50 % calculée précédemment. Les ratios obtenus pour l'altération primaire puis PP_*Δfur* ou du milieu CAA-Mg abiotique sont similaires. PP_*Δfur* présente un ratio Mg/Si de 0,08 et un ratio Fe/Si de 0,07 et le milieu CAA-Mg des ratios de 0,10 et 0,11 respectivement. Les ratios sont dans tous les cas inférieurs à ceux du CHR-Gy non altéré, ce qui confirme que le déchet a bien été altéré grâce à nos traitements. Cependant, la majorité du fer et du magnésium étant dissout par le petit lait + *L. plantarum*, qui est le traitement primaire commun à chacun de nos échantillons, les différences d'altération apportée par la présence des souches de *Pseudomonas* ne sont pas perceptible par des analyses EDS.

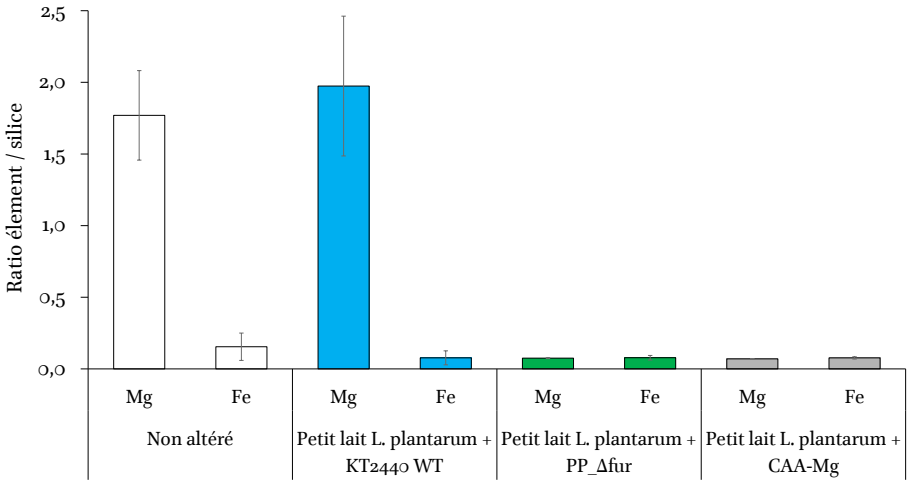


Figure 69 : Ratio magnésium/silice ou fer/silice des déchets de CHR-GY non altéré, présenté dans la partie minéralisation des déchets de flocage (blanc) ou dissous par du petit lait ensemencé par *L. plantarum* durant 4 cycles de 72 h puis par KT2440 (bleu) ou par PP_*Δfur* (vert) en milieu CAA-Mg ou par du milieu CAA-Mg abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h

En conclusion, les souches de *Pseudomonas*, notamment PP_*Δfur*, sont capables d'extraire du fer et du magnésium des déchets de flocage mais si ceux-ci ont déjà été altéré de façon efficace par le milieu petit lait + *L. plantarum*. En effet, le premier traitement permet d'extraire 7,5 fois plus de magnésium et 8,3 fois plus de fer que PP_*Δfur*. L'extraction par ce premier traitement tend à s'épuiser à partir de 4 cycles de 72 h mais l'extraction efficace du 2ème traitement par PP_*Δfur* prouve que ce mutant est capable de réaliser une dissolution plus fine, peut être des couches plus internes, des déchets de CHR-Gy. Les limites d'extraction n'étant pas atteintes, il pourrait être intéressant de réaliser une extraction longue durée comme nous l'avons fait précédemment, avec des cycles d'une semaine afin d'altérer les fibres au maximum, puis de les ensemencer avec PP_*Δfur* afin d'obtenir, à la fin, des fibres dépourvues de toute toxicité liée à la présence de fer.

4.2 Suivi de l'altération en milieu citrate puis par *Pseudomonas putida*

L'objectif du prétraitement en milieu acide est de dissoudre les matrices minérales, de gypse ou de ciment, servant de liant aux fibres d'amiantes dans les produits amiantés tel que les fibrociments ou les déchets de flocage. Les fibres ainsi libérées pourront être dégradées par les *Pseudomonans* producteurs de sidérophores. Le prétraitement en présence de petit lait + bactéries lactiques a été décrit dans le paragraphe précédent en tant que milieu acide dont l'acidité a été maintenue tout au long du processus d'altération grâce au métabolisme des bactéries lactiques. Ces dernières libèrent dans le milieu des acides organiques au cours de leur croissance. Cette stratégie a permis de maintenir un pH de 4.5 lors du cycle 1 puis de 3,9 lors des cycles suivants, faisant face à l'augmentation de pH liée à la dissolution de la matrice.

Une deuxième alternative envisagée est un prétraitement en présence d'une solution de citrate. Le pH de la solution de citrate 50 mM est initialement de 2 puis augmente à 4,6 après un premier contact avec les déchets de flocage, correspondant à la solubilisation des matrices minérales de gypse puis diminue et reste stable entre 2,5 et 2,7 sur les autres cycles.

De façon similaire à l'expérience précédente en milieu petit-lait + bactéries lactiques, les deux souches de *Pseudomonas* voient leur croissance stimulée en présence de CHR-Gy sur l'ensemble des cycles (données non présentées). La production de pyoverdine de KT2440 WT est réprimée en

présence de CHR-Gy. De façon surprenante, et pour la première fois, la production de pyoverdine de PP_*Δfur* en présence de CHR-Gy est similaire à celle obtenue en milieu CAA alors que sa croissance est inférieure en absence de déchets amiantés (données non présentées). Le citrate entrainant une déstructuration importante des fibres, le relargage de différents éléments dans le milieu de culture peut, peut-être, avoir un impact sur la production de pyoverdine, indépendamment de la répression par le régulateur Fur.

L'utilisation d'une solution de citrate en remplacement du traitement petit lait + *L. plantarum* permet d'extraire deux fois plus de magnésium, soit 10423 µg au total correspondant à 72 % de la masse totale, comme l'illustre la **Figure** 70. Lors du 1er cycle, le citrate dissout environ 4000 µg de magnésium puis la solubilisation se poursuit progressivement à hauteur environ de 2000 µg à chaque cycle durant l'expérience. Contrairement au petit lait + *L. plantarum*, l'extraction ne semble pas s'épuiser au fil des cycles et pourrait être poursuivie. L'altération de ces fibres a été poursuivie en présence de KT 2440 WT et PP *Δfur* avec le milieu CAA-Mg en témoin abiotique. L'altération en présence des *Pseudomonas* a permis de dissoudre 223 µg de magnésium, soit 1,53 % par KT2440 WT contre 314 µg soit 2,15 % pour PP_*Δfur* après les 5 cycles.

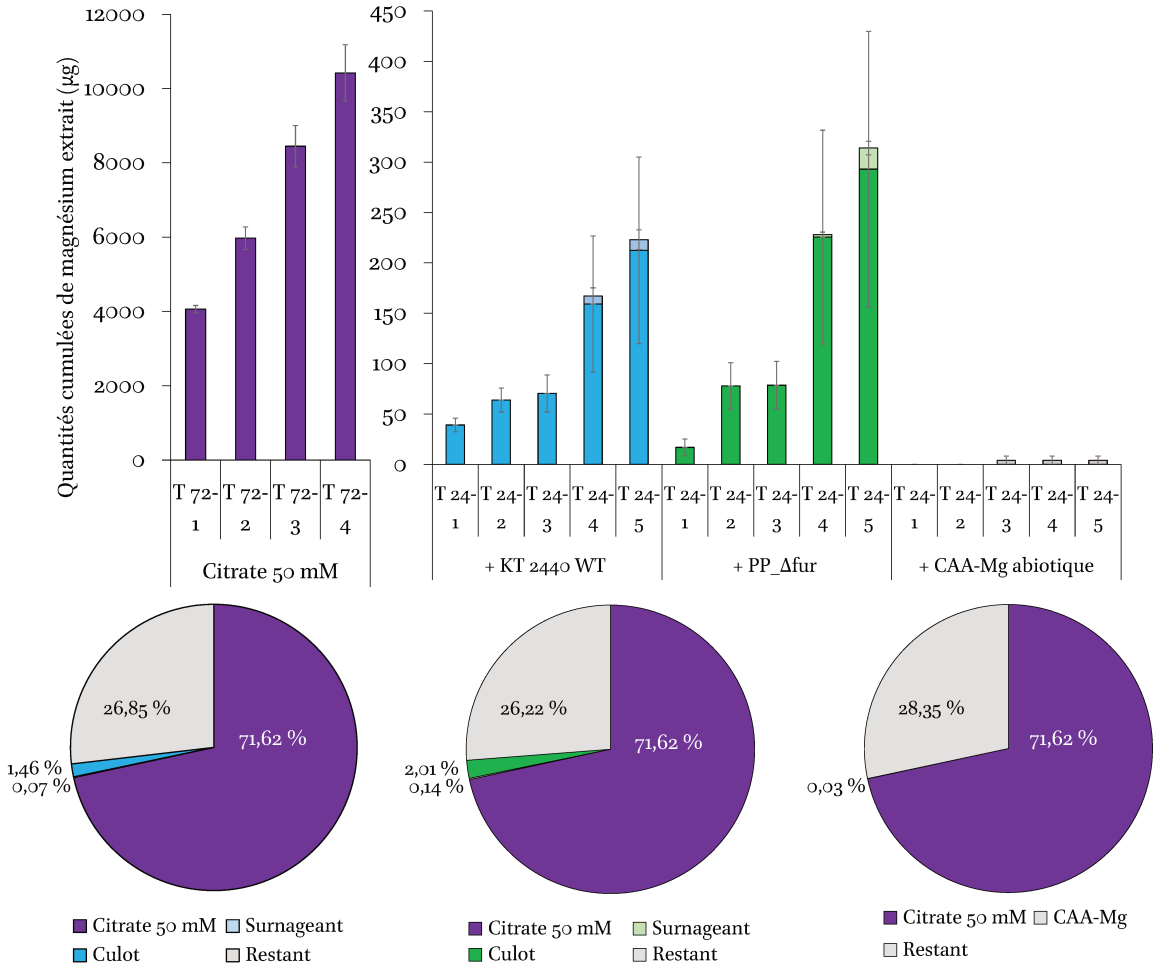


Figure 70 : Quantités cumulées de magnésium et leurs pourcentages correspondants extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le citrate (50 mM) durant 4 cycles de 72 h puis par KT2440 WT (bleu), PP_Δ*fur* (vert) et le milieu CAA-Mg abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. Les quantités restantes dans les déchets sont représentées en gris clair n = 3

La dissolution importante du magnésium par le citrate 50 mM observée précédemment est conjointe à une dissolution efficace du fer des amiantes, représentée en **Figure 71.** En effet, dès le premier cycle le citrate est capable d'extraire 277 µg de fer, quantité similaire à celle obtenue par le traitement petit lait + *L. plantarum* (277 µg). La solubilisation du fer se poursuit au fil des cycles, comme pour le traitement petit lait + *L. plantarum* pour atteindre 569 µg correspondant à près de deux tiers du fer présent dans l'échantillon, quantité légèrement supérieure à celle obtenue en milieu petit lait + *L. plantarum* (440 µg). Même si des quantités importantes de fer ont été extraites par ce premier traitement basé sur l'acidité et la capacité de complexation du citrate, les souches de

Pseudomonas sont toujours capables de se développer et de dissoudre de quantités significatives de fer tout au long des cycles pour satisfaire leurs besoins essentiels en magnésium et en fer, résultats similaires obtenus après le traitement en milieu petit lait + *L. plantarum*. Au total, KT2440 WT a permis de dissoudre 38 µg de fer, soit 4,19 % du total tandis que la souche PP_*Δfur* a dissout 5,2 % du fer des amiantes, soit 47,1 µg au total.

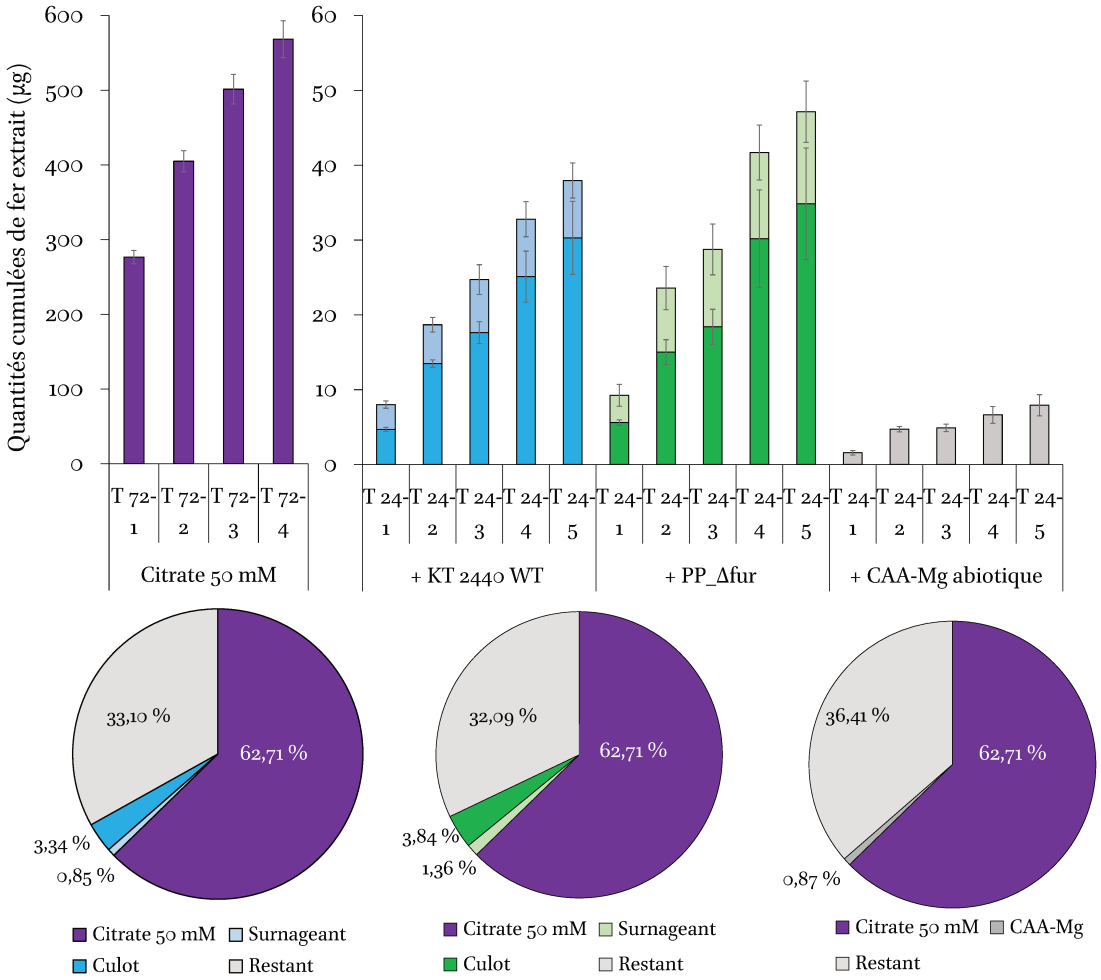


Figure 71 : Quantités cumulées de fer et leurs pourcentages correspondants extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le citrate (50 mM) durant 4 cycles de 72 h puis par KT2440 WT (bleu), PP_*Δfur* (vert) et le milieu CAA-Mg abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

Le traitement des déchets de CHR-Gy par le citrate, connu pour être un excellent chélateur de fer s'est avéré très efficace, pour l'extraction du fer comme du magnésium puisqu'il permet d'extraire plus de magnésium et plus de fer que le traitement petit lait + *L. plantarum* . Malgré des quantités

importantes de nutriments dissout au cours de ce premier traitement, les souches de *Pseudomonas* KT2440 WT et PP_*Δfur* ont tout de même été capables de se développer et d'extraire des quantités significatives de fer et de magnésium. De plus, contrairement au prétraitement précédent, la dissolution par le citrate ne semblait pas s'épuiser à partir du 4ème cycle et pourrait ainsi être prolongée.

4.3 Optimisation de l'altération en milieu petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* ou *L. brevis* puis par PP_Δ*fur*

Le traitement acide en présence de bactéries lactiques a été longuement étudié en présence de *L. plantarum*. Les expériences de croissance en présence d'autres espèces de bactéries lactiques présentées dans le **paragraphe 2.2 du Chapitre 3** nous ont amené à montrer l'efficacité d'altération de deux bactéries lactiques, *L. rhamnosus* et *L. brevis* sur des déchets de flocage. Nous avons cherché à améliorer l'extraction dans le milieu petit lait + *L. plantarum* afin d'atteindre des rendements d'extraction similaires à ceux du citrate 50 mM à minima. Pour cela, nous avons combiné le traitement en milieu petit lait + *L. rhamnosus* ou *L. brevis* et la dégradation en présence de PP_Δ*fur*.

La dissolution du magnésium est 1,4 fois plus importante lorsque le petit lait est ensemencé par *L. rhamnosus* plutôt que par *L. brevis* (**Figures 72** et **73**). Concernant *L. rhamnosus*, l'extraction est très importante lors du 1er cycle (4279 µg) et se poursuit pour extraire 7380 µg au total, soit 49,9 %. Pour *L. brevis*, l'extraction est régulière tout au long des cycles, avec une dissolution d'environ 1000 µg par cycle, sauf lors du 2ème cycle durant lequel elle est deux fois plus importante. L'altération ne semble pas non plus s'essouffler à l'issue du 4ème cycle et la souche a permis d'extraire 35,4 % du magnésium soit 5240 µg. *L. rhamnosus* permet de diminuer le pH de façon plus importante que *L. brevis* lors du 1er cycle (4 et 4,9 respectivement) ainsi que du 2ème (3,6 et 4,1) puis les pH s'équilibrent autour de 3,7 lors des cycles suivants. Au final, la dissolution du magnésium s'avère plus efficace lorsque le petit lait est ensemencé par *L. rhamnosus* par rapport à *L. plantarum* mais ce dernier reste plus efficace que *L. brevis*. Après ces premières altérations du CHR-Gy en milieu acide, le traitement par la souche PP_*Δfur* a montré que le mutant est toujours capable de se développer en contact des fibres, de façon équivalente que ce soit avec le prétraitement réalisé avec *L. rhamnosus* ou *L. brevis*.

Cependant, lors de cette expérience, une contamination du milieu CAA-Mg + CHR-Gy + PP_*Δfur* par KT2440 WT a eu lieu à partir du 3ème cycle d'altération, conduisant à une diminution de la production de pyoverdine. Nous avons tout de même poursuivi l'expérience à son terme afin de voir si, malgré le mélange de souches, l'altération bactérienne était efficace après le prétraitement. La souche maintient une croissance stable tout au long des cycles, malgré la contamination par KT2440 WT et le magnésium et le fer dissout participant à la stimulation de croissance bactérienne sont à nouveau retrouvés majoritairement dans les culots bactériens. PP_*Δfur* permet de dissoudre 649 µg de magnésium soit 4,38 % du total sur les échantillons traités en présence de *L. rhamnosus*.

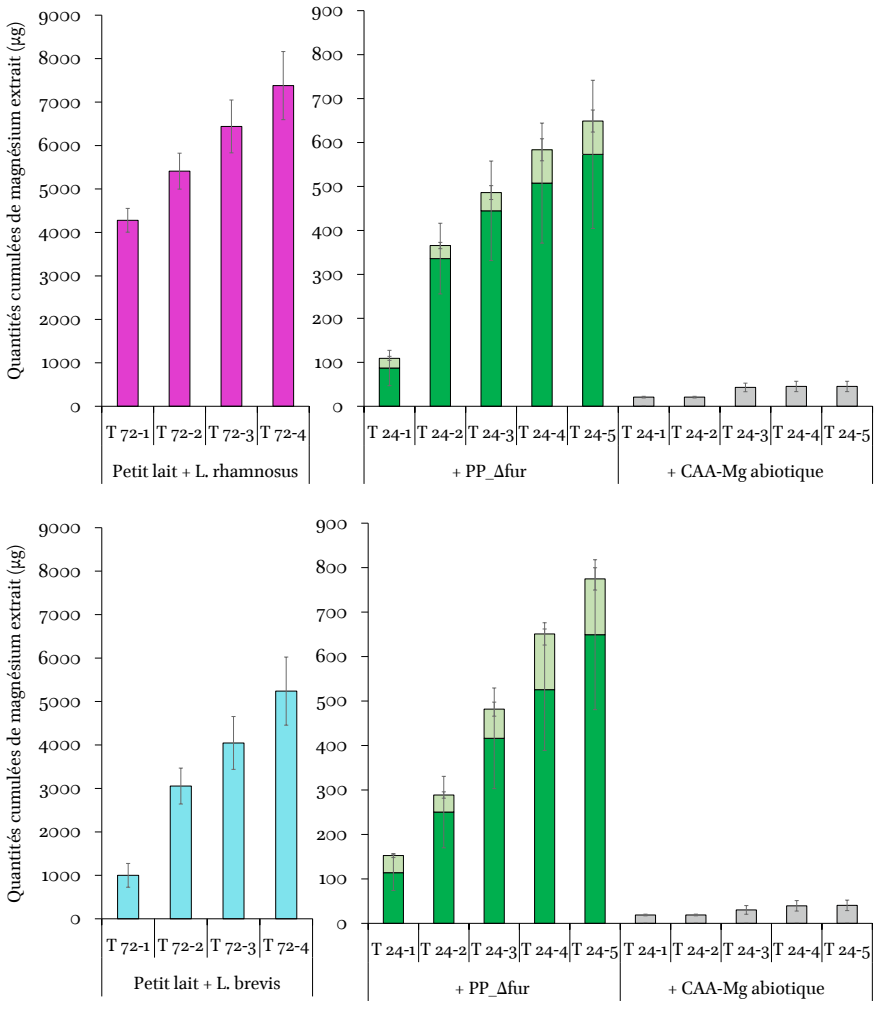


Figure 72 : Quantités cumulées de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) ou *L. brevis* (cyan) durant 4 cycles de 72 h puis par PP_*Δfur* (vert) ou le témoin abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé. n = 3

Lorsque PP_*Δfur* est inoculée après un traitement par *L. brevis*, l'extraction du magnésium est plus importante puisque la souche extrait 774 µg de magnésium, soit 5,23 %. Cette extraction est plus constante au fil des cycles puisqu'elle varie entre 124 et 193 µg sans pic d'extraction comme précédemment. Le prétraitement en milieu petit lait + *L. brevis* ayant permis de dissoudre moins de magnésium (5240 µg) que celui en présence de *L. rhamnosus* (*7380 µg*), le magnésium présente au niveau de la couche de brucite composant les couches les plus externes des fibres est plus facilement accessible pour les bactéries.

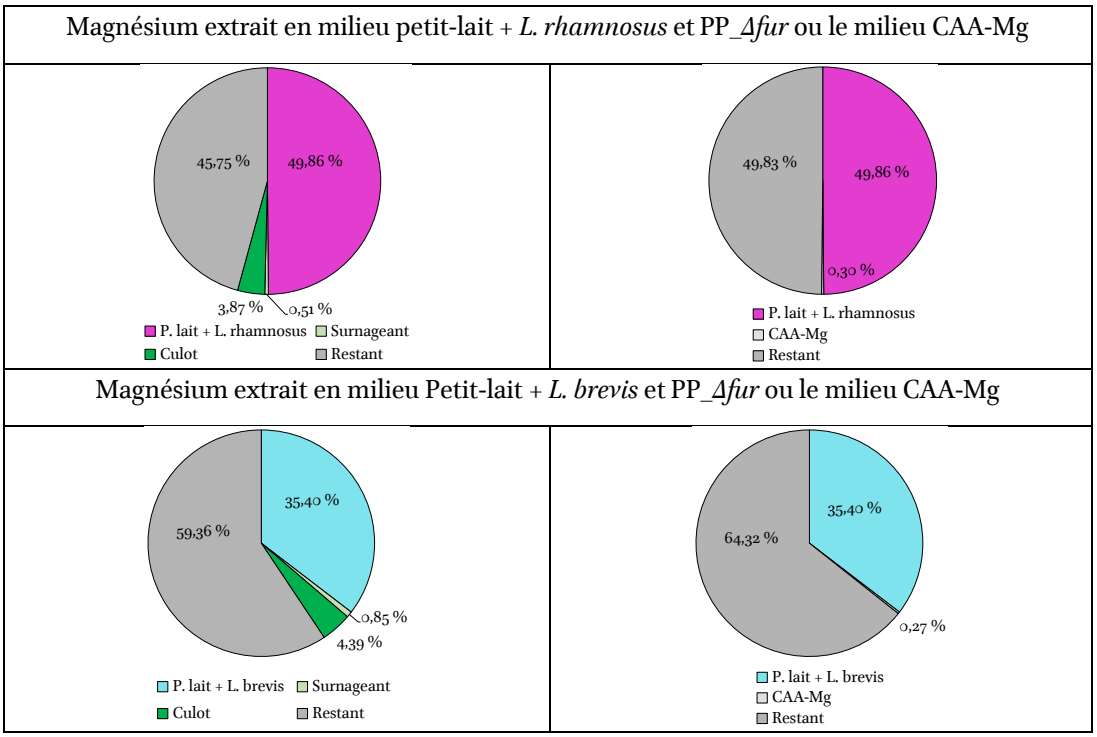


Figure 73 : Pourcentage de magnésium extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) ou *L. brevis* (cyan) durant 4 cycles de 72 h puis par PP_*Δfur* (vert) ou le milieu CAA-Mg abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg.

Les **Figure 74** et **76** montrent que la dissolution du fer est, comme pour le magnésium, à nouveau plus importante en présence de *L. rhamnosus*. En effet, l'utilisation de cette souche conduisant à une dissolution plus efficace du magnésium, les fibres amiantées sont ainsi plus déstructurées, entrainant par conséquence une meilleure libération de fer. Comme pour le magnésium, la libération de fer en présence de *L. rhamnosus* est plus importante lors du 1er cycle (262 µg) puis

diminue au fil des cycles jusqu'à environ 30 µg. Au total la souche *L. rhamnosus* a permis d'extraire 408 µg de fer, soit 44,4 % du fer total. Lorsque la souche PP_*Δfur* est ensemencée après le traitement en milieu petit lait + *L. rhamnosus*, le mutant permet d'extraire 4,96 % du fer, soit 45,7 µg. L'extraction semble être relativement stable sur l'ensemble des 5 cycles. Lorsque le milieu petit lait est ensemencé par *L brevis* (**Figures 75** et **76**), l'extraction du fer est moins importante puisque la souche permet de dissoudre 335,6 µg, soit 36,5 % du fer total. De façon comparable au magnésium, l'extraction du fer est relativement faible au fil des cycles sauf lors du 2ème où le double de fer est extrait (152 µg). Après l'altération du CHR-Gy par *L. brevis*, PP_*Δfur* est capable de dissoudre 56 µg de fer, soit plus de 6 % du fer total. La dissolution la plus faible à lieu durant le 1er cycle (9 µg) puis elle augmente progressivement jusqu'à 12 µg et reste constante jusqu'au dernier cycle. Au final, la dissolution du fer par le petit lait + *L. plantarum* s'avère tout de même plus efficace que celle induite par le petit lait + *L. rhamnosus* ou *L. brevis*. Cependant, *L. rhamnosus* permettant de libérer des quantités de magnésium supérieures à *L. plantarum*, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une multiplication des cycles permettrait d'améliorer la libération du fer par déstructuration des fibres.

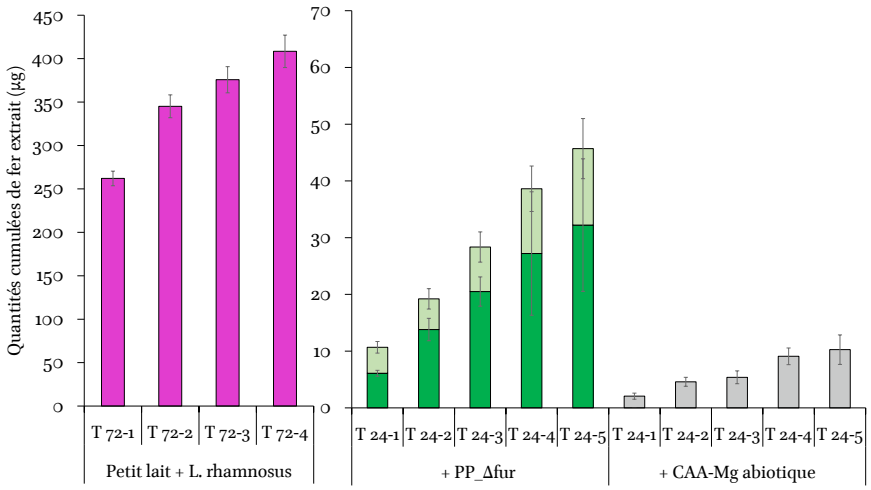


Figure 74 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) durant 4 cycles de 72 h puis par PP_*Δfur* (vert) ou le témoin abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé

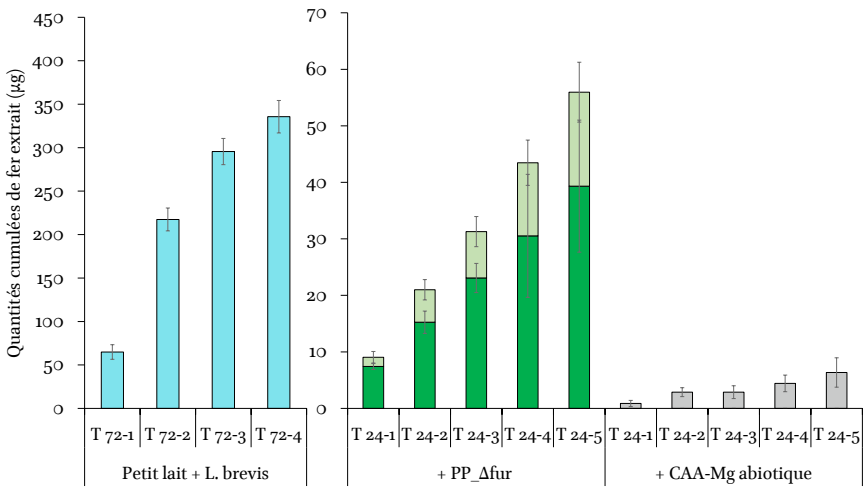


Figure 75 : Quantités cumulées de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. brevis* (cyan) durant 4 cycles de 72 h puis par PP_Δ*fur* (vert) ou le témoin abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg. Les quantités dosées dans le surnageant bactérien sont représentées en clair et celles dosées dans le culot bactérien sont en foncé

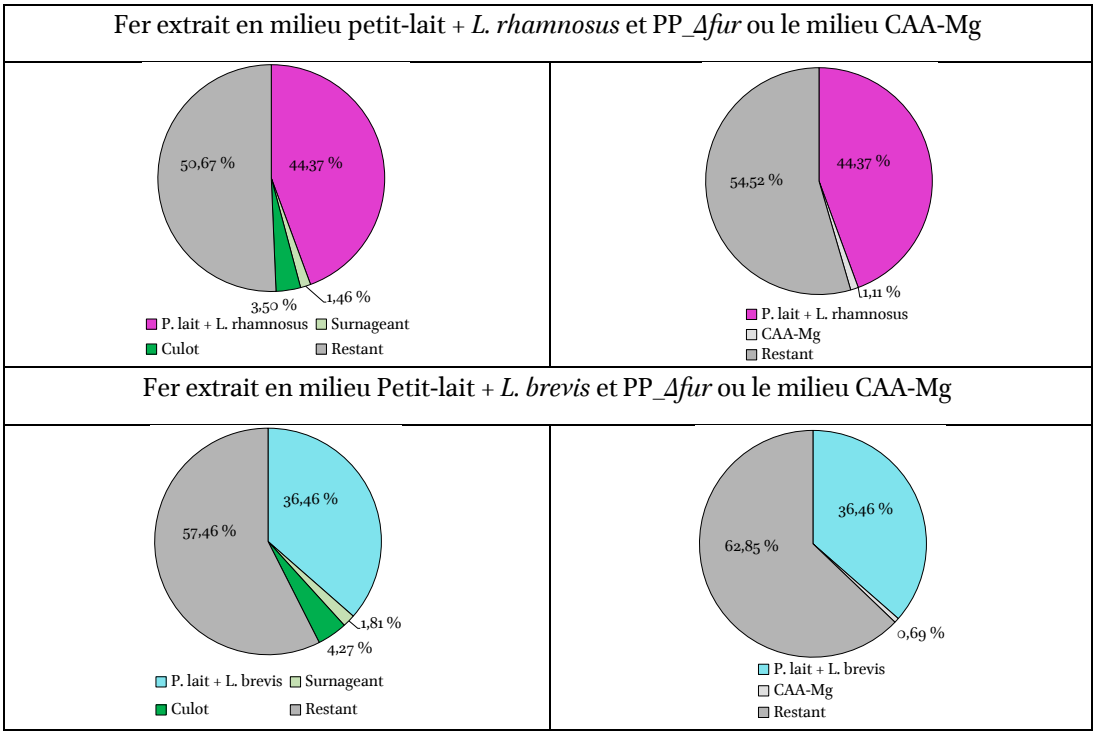


Figure 76 : Pourcentage de fer extrait des déchets de flocage (CHR-Gy) par le petit lait ensemencé par *L. rhamnosus* (rose) ou *L. brevis* (cyan) durant 4 cycles de 72 h puis par PP_Δ*fur* (vert) ou le milieu CAA-Mg abiotique (gris) durant 5 cycles de 24 h en milieu CAA-Mg.

En conclusion, l'utilisation du milieu petit lait permet ainsi d'extraire du fer et du magnésium des déchets, toutefois, lorsqu'il est ensemencé avec des bactéries lactiques permettant, par fermentation, de maintenir un pH acide, les extractions de ces deux métaux augmentent de façon significative. En effet, la dissolution de la couche de brucite est optimisée à faible pH et l'extraction optimale est obtenue grâce à l'ensemencement de *L. rhamnosus* permettant d'extraire 9,3 mg de magnésium 6 cycles de 72h. La dissolution de la couche externe de brucite entraine ainsi une déstructuration des fibres d'amiante, libérant ainsi 435 µg de fer.

De plus, l'utilisation combinée d'une altération des fibres en milieu acide suivie d'une altération par la souche PP_Δ*fur* optimisée constitue une stratégie efficace pour l'extraction du fer mais aussi du magnésium des fibres amiantées. En effet, malgré une extraction préliminaire considérable de ces deux éléments importants à la croissance des *Pseudomonas*, les souches sont toujours capables de les extraire des fibres amiantées. Le fer et le magnésium rendu ainsi biodisponibles permettent de stimuler la croissance des souches et n'interfère pas avec la production de pyoverdine du mutant PP_Δ*fur*. L'ajout des souches de *Pseudomonas* permet d'extraire davantage de magnésium, principalement retrouvé dans les culots bactériens. KT2440 WT présente une extraction relativement stable, tandis que PP_Δ*fur* montre une tendance à augmenter progressivement au fil des cycles. L'extraction du fer est quant à elle plus variable d'un cycle à l'autre mais présente une tendance à diminuer au fil des cycles. Cependant, les limites d'extraction ne sont jamais atteintes, mais après ces nombreux cycles de renouvellement. La première étape de traitement permet d'extraire des quantités beaucoup plus élevées de magnésium et de fer que la souche PP_Δ*fur* seule. Cependant, l'extraction par ce traitement tend à s'épuiser après 4 cycles, tandis que l'utilisation du mutant PP_Δ*fur* démontre une capacité à réaliser une dissolution plus fine, peut-être des couches plus internes des déchets de flocage. Il serait intéressant de poursuivre les expériences en réalisant des traitements à plus long terme afin de maximiser l'altération des fibres et d'obtenir, à la fin, des fibres dépourvues de toute toxicité liée à la présence de fer. Les résultats obtenus en utilisation le milieu citrate sont tout aussi intéressant, néanmoins ils conduisent à une déstructuration plus importante des fibres, réduisant ainsi le potentiel de revalorisation. De plus l'utilisation du petit lait fait partie intégrante du cercle vertueux consistant à utiliser des déchets de l'industrie alimentaires, destinés à être éliminés, afin de traiter d'autres déchets destinés à être enfouis.

5 Observations des interactions bactéries / fibres par MET *in situ*

Les études en mode *in-situ* liquide permettent de suivre et d'observer en temps réel à l'échelle de temps (seconde) et de résolution (nanomètre) la dynamique de la matière dans un environnement liquide contrôlé. Contrairement aux études dites *ex-situ* qui permettent uniquement la comparaison entre deux états de la matière (avant et après contrainte), les études *in-situ* donnent accès aux états intermédiaires. La cellule environnementale fermée, présentée en **Figure** 77 a été développée pour permettre ces études *in-situ* liquide.

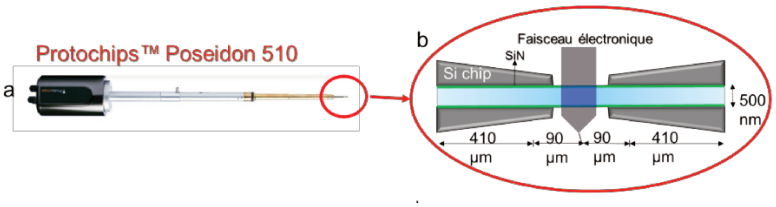


Figure 77 : Représentation du système de porte-objet permettant les expériences en milieu liquide. Système de Protochips Poseidon 510 (**A**) et cellules en Si fermées avec fenêtres Si_3N_4 transparentes aux électrons (**B**).

Le but de ces observations en MET *in-situ* en milieu liquide est d'observer les interactions entre une bactérie vivante et une fibre amiantée. Nous cherchons ainsi à savoir si la bactérie est capable de se fixer directement sur une fibre et si oui, si un site de contact préférentiel existe au sein de la bactérie. Nous souhaitons également savoir s'il existe des différences d'interactions entre la souche KT2440 et la souche PP_Δ*fur*. Ces études n'ayant encore jamais été réalisées sur des fibres amiantées et *Pseudomonas putida*, un grand nombre de paramètres était à déterminer et nous n'avons pu, pour l'instant, réaliser que des manipulations préliminaires.

Dans un premier temps, nous avons pu observer une fibre amiantée issu d'un échantillon de CHR-Gy non altéré et placé dans un milieu liquide CAA-Mg. Cela nous a permis de démontrer que les fibres amiantées étaient observables à travers la cellule environnementale et que le milieu CAA-Mg n'avait pas d'influence sur l'observation.

Ensuite, après avoir observé des cultures bactériennes de KT2440 WT et PP_Δ*fur* de différentes densités cellulaires, nous avons conclu que la culture optimale est une culture en phase exponentielle en milieu CAA-Mg, à environ 10^7 UFC.mL^{-1}. Nous avons ainsi pu observer dans du

milieu CAA-Mg une cellule de KT2440 WT et son flagelle, tous deux intacts, ce qui est un résultat très prometteur pour cette technique en développement.

Compte tenu de la complexité des phénomènes observables, il est important de d'optimiser les paramètres d'observation et de contrôler certains processus tels que la radiolyse et la résolution. Concernant la radiolyse, l'interaction du faisceau électronique avec l'échantillon est un facteur clé et il est nécessaire de bien comprendre les effets du faisceau. Pour nos études, nous avons pris en compte divers effets du faisceau, thermiques et non thermiques. En ce qui concerne le chauffage dû à l'irradiation électronique (les effets thermiques), les diverses études et calculs ont montré qu'il se produisait qu'une faible élévation de température (quelques degrés ou moins) en raison de la bonne conductivité thermique des échantillons de cellules liquides épaisses. Dans notre cas en milieu organique, la température maximale calculée est de 4°C (Schneider *et al.*, 2014). Cependant, les effets non thermiques sont plus importants et plus complexes dans notre système. Les électrons de haute énergie dans l'eau produisent des espèces telles que les radicaux OH et les électrons hydratés par exemple, pouvant jouer un rôle clé dans le processus de germination de nanoparticules. Ainsi, des expériences dans différentes conditions de tension d'accélération ou d'intensité de faisceau sont nécessaires pour évaluer l'effet du faisceau sur tout phénomène en phase liquide étudié. Il nous a alors fallu réduire drastiquement la quantité d'électrons envoyée et nous avons ainsi perdu en qualité d'image, notamment pour la souche PP_Δ*fur*.

Toutefois, lorsque PP_Δ*fur* se trouve exposée aux électrons, même si ceux si sont peu nombreux, la cellule ne résiste pas et lyse dans les secondes qui suivent, rendant impossible la prise d'images exploitables. Ainsi, dans les études à venir, il faudra alors adapter la préparation pour être dans les meilleures conditions permettant d'obtenir la meilleure résolution possible tout en minimisant les phénomènes de radiolyse.

6 Matériel et Méthodes

6.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont référencées dans le **Tableau 2** du **Matériel et Méthodes** du **Chapitre 2.**

6.2 Milieux de culture et réactifs

Tous les milieux, sauf les milieux LB et MRS sont préparés dans des bouteilles en plastiques préalablement rincées avec de l'HCl 1 N afin d'éliminer toute trace de métaux résiduels puis rincés une dizaine de fois avec de l'eau distillée. Ils sont ensuite stérilisés par filtration (0,22 µM) et stockés stérilement dans les bouteilles acidifiées et autoclavées.

Le milieu petit lait est gracieusement fourni par la coopérative laitière Alsace lait (Hoerdt). Afin de faciliter la stérilisation par filtration finale (0,22 µM), il subit différentes filtrations : trois filtrations sur deux membranes de papier Whatman suivies d'une filtration sur membrane de nitrate de cellulose

6.3 Sécurité des manipulations

Toutes les expériences impliquant la manipulation d'amiante ont été menées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II en milieu liquide afin d'éviter toutes inhalation de fibres. Le manipulateur porte un masque FFP3, des gants et les manipulations se déroulent dans un local dédié. La gestion des déchets solides et liquides a été respectée selon les normes en vigueur pour les déchets amiantés.

6.4 Préparation des déchets amiantés

6.4.1 Origine des déchets amiantés

Les déchets de flocage utilisés contiennent du chrysotile et du gypse (CHR-Gy) et sont issus du chantier de désamiantage de l'Université Paris Jussieu et ont été fournis par la société SOMEZ.

6.4.2 Stérilisation des déchets de flocage

Avant utilisation, les déchets sont aliquotés puis autoclavés deux fois avant d'être séchés au four à 70 °C durant 2 semaines minimum. Les aliquots sont ensuite divisés en échantillons de 0,2 g qui sont ensuite lavés dans 20 ml de milieu CAA-Mg dans des tubes FALCON™ (50 ml) afin d'enlever les

poussières des déchets et le fer ou le magnésium facilement solubilisables. Les tubes sont vortexés une dizaine de seconde puis centrifugés à 9871 x g durant 30 min puis le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre Millex 0,22 µM. Le fer et le magnésium sont ensuite dosés dans le surnageant filtré.

6.4.3 Minéralisation des déchets de flocage

Afin de calculer la quantité de fer et de magnésium initialement présent dans les déchets de flocage, 5 échantillons de 0,2 g ont été minéralisés par le Dr. Sébastien David dans 10 mL d'acide nitrique 4 N par tube. Après 8 jours d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 10 min à 9871 g puis le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre Millex 0,22 µM. Le fer et le magnésium sont ensuite dosés dans le surnageant filtré.

6.5 Dosages colorimétriques

6.5.1 Dosage du fer

Le fer est dosé dans le surnageant de culture ou le culot bactérien après que ce dernier ait été minéralisé puis filtré. Ainsi, 20 µL d'échantillon sont disposés dans les puits d'une microplaque 96 puits à fond plat (3 réplicats techniques sont réalisés par échantillon). 40 µL d'acétate de sodium saturé à 5,5 M (Sigma-Aldrich™) sont ajoutés avant de placer la microplaque sur un bain de glace. 80 µL d'H_2O purifiée (FranceEau), 10 µL d'acide thioglycolique dilué 10 fois dans de l'H_2O purifiée (FranceEau) et 10 µL de bathophénanthroline à 0,5 (w/v) dans de l'H_2O purifiée (FranceEau) sont additionnés avant d'homogénéiser par aspiration / refoulement. La plaque est alors incubée à + 4 °C durant une nuit à l'abri de la lumière puis la lecture de la DO_{535nm} est réalisée au lecteur de microplaque (TECAN™).

6.5.2 Dosage du magnésium

Le magnésium est dosé dans le surnageant de culture ou le culot bactérien après que ce dernier ait été minéralisé puis filtré. Ainsi, 3 µL d'échantillons sont disposés dans les puits d'une microplaque 96 puits à fond plat (3 réplicats techniques sont réalisés par échantillon). On ajoute alors 300 µL d'un

mix contenant 1 volume de réactif 1 pour 1 volume de réactif 2 (Réactif 1 : 1 mol.L^{-1} 2-methyl-2-Amino-1-Propanol + 250 µmol. L^{-1} EGTA / Réactif 2 : 300 µmol. L^{-1} calmagite). On homogénéise par aspiration / refoulement avant de laisser reposer 30 sec à température ambiante et de lire la DO_{500nm} au lecteur de microplaque (TECAN™).

6.6 Dépendance des souches de *Pseudomonas* au magnésium

L'objectif est de déterminer la dépendance des bactéries au magnésium en effectuant des courbes de croissance des souches de *Pseudomonas* dans un milieu de culture contenant des concentrations croissantes en magnésium. Les bactéries sont décongelées dans 5 mL de milieu LB ou CAA + 50 nM de $FeCl_3$ pour PP_Δ*fur* à 30 °C dans un tube FALCON™ 50 mL. Après 24 h d'incubation à 30°C sous agitation (220 rpm), les cultures sont centrifugées 5 min à 9871 x g puis les culots bactériens sont lavées 2 fois dans 10 mL de milieu CAA-Mg. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL du même milieu et 100 µL sont inoculés dans un tube FALCON™ contenant 10 mL d CAA-Mg stérile et incubés durant 24 h à 30°C sous agitation (220 rpm). Les culots sont ensuite lavés avec 10 mL de CAA-Mg et l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm}) est ajustée à 0,1, soit 10^8 UFC.mL^{-1}. Les suspensions sont ensuite distribuées dans une plaque 96 puits à fond rond avec différentes concentrations de magnésium selon le **Tableau 4.** La plaque est incubée dans un lecteur de microplaque (TECAN™) et un suivi de la croissance bactérienne (DO_{600nm}) est effectué automatiquement toutes les 30 min.

Tableau 4 : Gamme de $MgSO_4$ utilisée pour étudier la dépendance des souches de *Pseudomonas* au magnésium

$[MgSO_4, 7H_2O]_{finale}$ (mg/L)	0	0,005	0,05	0,5	1	2	5	20
$MgSO_4, 7H_2O$ (µL)	0	Solution mère 0,1 mg/L 10	Solution mère 1 mg/L 10	Solution mère 10 mg/L 10	Solution mère 10 mg/L 20	Solution mère 10 mg/L 40	Solution mère 100 mg/L 10	Solution mère 100 mg/L 40
CAA-Mg (µL)	180	170	170	170	160	140	170	140
Culture DO=0,1 (µL)	20							
V_{total} (µL)	200							

6.7 Croissance des bactéries lactiques en milieu petit lait

L'utilisation des bactéries lactiques dans le petit lait additionné de déchets amiantés a comme objectif la dégradation de la matrice des déchets amiantés tout en permettant l'acidification du milieu ou le maintien du pH acide. Il est donc nécessaire de déterminer la croissance des bactéries lactiques testées.

A partir de la souche congelée, les bactéries sont cultivées dans 5 ml de milieu MRS (Composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 10 g peptone ; 10 g extrait de viande ; 5 g extrait de levure ; 20 g glucose ; 5 g acétate de sodium ; 2 g citrate d'ammonium ; 1,08 g polysorbate 80 ; 0,2 g sulfate de magnésium ; 0,05 g sulfate de manganèse ; 2 g phosphate disodique) durant 24 h à 30°C sans agitation. Après incubation, 100 µl de la culture sont ensuite transférées dans 10 ml de milieu MRS pour une durée 48 h à 30°C sans agitation. La culture est centrifugée à 9871 x g pendant dix minutes afin d'éliminer le milieu MRS. Le surnageant est éliminé et 20 mL de petit lait sont ajoutés, les tubes sont ensuite agités. La centrifugation est répétée selon les mêmes paramètres et le culot est remis en suspension dans le même volume de petit lait à deux reprises. Enfin, le culot lavé est remis en suspension dans 5 mL de petit lait puis la quantité de bactérie est estimée par lecture de la (DO_{600nm}). Cette étape de lavage est indispensable afin d'éliminer l'intégralité des nutriments et déchets apportés par le milieu MRS et la culture. Dans le cas contraire, les nutriments restant dans le culot pourraient influencer les résultats obtenus pour les croissances réalisées dans le petit lait. La croissance est mesurée dans 18 ml de milieu petit-lait que l'on inocule avec 2 ml de la suspension bactérienne en milieu petit-lait ajustée à une DO_{600nm} = 1. La croissance des bactéries lactiques est suivie à l'aide d'une lecture de (DO_{600nm}) toutes les trois heures durant 72 heures.

6.8 Altération des déchets de flocage

6.8.1 Cycles d'altération des déchets de flocage en présence des *Pseudomonas*

L'objectif est d'effectuer des cycles d'altération des déchets de flocage (CHR-Gy) en présence de différentes souches de *Pseudomonas putida* afin d'extraire le fer et le magnésium des fibres. Avant d'inoculer les cultures avec les déchets amiantés, les bactéries sont précultivées dans les conditions habituelles. Les bactéries sont décongelées dans 5 mL de milieu LB ou CAA + 50 nM de $FeCl_3$ pour

PP_Δ*fur* à 30 °C dans un tube FALCON™ 50 mL sous agitation (220 rpm). Après ces 24 h d'incubation, les cultures sont centrifugées 5 min à 9871 x g puis les culots bactériens sont lavées 2 fois dans 10 mL de milieu CAA-Mg. Le culot est ensuite remis en suspension dans 8 mL du même milieu et 4 x 2 mL sont prélevés et ajoutés dans 4 x 20 mL de CAA-Mg stérile puis les tubes FALCON™ 50 mL sont pré-cultivés durant 24 h à 30°C sous agitation (220 rpm). Les culots sont ensuite lavés avec 10 mL de CAA et l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm}) est ajustée à 0,1, soit 10^8 UFC/mL. Les cultures sont ensuite diluées en cascade afin d'obtenir une densité bactérienne de 10^5 UFC.mL^{-1} et les cultures d'altération sont ensemencées de la façon suivante et incubés durant 24 h à 30 °C :

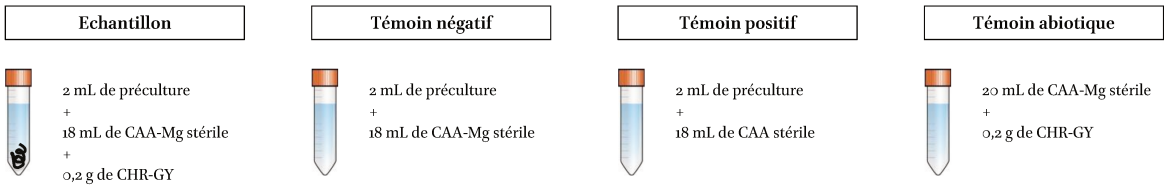


Figure 78 : Cultures d'altération de déchets de flocage (CHR-Gy) par les *Pseudomonas* et témoins correspondants

A chaque cycle de 24 h, les milieux des différents tubes sont renouvelés comme illustré en **Figures 81, 82** et **83,** de façon à doser le fer et le magnésium extraits de fibres, quantifier la production de pyoverdine dans les surnageants et estimer la croissance bactérienne. Les dilutions des cultures et l'ajout de milieu stérile permettent de diminuer la densité bactérienne afin de recommencer un nouveau cycle de 24 h avec des cellules (10^5 UFC.mL^{-1}) dans des conditions physiologiques optimales.

Les dénombrements sont réalisés par méthode des gouttes, les cultures sont diluées en cascade jusqu'à la densité cellulaire souhaitée afin d'obtenir entre 1 et 100 colonies comptables par goutte après incubation. 6 gouttes de 20 µL de 4 dilutions d'intérêt sont déposées sur des boites de milieu LB ou CAA. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C environ 24 h. Les colonies sont ensuite comptées manuellement au sein de chaque goutte puis moyennées pour l'ensemble de 6 gouttes. Le calcul du nombre d'unité formant colonie (UFC) est réalisé en prenant en compte les dilutions successives dont les colonies sont isolées les unes des autres et donc comptables.

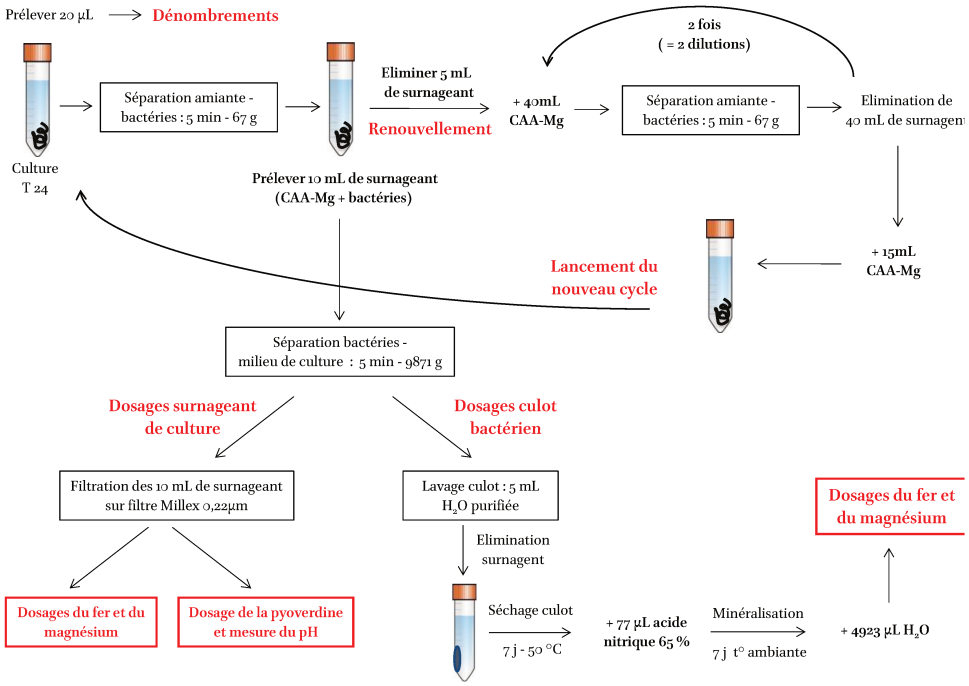


Figure 79 : Organigramme des cycles de renouvellement des cultures d'altération des déchets de flocage (CHR-Gy) par les souches de *Pseudomonas*

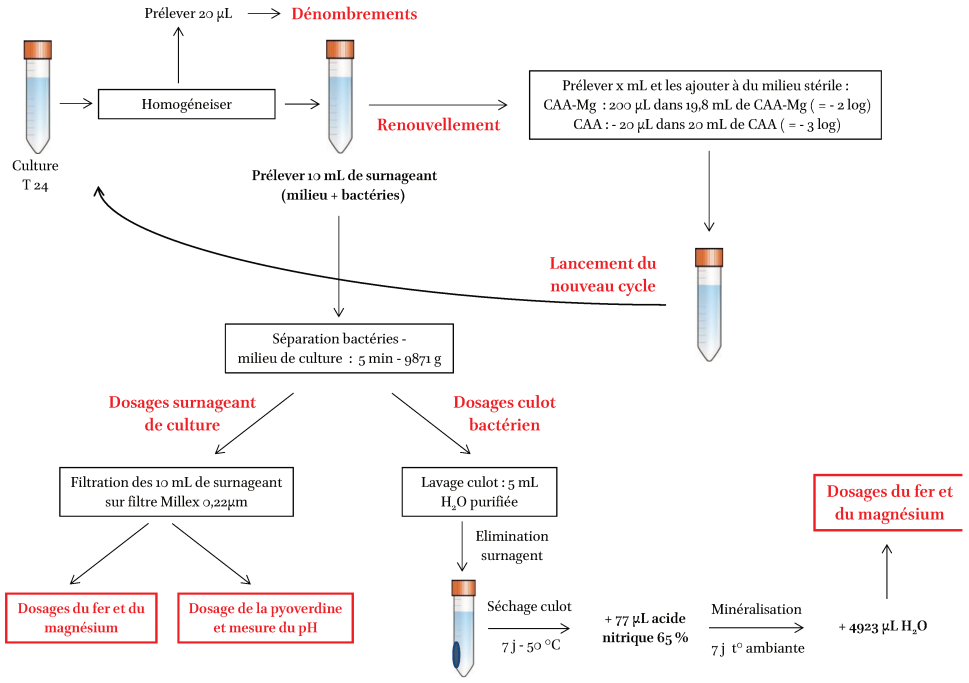


Figure 80 : Organigramme des cycles de renouvellement des cultures de *Pseudomonas* constituants les témoins positifs et négatifs

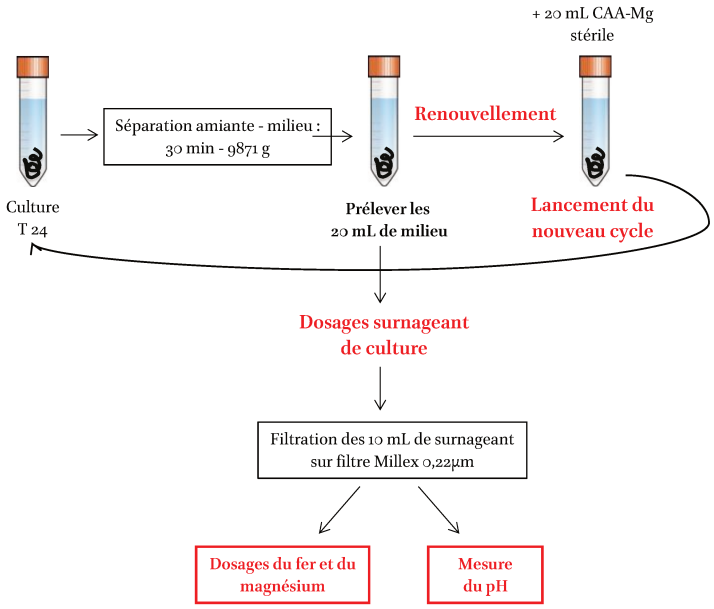


Figure 81 : Organigramme des cycles de renouvellement d'altération des déchets de flocage (CHR-Gy) par le milieu CAA-Mg abiotique

Lorsque l'altération est réalisée en milieu MM Citrate-Mg (Composition pour 1 L d'eau purifiée (FranceEau) : 7,43 g $K_2HPO_4.3H_2O$; 3 g $KH_2PO_4.6H_2O$ 3 ; 1 g $(NH_4)_2SO_4$ 1) ; 50 mM citrate ; pH : 7,5), le protocole est strictement identique, seule la composition du milieu change par rapport à l'altération en milieu CAA-Mg.

6.8.2 Cycles de dissolution de la matrice des déchets de flocage en milieux acides

L'objectif de ces cycles d'altération est de comparer la dissolution des déchets de flocage par une solution de citrate 50 mM (Composition pour 1 L d'eau purifiée (FranceEau) : 9,61 g citrate (Sigma-Aldrich™) ; pH : 2,3) ou du petit lait ensemencé ou non par des bactéries lactiques. L'altération a été réalisée sur une longue durée, c'est-à-dire 6 cycles de 168 h (soit 6 x 1 semaine) pour les conditions citrate 50 mM, petit lait et petit lait ensemencé par *L. plantarum*, mais également sur une durée plus courte, soit 4 cycles de 72 h pour le milieu petit lait ensemencé par *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. p. argentoratensis*, *L. brevis* et *L. rhamnosus*.

Avant d'inoculer les cultures avec les déchets amiantés, les bactéries lactiques sont décongelées dans 2 x 5 mL de milieu MRS à 30 °C dans un tube FALCON™ 50 mL. Après une durée d'incubation minimale de 24 h, les cultures sont centrifugées 5 min à 9871 x g puis les culots bactériens sont lavées

2 fois dans 10 mL de milieu petit lait. Le culot est ensuite remis en suspension dans 5 mL du même milieu et l'absorbance à 600 nm (DO_{600nm}) est ajustée à 1, soit 10^9 UFC/mL. Les essais sont ensemencés de la façon suivante et incubés durant 72 ou 168 h à 30 °C (200 rpm) :

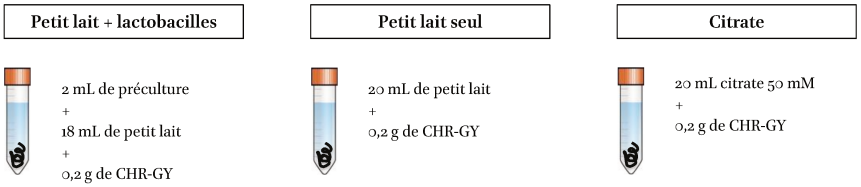


Figure 82 : Cultures d'altération de déchets de flocage (CHR-Gy) par les bactéries lactiques et témoins correspondants

Après chaque cycle de 72 ou 168 h, les milieux sont renouvelés comme illustré en **Figures 85** et 86, de façon à doser le fer et le magnésium extraits de fibres. Dans le cas des dissolutions dites de court terme, les dilutions des milieux et l'ajout de milieu stérile permettent de diminuer les quantités de fer et de magnésium résiduels dans le milieu, susceptibles de saturer le milieu pour les cycles suivants.

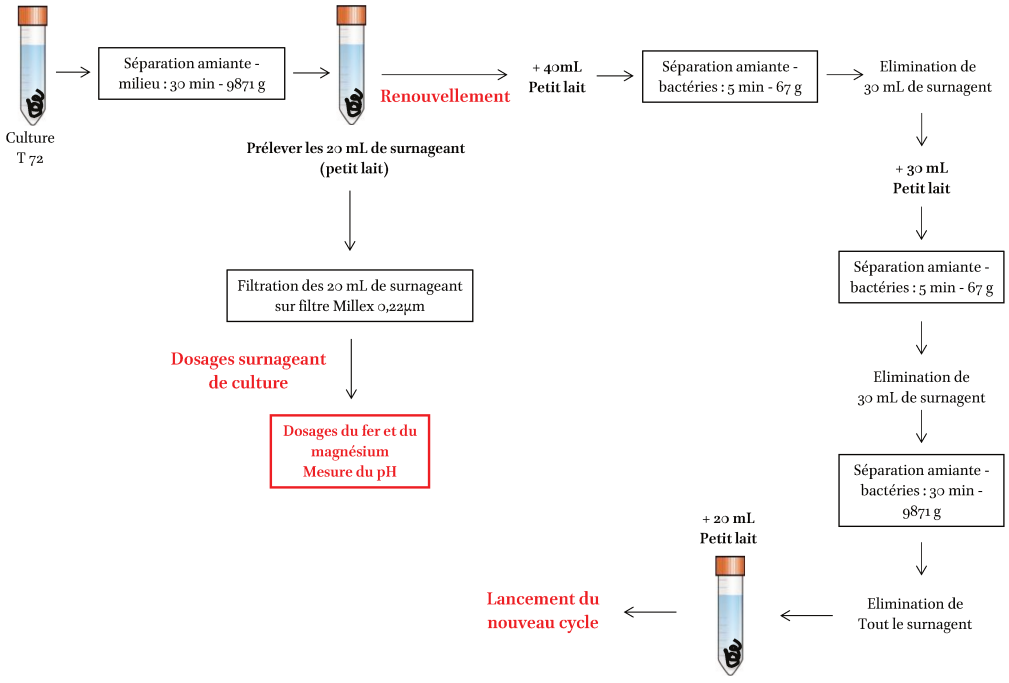


Figure 83 : Organigramme des cycles de renouvellement des cultures d'altération des déchets de flocage (CHR-Gy) par le milieu petit lait ensemencé par les bactéries lactiques

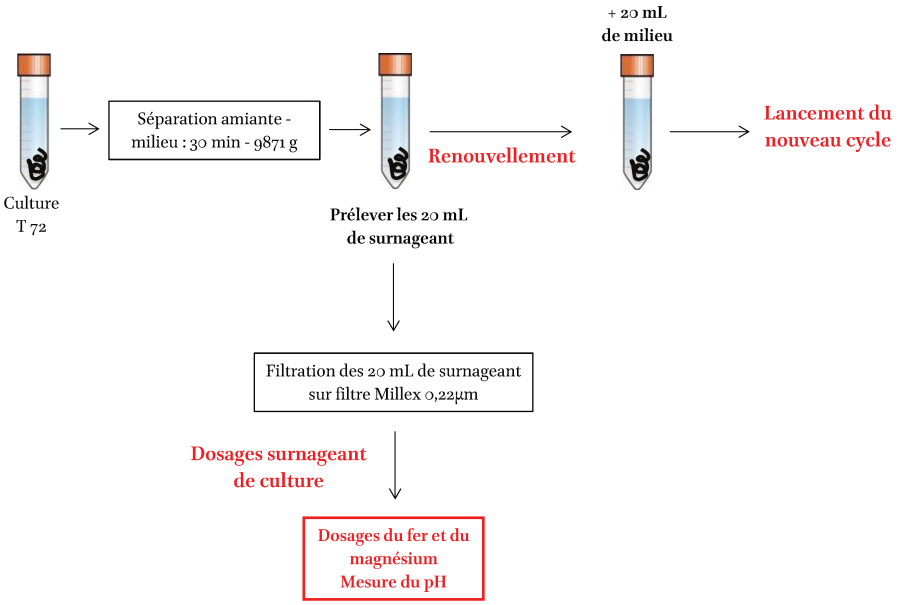


Figure 84 : Organigramme des cycles de renouvellement des cultures d'altération longue durée des déchets de flocage (CHR-Gy) par milieu petit lait ensemencé ou non par les bactéries lactiques

Le protocole est identique pour la dissolution des déchets de CHR-Gy par la solution de citrate 50 mM

6.8.3 Cycles d'altération des déchets de flocage en milieux acides puis en présence des *Pseudomonas*

Dans un premier temps, les échantillons amiantés sont incubés avec du petit lait ensemencé par *L. plantarum* ou avec une solution de citrate 50 mM durant 4 cycles de 72 h selon le protocole décrit dans le Paragraphe 6.8.1 de ce **Matériel et Méthodes**. Après ces 4 premiers cycles de dissolution, 20 mL d'éthanol à 70 % sont ajoutés sur les fibres et sont incubés pendant au moins 1 h. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 67 x g puis l'éthanol est retiré. Les fibres sont ensuite lavées grâce à 20 mL de CAA-Mg puis centrifugés 5 min à 67 x g avant de retirer tout le milieu. Les fibres débarrassées des milieux précédents pourront alors être inoculées par les souches de KT2440 WT ou PP_Δ*fur* selon le protocole décrit dans le Paragraphe 6.8.2 de ce **Matériel et Méthodes** et incubés durant 5 cycles d'altération de 24 h chacun.

6.9 Microscopie Electronique à Transmission

Les analyses par microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Dris Ihiawakrim de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS). Durant nos études, nous avons utilisés deux MET commercialisés par la société Japan Electron Optical Lens (JEOL), opérant à 200 keV : le premier est un microscope JEOL 2100F Cs équipé d'un canon à émission de champ (FEG), d'un correcteur d'aberrations sphériques, de détecteurs en mode balayage (STEM), d'un spectromètre post-colonne, d'un détecteur EDS SDD (Silicon Drift Détector), d'un filtre d'image Gatan (GIF) et d'une caméra CCD 2048 x 2048 pixels. Le second est un JEOL 2100 équipé d'un canon à électrons d'émission thermoionique LaB6. Dans nos études, le mode STEM a été essentiellement utilisé. En effet, ceci permettait un meilleur contrôle de la densité d'électrons donc de diminuer leur impact néfaste sur l'échantillon (moyen utilisé pour préserver la morphologie).

6.9.1 MET couplée à la spectroscopie par dispersion de rayons X (MET-EDS)

L'objectif de ces observations est de déterminer et/ou de cartographier la composition d'échantillons amiantés. Cela concerne à la fois des échantillons de CHR-Gy avant ou après altération mais aussi des échantillons de PVC amiantés dissous afin de caractériser les différents composants. Certaines de nos études ont nécessité de réaliser des analyses, soit ponctuelles, soit par cartographie d'une zone d'intérêt de nos échantillons préparés dans des conditions spécifiques, tout en préservant la structure du matériau. Le MET traditionnel (en mode imagerie) offre une résolution spatiale supérieure pendant l'analyse EDS en raison du volume d'interaction réduit dans une section de l'échantillon lors de son bombardement aux électrons (~ 5 à 200 nm). Lorsque le faisceau d'électrons incident interagit avec l'échantillon, des photons X sont émis et sont caractéristiques des éléments présents, permettant ainsi de déterminer la composition de l'échantillon.

6.9.2 Développement de la MET *in-situ* en milieu liquide

Le développement de la cellule environnementale fermée présentée en **Figure 79** a été mené par les équipes de Williamson *et al.* (Williamson *et al.*, 2003) qui ont mis au point une cellule liquide

personnalisée fabriquée sur mesure utilisant deux micro-puces de Si avec une fenêtre Si_3N_4 de 100 x 100 µm. La faible distance parcourue par les électrons dans l'environnement liquide (modulable de 50 nm à 5 µm) permet d'observer la dynamique de nano-objets dans de très nombreux solvants. La composition de l'environnement est finement contrôlable via un système micro-fluidique qui permet d'injecter les liquides réactifs au niveau de la fenêtre d'observation. Une telle cellule se compose généralement de deux fenêtres en nitrure de silicium amorphe suffisamment minces pour être transparentes aux électrons et suffisamment résistantes pour supporter de fortes pressions de gaz et des températures élevées, ou contenir un liquide. Pour nos études nous avons utilisé un système Poseidon 510 fabriqué par la société Protochips imaginé en **Figure 79A.** Les particules à observer sont situées sur la fenêtre inférieure de la cellule environnementale afin d'obtenir la meilleure résolution possible pour le mode MET.

Chapitre 4

Altération des déchets amiantés à matrice organique : les dalles vinyles amiantées

1 Identification des fibres d'amiante présentes dans les dalles vinyles amiantées

Un des axes de mon projet de thèse avait pour but la dégradation de dalles vinyles amiantés. Notre équipe travaille pour la première fois sur des déchets amiantés à matrice organique comme le PVC et ne possède ainsi aucune donnée concernant la composition exacte des déchets utilisés. Il s'agit de déchets de dalles vinyles amiantées récupérées sur un chantier de rénovation privé. Ce travail a permis de caractériser d'une part la matrice de PVC renfermant les fibres amiantées et d'autre part l'espèce d'amiante. Un échantillon a été analysé par le laboratoire FlashLab (Illkirch-Graffenstaden), laboratoire accrédité pour les diagnostics amiante. Cette analyse a confirmé la présence de fibres d'amiante de nature chrysotile. Dans l'objectif de quantifier le pourcentage de fibres dans l'échantillon, il a fallu élaborer différentes stratégies permettant d'extraire les fibres incluses dans la matrice PVC, *via* un traitement chimique, un traitement thermique et un traitement par dégradation fongique.

2 Dissolution chimique de la matrice

Afin de déterminer la composition des déchets et plus précisément le rapport masse d'amiante/masse de PVC, il est nécessaire d'isoler les fibres amiantées de la matrice. Aucun protocole permettant de dissoudre le PVC tout en isolant les fibres amiantées débarrassées de toute matrice n'a été décrit dans la littérature. L'objectif est, une fois les fibres amiantées isolées et caractérisées, de vérifier que l'extraction du fer et du magnésium par la souche de PP_Δ*fur* est applicable à ce type de déchet.

2.1 Elimination de la matrice de PVC

2.1.1 Mise au point de la dissolution de la matrice de PVC par des solvants

De nombreux exemples de dissolution chimique du PVC existent dans la littérature (Beneš *et al.*, 2006). Dans un premier temps, un protocole de dissolution du PVC par des solvants a été mis au point dans le but d'obtenir des fibres amiantées dont nous pourrons caractériser la nature.

2.1.1.1 Dissolution préliminaire du PVC par le THF

Pour la mise au point de cette dissolution chimique, nous avons collaboré avec le Dr. Luc Averous de L'Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé de Strasbourg (ICPEES) Les échantillons de dalles vinyles amiantées ont été dissouts dans du tétrahydrofurane (THF) avec un rapport optimal masse de PVC / volume de solvant de 1 g pour 10 mL de THF. La dissolution permet d'obtenir un mélange liquide blanchâtre plutôt épais, observable en **Figure 88**, correspondant au PVC dissous dans lequel flotte un composant intact dont la quantité est toujours proportionnelle à celle de dalle vinyle de départ. D'après nos recherches, il s'agit d'un morceau de carton situé sous la dalle vinyle permettant l'encollage de celle-ci. Ce composant ne semble pas contenir de fibres amiantées, puisque décrit comme ajouté à la dalle vinyles amiantées après la synthèse de celle-ci et est donc éliminé du mélange manuellement. Après la filtration préliminaire sur Büchner, on obtient un filtrat blanchâtre composé de PVC dissous, imagé en **Figure 86**, qui est alors reprécipité par du méthanol 100 % et caractérisé par l'ICPEES. Le PVC précipité est également présenté en **Figure 86**. Cependant, les filtres en papier Whatman sur lesquels sont censées se trouver uniquement les fibres amiantées sont également recouverts d'une couche d'une matrice blanche d'origine inconnue (**Figure 85A).** La matrice blanche est isolée du filtre à l'aide d'un scalpel et observée à la loupe binoculaire (**Figure 85B et C).**

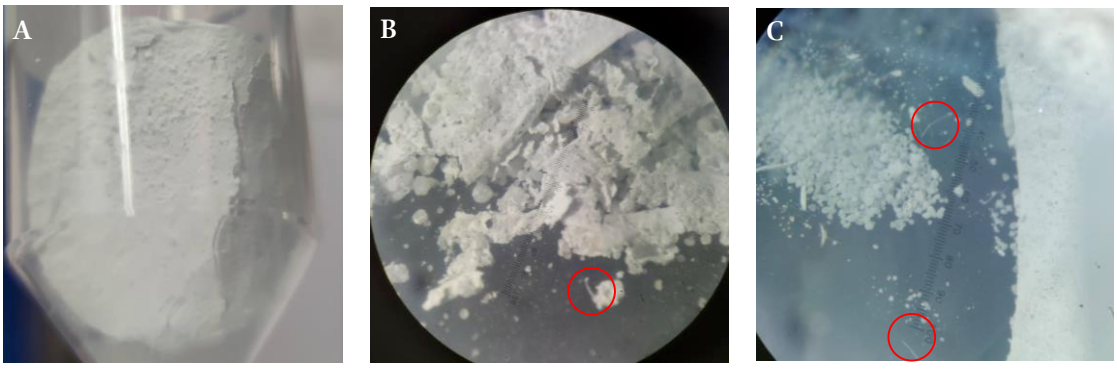


Figure 85 : Matrice blanche résultante de la dissolution des dalles vinyles amiantées après filtration sur Büchner. La matrice est agglomérée sur le filtre en papier Whatman (A), séparée du filtre grâce à un grattage au scalpel (B) et à l'état de poudre (C). Sur les observations effectuées à la loupe binoculaire (x 10) (B et C), des fibres amiantées sont entourée en rouge.

Cette matrice blanche résiduelle freine la filtration du PVC dissous et bouche les pores du filtre très rapidement. De plus, les fibres amiantées semblent emprisonnées dans cette matrice, rendant alors impossible leur minéralisation préalable à leur caractérisation.

2.1.1.2 Dissolution optimisée du PVC par le mélange THF/DMF

Afin d'améliorer la dissolution du PVC et de potentiellement réduire la quantité de matrice blanche résiduelle piégeant les fibres amiantées, la dissolution a alors été réalisée avec un mélange THF/DMF (N,N-Diméthylformamide) en comparaison avec le THF. Les différentes observations sont résumées dans la **Figure 86.** Les dissolutions sont identiques puisque la totalité du déchet (excepté le carton) est dissout par le ou les solvants, comme on peut l'observer dans la première colonne de la **Figure 86.** Cependant, la filtration sur Büchner est plus rapide lorsque le PVC est dissout dans le mélange THF/DMF et nécessite moins de filtres en papier Whatman, signifiant ainsi que la matrice blanche non dissoute bouche moins les pores. Le PVC reprécipité, imagé dans la troisième colonne de la **Figure 88** est d'aspect similaire pour les deux dissolutions. Enfin, lorsqu'on s'intéresse à la matrice non dissoute, on voit que les cristaux obtenus pour la dissolution THF/DMF sont plus petits et plus fins que ceux obtenus pour le THF. La matrice inconnue semble potentiellement plus dégradée par le mélange et son élimination ultérieure sera peut-être plus aisée, permettant ainsi une libération plus efficace des fibres amiantées.

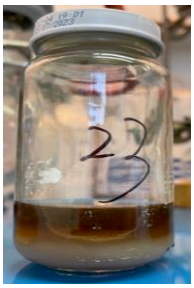
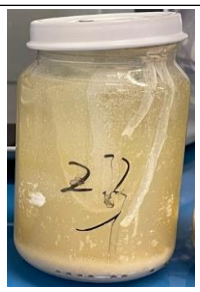
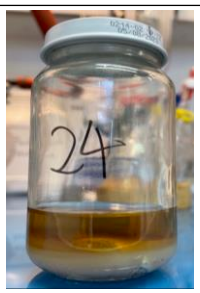
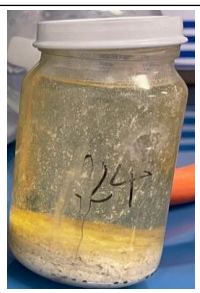
	Dissolution	Filtrat	Précipitation	Matrice blanche
THF				
THF/DMF				

Figure 86 : Comparaison de la dissolution par le THF ou le mélange THF/DMF. Le tableau permet de comparer la dissolution du PVC dans le ou les solvants, l'aspect du filtrat après filtration sur Büchner, l'aspect du PVC dissous puis reprécipité par du méthanol. Enfin des observations à la loupe binoculaire sont réalisées afin de comparer l'aspect des deux matrices blanches non dissoutes.

2.1.2 Caractérisation de la matrice de PVC par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La caractérisation a été réalisée sur la matrice de PVC dissoute au THF puis reprécipitée par du méthanol avant d'être séchée à l'air libre durant quelques jours sous hôte à température ambiante. Cette expérience a été réalisée par le Dr. Luc Averous de l'ICPEES de Strasbourg. L'analyse SEC présente une courbe monodispersée étalée des chaines macromoléculaires avec une masse molaire en nombre (Mn) d'environ 38.000, une masse molaire en poids (Mw) d'environ 66.000, avec une dispersité (Mn/Mw) de l'ordre de 1,74. Les masses molaires obtenues semblent celles attendues pour un PVC commercial. Pour un PVC commercial vierge non mis en œuvre et sans vieillissement, généralement la dispersité est proche de 2 (Pepperl, 2000). Il est également possible de trouver une dispersité de 1,2 dans le cas d'un PVC obtenu par synthèse en émulsion. Il peut ainsi s'agir d'un PVC commercial obtenu par polymérisation en suspension ou par polymérisation en masse par

exemple ». Ces analyses nous permettent de conclure que le PVC dissous filtré puis reprécipité est composé uniquement de PVC commercial (et pas de fibres amiantées).

2.2 Elimination de la matrice inorganique blanche

Afin de libérer les fibres amiantées de la matrice blanche résiduelle il a donc été nécessaire en premier lieu de caractériser cette matrice afin de la dissoudre.

2.2.1 Caractérisation de la matrice inorganique blanche par MET

L'analyse par MET de la matrice blanche résiduelle a permis de confirmer que les fibres amiantées étaient toujours piégées dans cette matrice dense (**Figure 87A**). La matrice est composée de structures noires régulières et plutôt géométriques pouvant correspondre à des oxydes de titane (To_2) (**Figure 87B**). Le titane est régulièrement utilisé au niveau industriel afin d'obtenir des couleurs très blanches. Les tâches grises claires plus irrégulières présentées également sur la **Figure 87B** semblent être de la calcite, appelé aussi carbonate de calcium calcium ($CaCO_3$) ou de la chaux composée, d'oxydes de calcium (CaO). Une analyse haute résolution a été réalisée sur une zone de l'échantillon présentant à la fois des oxydes de titane et la matrice irrégulière (**Figure 87C**). Sur cette image, chaque tâche sombre représente un atome. On voit que les atomes des deux éléments sont très bien organisés cependant il faudrait réaliser une analyse plus approfondie de la cristallisation des atomes ainsi que les profils de diffraction afin de conclure sur la présence d'oxydes ou de carbonate de calcium. Néanmoins, la chaux est souvent additionnée à divers matériaux afin d'améliorer leur résistance, leur plasticité et leur densité tout en réduisant leurs prix (Kasteren and Slapak, 2001; Reddy *et al.*, 2019). Nous pouvons donc conclure que la matrice blanche est composée en grande partie de chaux.

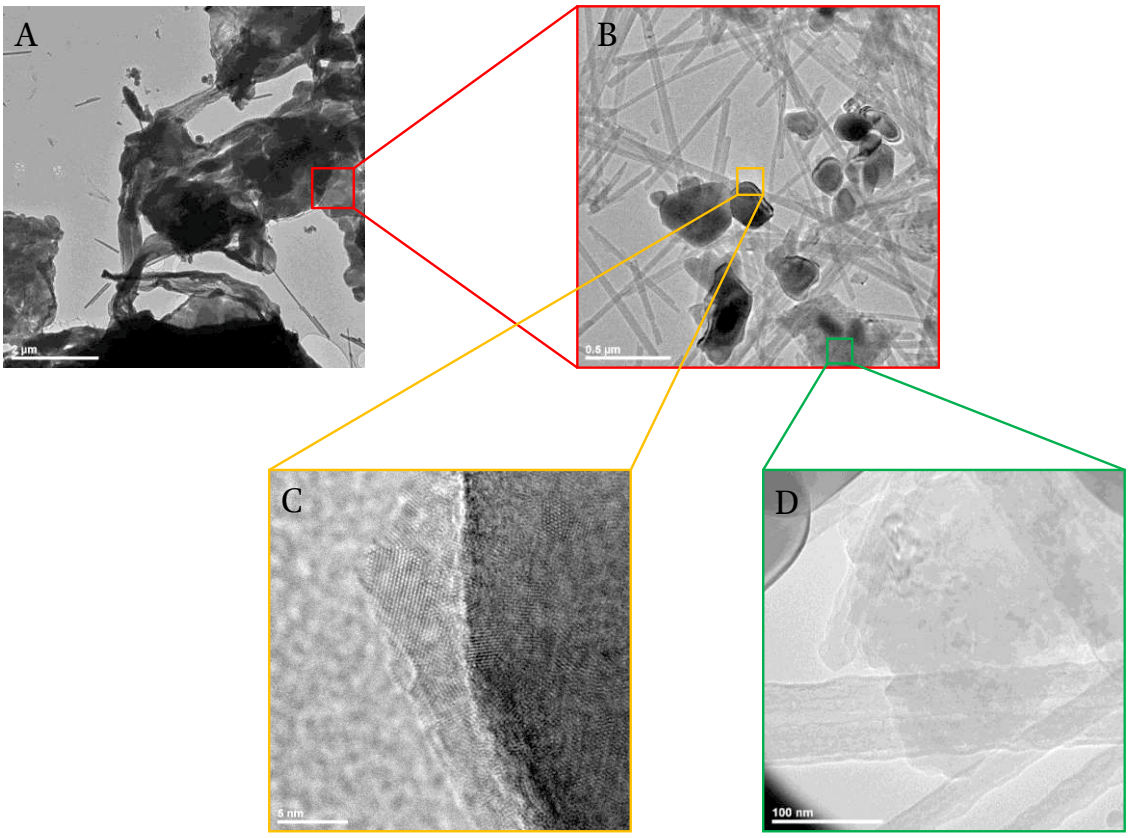


Figure 87 : Observations par MET de la matrice blanche piégeant les fibres d'amiantes après la dissolution de la matrice de PVC par du THF et une filtration sur un filtre papier Whatman. La matrice blanche analysée a été séparée du filtre en le grattant avec un scalpel. On observe une matrice dense renfermant des fibres amiantées (**A**) et composée d'oxydes de titane et de calcium (**B**). L'analyse haute résolution de la zone de contact entre le calcium et les oxydes de titane permettent d'observer les atomes composant les structures (**C**). La matrice de calcium contient toujours des fibres amiantées (**D**).

2.2.2 Dissolution de la matrice inorganique blanche obtenue après le traitement THF

La matrice étant majoritairement composée de calcium et de titane, nous avons mis au point un protocole permettant de la dissoudre dans le but de libérer les fibres amiantées, toujours non caractérisées à cette étape de la dissolution.

2.2.2.1 Dissolution préliminaire de la matrice inorganique blanche par des acides

Les dissolutions préliminaires de la matrice de calcium ont été réalisées post dissolution au THF, avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1, 0,3 et 3 M, de l'acide acétique 1 M. L'utilisation de l'acide chlorhydrique pour dissoudre le calcium est bien décrit dans la littérature (Belardi and Piga, 2013) tandis que l'acide acétique utilisé correspondant en fait à du vinaigre ménager à 6 % réputé efficace pour éliminer les traces de chaux sur diverses surfaces et tissus. La dissolution a également été réalisée dans du citrate 50 mM précédemment utilisé pour dissoudre les matrices inorganiques et dont nous savons le pH très bas, ainsi que du petit lait dont le pH est également acide. La dissolution est réalisée durant 2 h, sans agitation, et les résultats pour chaque essai sont présentés **Figure 88.**

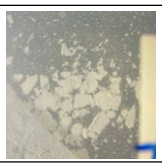
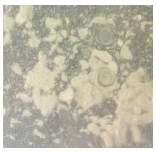
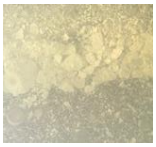
Réactif	Observations au moment de l'ajout du réactif	Observations après 2 h de dissolution
HCl 0,1 M	Formation de quelques bulles. Filtre débarrassé de la matrice. Gros morceaux solides en suspension. pH 1,8	
HCl 0,3 M	Formation de quelques bulles. Filtre débarrassé de la matrice. Gros morceaux solides en suspension. pH 0,5	
HCl 3 M	Formation instantanée de nombreuses bulles. Filtre débarrassé de la matrice. Petits morceaux solides en suspension. pH non mesurable	
Acide acétique 1 M	Formation de nombreuses bulles. Filtre débarrassé de la matrice. Aspect poudreux de la matrice. pH 4,0	
Citrate 50 mM	Filtre débarrassé de la matrice. Gros morceaux solides en suspension. pH 4,1	
Petit lait	Filtre débarrassé de la matrice. Gros morceaux solides en suspension. pH 4,9	

Figure 88 : Observations de la dissolution par divers acides de la matrice blanche piégée sur le filtre en papier Whatman après la dissolution du THF suivie de la filtration sur Büchner

La majorité des acides utilisés provoquent la libération de CO_2, visualisable par la formation de bulles dès le contact avec la matrice blanche résiduelle, entrainant ainsi sa libération du filtre puis sa dissolution en morceaux de taille plus ou moins importante. Seuls le citrate et le petit lait n'entraînent pas de libération de CO_2 et ne permettent pas d'obtenir de très petits morceaux de matrice dissoute. La matrice semble être dissoute plus efficacement avec l'utilisation de l'acide chlorhydrique 3 M ou d'acide acétique 1 M. Cependant, les fibres amiantées peuvent également être altérées en conditions acides comme nous l'avons déjà montré précédemment. L'efficacité de la dissolution semble donc être liée à la force de l'acide utilisé, néanmoins il est nécessaire de trouver un bon équilibre afin que les acides n'altèrent pas également les fibres amiantées dont nous voulons conserver l'intégrité afin de déterminer le pourcentage contenu dans le déchet.

2.2.2.1 Etude de la stabilité des fibres amiantées après une dissolution de la matrice inorganique blanche en milieux acides

Afin de vérifier l'état d'altération des fibres suite au traitement acide de la matrice de chaux, la concentration en fer et en magnésium présents dans le surnageant ont été dosés par les méthodes colorimétriques (**Figure 89**). Ces dosages ont été réalisés sur les surnageants issus de la dissolution par l'acide chlorhydrique 3 M et l'acide acétique 1 M puisqu'il s'agit des conditions de dissolution les plus efficaces, ainsi que sur ceux en présence de petit lait et de citrate 50 mM puisque ce sont des milieux acides précédemment utilisés pour la dissolution des matrices minérales.

L'utilisation du petit lait entraîne la dissolution de plus d'1 mg de fer de la matrice résiduelle, correspondant surement au fer des fibres. L'acide chlorhydrique et le citrate entraînent la dissolution de quantités similaires de fer, cependant supérieures aux quantités extraites par l'acide acétique 1 M. A l'inverse, les quantités les plus importantes de magnésium sont retrouvées dans le surnageant de dissolution de l'acide acétique et de l'acide chlorhydrique 3 M tandis que la matrice traitée par le petit lait relargue le moins de magnésium. Cependant, il est important de souligner que la présence de calcium, qui est, pour rappel, le composant majoritaire de la matrice résiduelle, peut interférer avec le dosage du magnésium supposé reflété uniquement la dissolution des fibres. Ces résultats sont donc biaisés et les quantités de magnésium dissout retrouvées dans les solutions acides sembleraient plutôt correspondre à une dissolution du calcium de la matrice blanche que du

magnésium des fibres amiantées. En se basant sur cette hypothèse, l'acide acétique semble être le meilleur acide à utiliser afin de dissoudre une matrice riche en calcium puisqu'il entraîne la dissolution d'une quantité infime de fer. L'utilisation d'acide chlorhydrique peut aussi être envisagée, cependant la dissolution de la matrice résiduelle semble moins efficace.

Le dosage du magnésium n'étant pas la méthode la plus adaptée pour étudier la dissolution des fibres ou de la matrice, il nous a alors fallu mettre au point une méthode permettant de quantifier la dissolution de la matrice uniquement, le dosage du calcium, composant majoritaire de la matrice. Ce dosage sera utilisé lors des prochaines expériences d'optimisation de la dissolution de la matrice blanche en milieux acides.

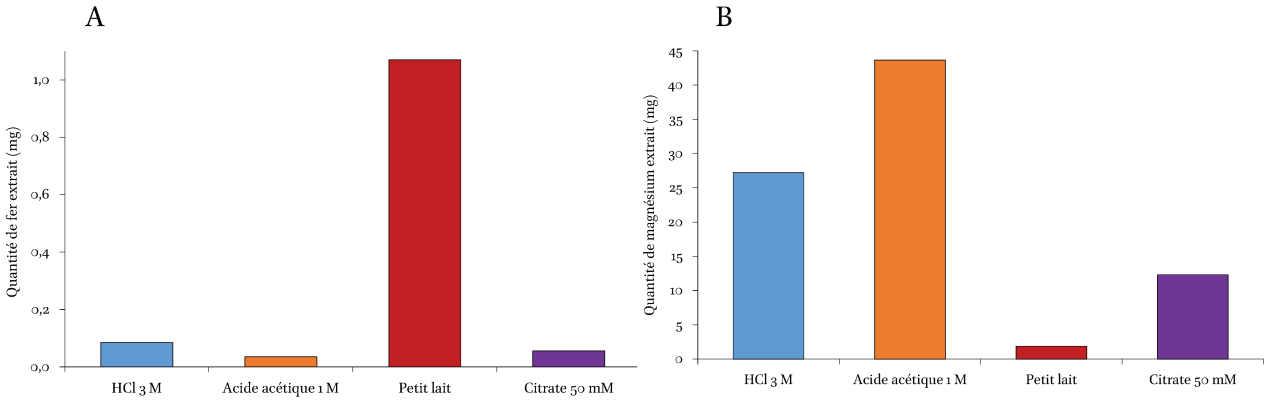


Figure 89 : Quantité de fer (A) et de magnésium (B) extrait de la matrice blanche résiduelle par différentes solutions acides après une première dissolution de la matrice de PVC au THF

2.2.1 Dissolution optimisée de la matrice blanche

La matrice de PVC ayant été dissoute plus efficacement dans un mélange THF/DMF que dans du THF, nous avons voulu savoir si cette première dissolution a un impact sur la deuxième dissolution en milieu acide. En effet, nous avions observé qu'après une dissolution THF/DMF, la matrice blanche résiduelle avait tendance à former des cristaux plus petits que la matrice résiduelle obtenue post THF. Ainsi, une matrice présentant des agglomérats plus fins sera potentiellement dissoute de façon plus efficace en conditions acides, entrainant ainsi une libération plus importante de calcium.

2.2.1.1 Dissolution de la matrice blanche par les acides

La dissolution est réalisée sur des échantillons dont la matrice de PVC a été dissoute par un mélange THF/DMF mais aussi sur des échantillons dissouts par THF afin de comparer l'influence du solvant utilisé. Les traitements sélectionnées pour l'optimisation de la dissolution de la matrice résiduelle sont ceux à l'acide chlorhydrique, l'acide acétique et le citrate. Cette fois ci nous avons utilisé un barreau aimanté afin d'agiter le milieu acide contenant la matrice résiduelle durant toute la dissolution. L'observation des tubes après 2 h de dissolution dans les milieux acides révèle la présence d'une poudre noire que l'on peut observer en **Figure 90B** sur le barreau aimanté. L'utilisation des acides permet de dissoudre la matrice résiduelle en une poudre blanche de faible granulométrie (**Figure 90A**) mais semblant tout de même contenir des fibres amiantées ainsi qu'une poudre noire magnétique que l'on peut isoler de la blanche ou du barreau aimanté à l'aide d'un aimant puissant comme l'illustre la **Figure 92C**. Malgré cette dissolution supplémentaire, les fibres amiantées ne semblent toujours pas avoir été isolées de la matrice résiduelle.

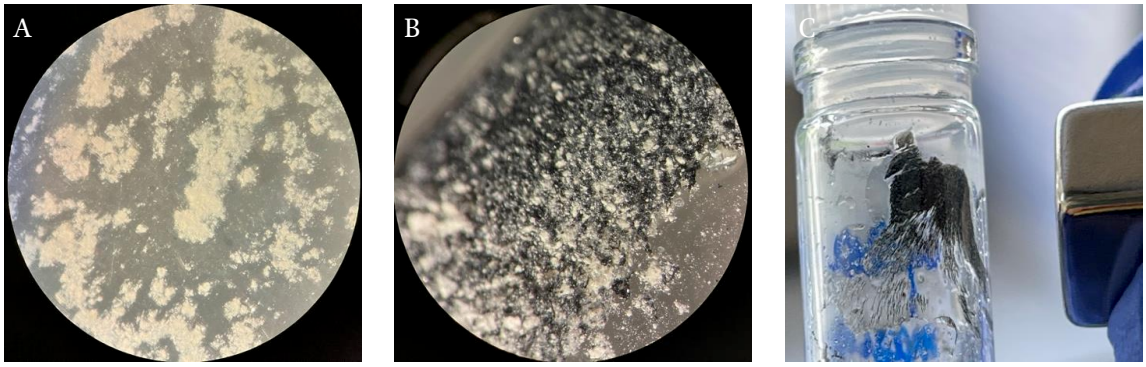


Figure 90 : Observation des deux poudres obtenues après dissolution à l'acide acétique 1 M de la matrice blanche résiduelle post dissolution au THF/DMF. La dissolution de la matrice blanche sous agitation permet d'obtenir une poudre blanche (A) ainsi qu'une poudre noire magnétique (B et C)

2.2.1.1 Quantification de la dissolution du calcium de la matrice blanche

Afin de quantifier la dissolution de la matrice blanche résiduelle, nous avons mis au point une méthode de dosage du calcium qui n'est pas biaisée par la présence de magnésium (Tsuyoshi Ohnishi, 1979). Dans un premier temps, une gamme d'étalonnage a été réalisée avec différentes

concentrations en Ca^{2+} afin d'obtenir une droite de régression linéaire nous permettant de relier la concentration en calcium à l'absorbance lue à 650 nm après la réaction colorimétrique.

Nous savons que le pH de la solution peut avoir un impact sur la fiabilité de la réaction colorimétrique. Sachant que nous travaillons avec des milieux acides, nous avons étudié l'impact du pH du milieu réactionnel sur le dosage. Nous avons ainsi réalisé les dosages de solutions de $CaCl_2$ de concentrations connues dans des milieux réactionnels à pH = 1,7 à 9,3. Nous avons ainsi conclu que les solutions à doser devaient avoir un pH compris entre 3 et 9 afin d'obtenir des résultats présentant un pourcentage d'erreur négligeable afin de réduire au maximum la variabilité de la mesure. Au-delà de cette limite, l'influence du pH sur le résultat ne sera pas négligeable et un ajustement du pH doit être fait pour des résultats plus précis.

Les dosages en calcium dissout, présentés en **Figure 93**, ont ainsi été réalisés sur les surnageants de dissolution de la matrice de chaux obtenue en condition THF ou THF/DMF. La dissolution de cette matrice blanche a été réalisée par de l'acide chlorhydrique, de l'acide acétique ou du citrate 50 mM. Les différences d'extraction observées entre les échantillons traités au THF ou au DMF/THF semblent négligeables et le solvant utilisé ne semble pas avoir d'impact sur la dissolution en milieu acide. D'une façon générale, l'acide chlorhydrique semble être l'acide le mieux adapté pour dissoudre la matrice blanche puisqu'il permet d'extraire jusqu'à 120 mg de calcium lorsqu'il est à 0,5 M. L'acide acétique 0,5 M permet de dissoudre 101 mg et celui à 1 M 87 mg. L'utilisation du citrate entraine une dissolution moins importante du calcium, comme c'était le cas pour le magnésium précédemment. Ainsi, le solvant utilisé pour dissoudre la matrice de PVC ne semble pas avoir d'influence sur la dissolution de la matrice de chaux en milieu acide. Cette dernière est optimale lorsque l'on utilise de l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique à la concentration de 0,5 M.

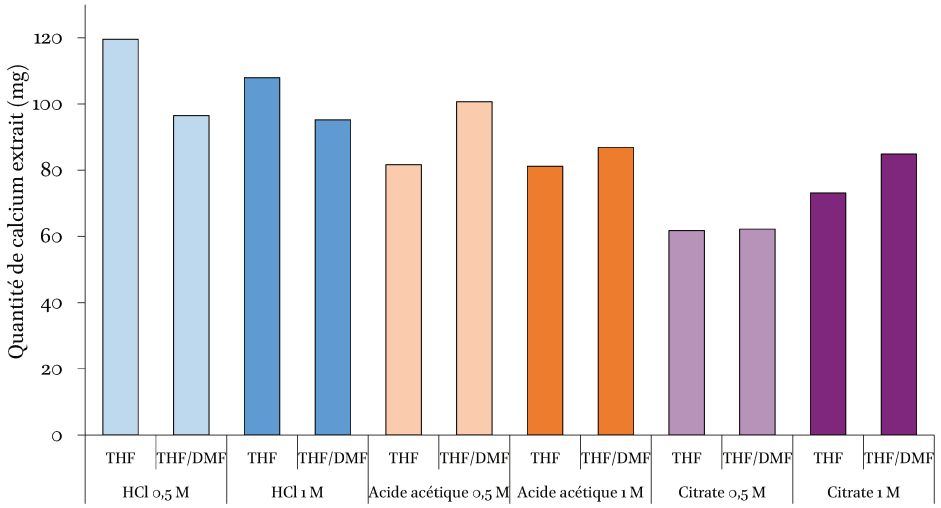


Figure 91 : Quantité de calcium extrait de la matrice blanche résiduelle grâce à différents acides. La matrice blanche provient d'une dissolution de l'échantillon de PVC amianté au THF ou par un mélange THF/DMF.

2.2.1.1 Vérification de l'intégrité des fibres

Afin d'identifier l'acide le plus adapté pour la dissolution de la matrice blanche composée majoritaire de chaux, il faut aussi s'intéresser à la préservation des fibres amiantées, dans une visée de revalorisation. Pour cela on quantifie à nouveau le fer qui est un bon indicateur de la dissolution des fibres amiantées. Les résultats concernant le magnésium ne sont pas présentés puisqu'on sait qu'ils sont biaisés par la présence de calcium.

Bien que très efficace pour dissoudre le calcium constituant la matrice blanche, l'utilisation d'acide chlorhydrique entraine également la dissolution de quantités non négligeables de fer comme le montre la **Figure 92**. Cela n'est pas surprenant car une méthode de traitement des déchets amiantés alternative au stockage au centre d'enfouissement consiste à dissoudre les fibres dans des milieux acides. Par exemple, le magnésium présent dans le chrysotile peut être dissous à l'aide d'une solution acide, entrainant ainsi l'altération des fibres et donc la libération de fer. De plus, plus le pH est bas, plus sa dissolution est rapide (Spasiano and Pirozzi, 2017). L'utilisation du citrate entraine une dissolution encore plus importante du fer. Cela corrobore avec les observations que nous avions faites lorsque nous utilisions du citrate 50 mM pour dissoudre les déchets de flocage. En effet, dès le premier cycle d'altération, les déchets de flocage, qui normalement forment toujours un ensemble

relativement dense entre les fibres et la matrice de gypse, avaient tendance à se retrouver rapidement sous forme de fibres très fines voire de poudre. Le citrate semble donc entrainer une déstructuration importante des fibres amiantées. Enfin, l'utilisation d'acide acétique, notamment 0,5 M n'entraine la libération que de très peu de fer en altérant la matrice de calcium de façon efficace.

Le traitement le plus efficace de la matrice blanche résiduelle semble donc être l'utilisation d'acide acétique 0,5 M sous agitation, précédé d'une dissolution de la matrice PVC par un mélange THF/DMF.

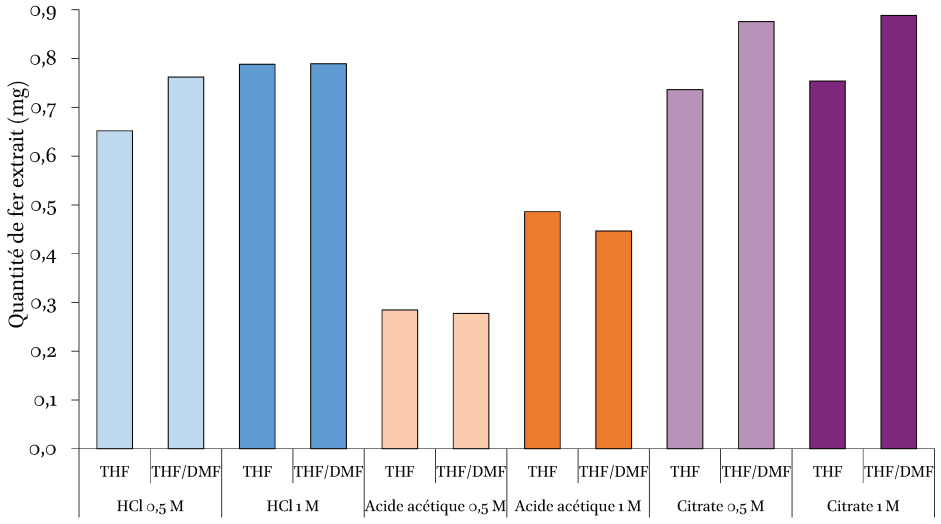


Figure 92 : Quantité de fer extrait de la matrice blanche résiduelle grâce à différents acides. La matrice blanche provient d'une dissolution de l'échantillon de PVC amianté au THF ou par un mélange THF/DMF.

2.1 Caractérisation des éléments résiduels non dissous

Bien que le traitement en milieu acide permette de dissoudre des quantités significatives de calcium provenant de la matrice blanche résiduelle, les fibres amiantées se trouvent toujours piégées dans une poudre blanche inconnue. De plus, l'utilisation d'un barreau aimanté afin d'améliorer la dissolution a conduit à la séparation d'une poudre noire magnétique. Il est nécessaire de caractériser ces deux poudres pour mettre au point une troisième étape de dissolution permettant enfin de libérer les fibres amiantées.

2.1.1 Caractérisation de la poudre blanche par MET-EDS

Lorsque l'on observe la poudre présentée **Figure 90C** obtenue après la double dissolution, on remarque qu'elle renferme de nombreuses fibres amiantées, observables par MET en **Figure 93** à différents grossissements. Cette poudre semble toujours piéger les fibres qui restent groupées mais semblent intactes. Les images présentent à nouveau des structures noires géométriques, entourée en rouge sur **Figure 93** et pouvant correspondre à du titane.

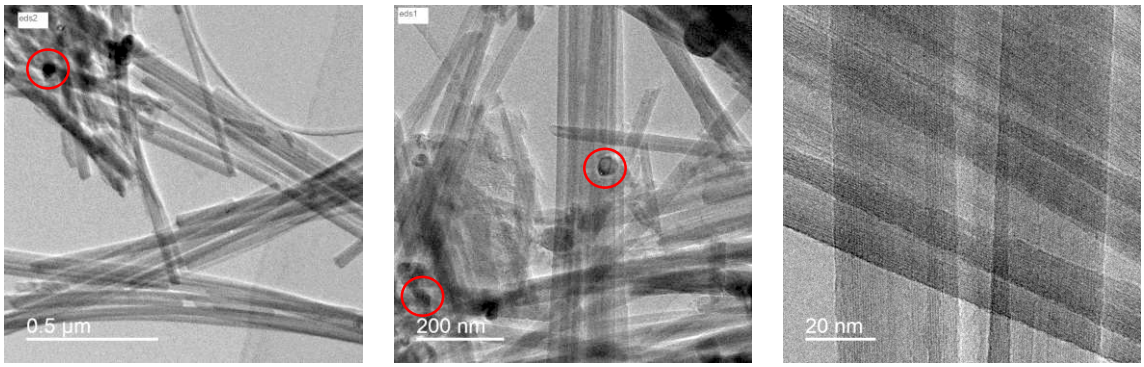


Figure 93 : Poudre blanche obtenue après dissolutions au THF/DMF puis à l'acide acétique 0,5 M observée par MET. Les structures noires géométriques sont entourées en rouge.

Les résultats de MET-EDS (**Figure 94)** réalisé sur l'échantillon « eds 2 » (**Figure 93)** indiquent que la poudre ne contient plus de calcium, celui-ci ayant donc été dissout de façon efficace grâce au traitement à l'acide acétique. La présence de silice, de magnésium et de fer confirme la présence de fibres amiantées piégées dans cette matrice. La poudre renferme en effet du titane, souvent utilisé pour obtenir une couleur très blanche. Nous avons également retrouvé environ 12 % de chrome et 15 % d'or. La présence d'or dans la poudre est surprenante car les dalles de PVC ne sont pas des matériaux onéreux et ont été utilisés dans de nombreux bâtiments durant de nombreuses années. L'hypothèse est que, l'or étant un métal insensible à l'oxydation et ayant une température de fusion très élevée tout en étant très malléable, son ajout permet d'améliorer les propriétés du matériau, notamment de la matrice blanche renfermant les fibres amiantées, de façon indépendante de la matrice organique de PVC entourant le déchet.

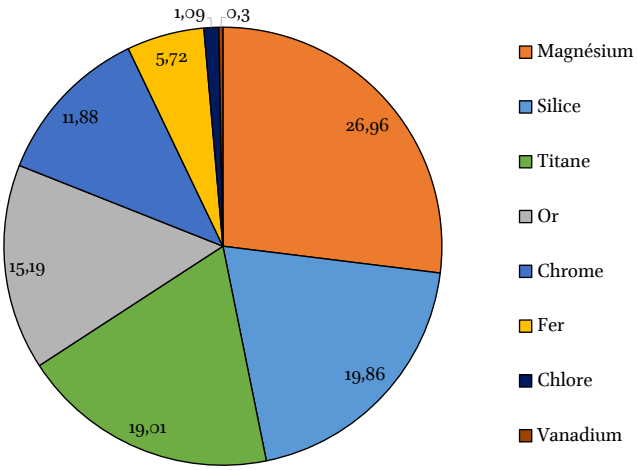


Figure 94 : Composition de la poudre blanche résiduelle renfermant les fibres amiantées (en % massique) obtenue par MET-EDS

2.1.2 Caractérisation de la poudre magnétique noire par MET-EDS

La poudre noire magnétique est constituée de fibres mais qui semblent plus courtes et plus rigides que celles trouvées dans la matrice (**Figure 95**). De plus, l'image obtenue semble montrer des fibres plus foncées dans cette poudre. Afin de vérifier la composition de la poudre, nous avons réalisé une analyse par MET-EDS sur l'image « eds 1 ».

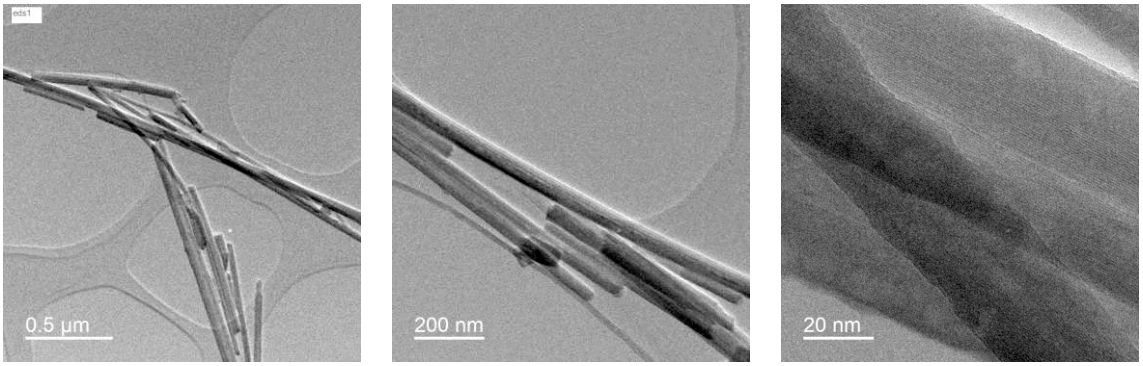


Figure 95 : Poudre noire magnétique obtenue après dissolutions au THF/DMF puis à l'acide acétique 0,5 M observée au MET.

La poudre noire renferme de la silice, du magnésium ainsi que du fer, caractéristiques de la présence de fibres amiantées. Une quantité non négligeable d'or est également retrouvée dans cette poudre noire. La couleur grise/noire de la poudre peut être due à la présence de chrome et/ou de fer.

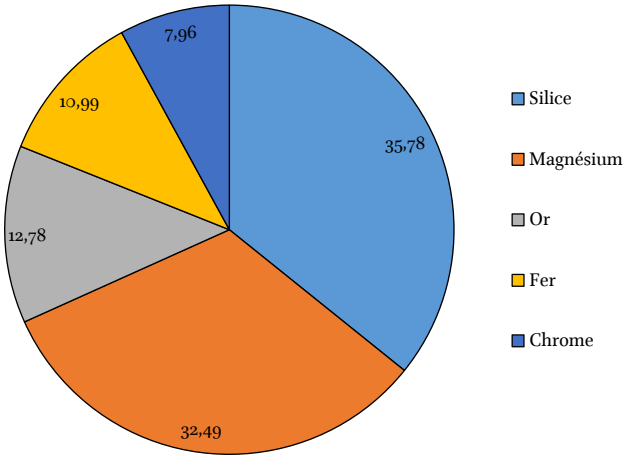


Figure 96 : Composition de la poudre noire magnétique résiduelle (en % massique) obtenue par MET-EDS

En conclusion, la voie chimique la plus efficace consiste à dissoudre un échantillon de PVC dans mélange THF/DMF. Après filtration Büchner sur papier Whatman, le PVC exempt de fibre amiantées est séparé d'une matrice résiduelle composée de calcite ou de chaux. Cette matrice peut alors être dissoute avec de l'acide acétique 0,5 M, permettant ainsi d'obtenir une poudre blanche et une poudre noire magnétique renfermant toutes deux les fibres amiantées. Afin de pouvoir caractériser les fibres amiantées sans être biaisé par les composants des différentes matrices, il faudra alors dissoudre la 1ère matrice blanche riche en calcium, la 2ème poudre blanche contenant divers métaux ainsi que la poudre noire magnétique. Le but de ces différentes dissolutions est d'obtenir des fibres qui seront traitées par voie bactérienne. Toutefois, nous n'avons toujours pas réussi à dissoudre ces deux poudres, même par minéralisation à l'acide nitrique 4 N, normalement utilisé pour dissoudre les fibres amiantées afin de quantifier les composants. La dissolution chimique utilise de grandes quantités de solvants et nécessite de nombreuses filtrations fastidieuses et n'a pas permis de libérer les fibres amiantées.

3 Dissolution thermique

Le but de la dissolution thermique de la matrice de PVC est ainsi d'essayer de carboniser le PVC par pyrolyse afin de recueillir, à la fin du traitement, uniquement des fibres amiantées dont le point

de fusion est plus élevé. Les expériences préliminaires de dissolution par voie thermique ont été menées en collaboration avec le Dr. Eric Pelt, de l'Institut Terre et Environnement de Strasbourg (ITES). Les échantillons sont chauffés graduellement jusqu'à 500 °C. L'échantillon diminue en taille, noircit et dégage une légère fumée blanche correspondant à de la vapeur d'eau qui s'échappe du PVC. La vapeur va alors se condenser au contact de l'acide chlorhydrique gazeux utilisé pour condenser les différents gaz produits durant la pyrolyse. La température est maintenue à 500 °C afin d'induire une perte de masse du PVC plus importante sans atteindre sa température d'auto-inflammation qui est de 600 °C (Cas n° 9002-86-2 GESTIS Substance Database). Après 14 h à 550 °C, le PVC n'a perdu que 30 % de sa masse, s'est légèrement fragmenté mais n'a plus changé d'aspect. A 700 °C, le PVC est presque entièrement passé à l'état de poudre (cendres) et il reste environ la moitié de sa masse initiale. La masse restante ne peut être composée uniquement de fibres d'amiantées. La suite de la pyrolyse consisterait à une calcination du déchet par étapes de 100 °C jusqu'à atteindre 1000 °C qui permettrait de récupérer un mélange anhydrite/amiantes. Cependant, cela induirait également une pyrolyse des fibres de chrysotile dont la couche de brucite perd de sa stabilité à partir de 550 °C et est totalement détruite à environ 750 °C (Virta, 2002). L'anhydrite, correspondant à du gypse déshydraté de formule $CaSO_4$, pourrait être dissout avec de l'acide chlorhydrique chaud. A l'heure actuelle, les expériences préliminaires de pyrolyse menées en collaboration avec l'ITES ne nous ont pas permis d'obtenir des fibres amiantées isolée de leur matrice de PVC.

4 Dissolution biologique

De nombreuses études ont déjà mis en avant la capacité de certains champignons, notamment *Phanerochaete chrysosporium*, à utiliser le PVC comme unique source de carbone (Ali *et al.*, 2014). Afin de développer un procédé d'altération le moins polluant possible, une dissolution biologique fondée sur l'utilisation de champignons en collaboration avec le Pr. Mélanie Morel-Rouhier (UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes, Nancy) a été mise en testée. Les champignons saprophytes basidiomycètes sont capables de dégrader complètement le bois, grâce à des systèmes oxydatifs et enzymatiques efficaces. De plus, au cours de la dégradation du bois, de nombreux composés toxiques et oxydants sont libérés et peuvent présenter des activités antifongiques. Ainsi,

pour faire face à ces molécules, les champignons ont développé diverses stratégies étudiées au sein de l'équipe (Schwartz *et al.*, 2018; Valette *et al.*, 2017).

4.1 Altération biologique par voie fongique en milieu liquide

Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance de 4 basidiomycètes (*Phanerochaete chrysosporium*, *Serpula lacryman*, *Trametes versicolor* et *Fomitiporia mediterranae*) en présence de dalles vinyles amiantées en milieu liquide. La croissance en milieu liquide permet ainsi de pouvoir doser les enzymes produits par les champignons dans le milieu, notamment les laccases connues pour dégrader la lignine du bois.

4.1.1 Etude de la toxicité des déchets de dalle vinyle amiante vis-à-vis des champignons

L'objectif de cette expérience préliminaire était de déterminer si la présence de déchets amiantés dans le milieu de culture pouvait présenter une toxicité vis-à-vis des champignons. Une culture de chaque champignon en milieu minimum P25 favorable à la croissance des champignons a été supplémenté de différentes quantités de dalles vinyles amiantées durant 10 j.

Le contrôle abiotique a permis de valider la stérilité du milieu P25.Tous les champignons se développent dans le milieu P25 en présence des déchets et leur croissance est, de façon étonnante, stimulée par l'ajout de PVC amianté dans les deux conditions testées (170 et 350 mg), **Figure 97.** Le PVC étant un matériau composé de nombreux éléments comme nous l'avons décrit précédemment, sa présence apporte ainsi au champignon des éléments pouvant favoriser sa croissance. De plus, la présence de nombreux métaux aux propriétés antifongiques décrites comme l'or ou le fer ne semblent pas avoir d'effet toxique sur les champignons, peut être car ils se trouvent encore internalisés sous la couche externe de PVC ou en trop faible quantité (Ahmad *et al.*, 2013; Parveen *et al.*, 2018). Les souches, en se développant, sont capables de couvrir presque l'intégralité du fond de l'erlenmeyer, couvrant même les échantillons de PVC.

La présence des déchets amiantés ne semble ainsi pas toxique pour les champignons qui sont capables de coloniser les échantillons. La plupart des champignons forment un voile blanc duveteux dans le fond de l'erlenmeyer uniquement, là où se trouve le milieu liquide.

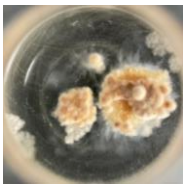
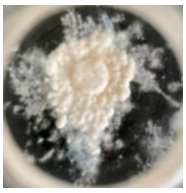
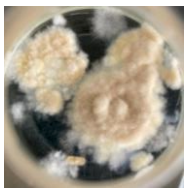
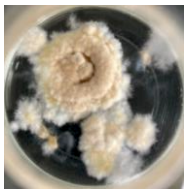
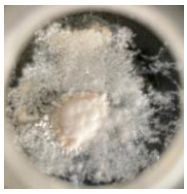
	Abiotique	*T. versicolor*	*P. chrysosporium*	*F. mediterranea*	*S. lacrymans*
P25 seul					
Quantité 1					
Quantité 2					

Figure 97 : Observation des souches après 10 j de contact en milieu P25 avec ou sans déchets de PVC amiantés. Les quantités de déchets de PVC amiantés sont précisées dans le Matériel et Méthodes. Après incubation, la biomasse est estimée pour chaque condition.

Après 10 j de culture, les champignons ont été séparés des échantillons de PVC puis séchés afin d'évaluer leur masse sèche (**Figure 98**). *P. chrysosporium*, *T. versicolor* et *P. mediterranae* présentent une masse sèche plus importante lorsqu'elles sont cultivées en présence de PVC amianté plutôt qu'en P25 seul. Seul *S. lacrymans* ne semble pas stimulé par la présence de PVC. *P. chrysosporium* présente la masse sèche la plus importante entre les quatre champignons dans les deux conditions testées. Concernant *T. versicolor* et *P. mediterranae*, leur masse sèche diminue avec l'augmentation de la quantité de PVC, celle-ci devenant peut-être toxique à haute dose.

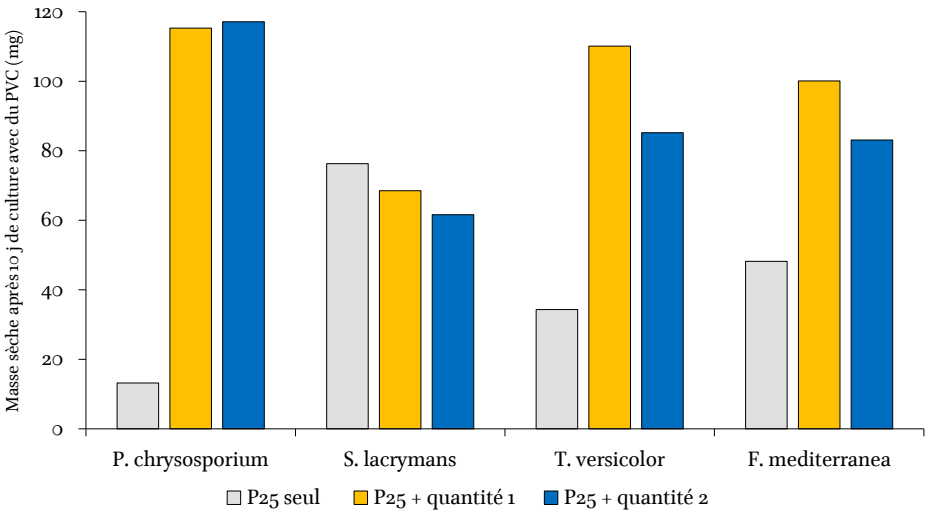


Figure 98 : Masse sèche des basidiomycètes après 10 j de contact en milieu P25 avec ou sans déchets de PVC amiantés à 25°C. Les quantités de déchets de PVC amiantés se réfèrent au tableau X et la quantité 1 est en jaune et la 2 en bleu. Le milieu stérile est en gris.

4.1.2 Dosage de l'activité laccase

Dans un second temps, l'activité laccase, enzyme connue pour être impliquée dans la dégradation de la lignine constituant le bois, a été mesurée dans les surnageants de culture, aussi appelés sécrétomes (**Figure 99).** *S. lacrymans* et *P. chrysosporium* ne présentent aucune activité laccase. L'activité la plus importante est obtenue pour *T. versicolor* et plus la quantité de PVC augmente, plus l'activité laccase de la souche est importante pour atteindre plus de 7 nkatal/mL de sécrétome. Ainsi, même si la quantité 2 de PVC avait tendance à induire moins de croissance chez *T. versicolor*, son activité laccase reste stimulée et importante.

Ainsi, *T. versicolor* est la plus pertinente à utiliser pour induire une dégradation du PVC amianté, de par sa croissance importante et son activité laccase stimulée avec l'augmentation de la quantité de PVC amianté. *P. chrysosporium* reste tout de même un champignon d'intérêt puisqu'elle présente une croissance très importante et a déjà été décrite comme utilisant le PVC comme seule source de carbone

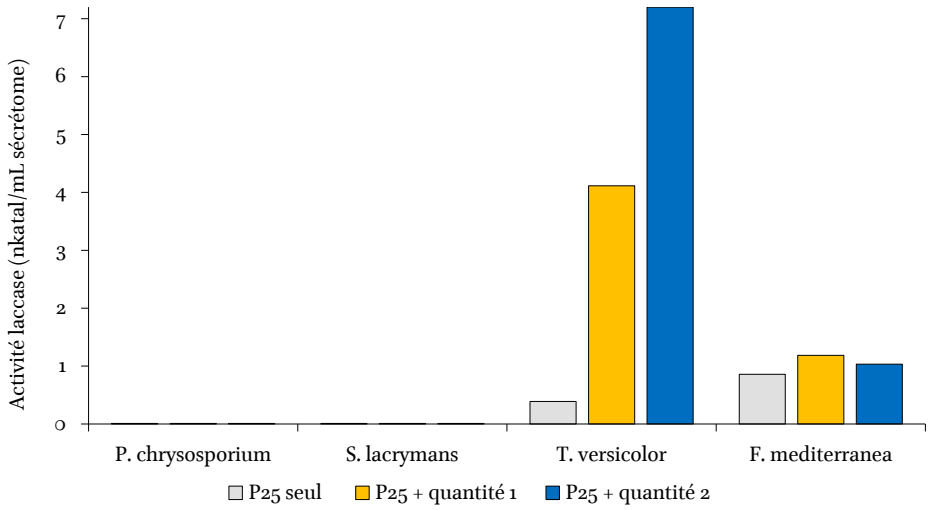


Figure 99 : Activités laccases des basidiomycètes après 10 j de contact en milieu P25 avec ou sans déchets de PVC amiantés. Les quantités de déchets de PVC amiantés se réfèrent au tableau X et la quantité 1 est en jaune et la 2 en bleu. Le milieu stérile est en gris. Les activités laccases sont mesurées sur le surnageant de culture et sont rapportées au volume de sécrétome

Les travaux ont donc été poursuivis avec *T. versicolor* présentant l'activité enzymatique la plus importante. Une cinétique avec des prélèvements de sécrétome réalisés après 3, 6 et 11 j de contact avec du PVC amianté a été réalisée. Cependant, une contamination a eu lieu entre le 6ème et le 11ème jour de culture et seuls les deux premiers temps sont donc exploitables et présentés en **Figure 100**. Une activité laccase est détectée chez *T. versicolor* dans le milieu P25 à partir de 6 jours de culture. L'ajout de PVC amianté dans le milieu P25 induit une production de laccases par la souche dès le 3ème jour de culture. Après 6 j de culture, l'activité laccase est 8 fois plus importante en présence de PVC amianté qu'en milieu P25. Entre le 3ème et le 6ème jour de culture, l'activité laccase de *T. versicolor* a été multipliée par 1,25. On remarque qu'un facteur 10 sépare ces données de celles obtenues pour la première expérience (**Figure 99**) Il est difficile d'expliquer cette différence considérable mais nous pouvons émettre l'hypothèse de l'impact de la durée d'incubation. En effet, la souche a été cultivée 4 jours de moins en présence de déchets amiantés dans la 2ème expérience et ces 4 jours peuvent être suffisants au champignon pour accroître sa biomasse, et donc sa production de laccases de façon significative. Malheureusement, la deuxième expérience ayant été contaminée après le 6ème jour, nous n'avons pas pu récolter le champignon après l'incubation afin de calculer sa masse sèche.

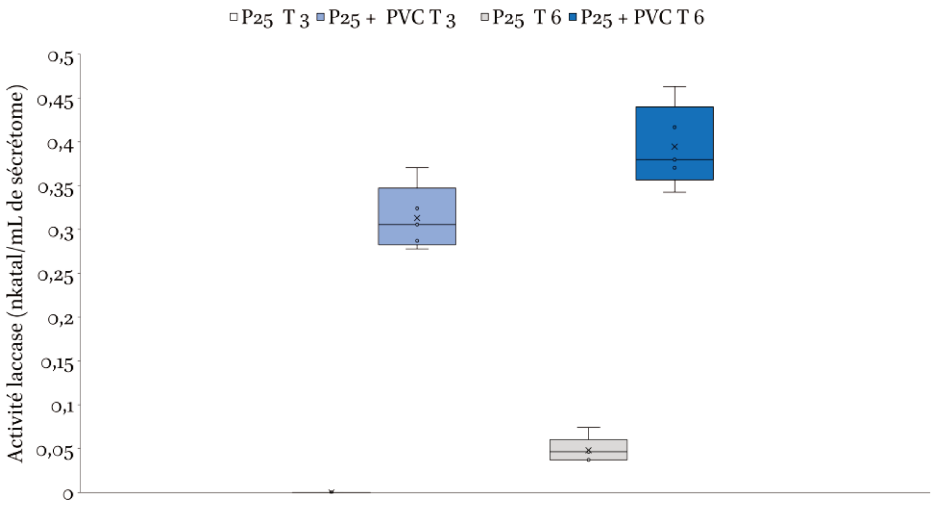


Figure 100 : Activité laccase de *Trametes versicolor* après 3 et 6 jours de contact en milieu P25 avec ou sans déchets de PVC amiantés. La masse de PVC ajoutée est de 386 mg en moyenne. Le milieu stérile est en gris et le milieu contenant du PVC est en bleu clair pour T3 j et en bleu foncé pour T6 j.

Ces expériences exploratoires nous ont permis de déterminer que les déchets de PVC amiantés ne représentent pas de toxicité pour l'ensemble des champignons testés qui sont capables de se développer dans le milieu P25 supplémenté. *P. chrysosporium* et *T. versicolor* représentent les deux souches les plus pertinentes pour les futures expériences de dissolution de matrice organique par voie biologique. En effet, *P. chrysosporium* présente une croissance importante et a déjà été impliqué dans la dégradation du PVC (Ali *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2014; Khatoon *et al.*, 2019). *T. versicolor* présente une activité laccase importante et est stimulée en présence de PVC amiantés. Il serait intéressant d'investiguer la production lignine peroxydases de *P. chrysosporium* puisque cette enzyme serait impliquée dans l'utilisation du PVC comme source de carbone (Khatoon *et al.*, 2019).

4.1 Altération biologique par voie fongique en milieu solide

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité des champignons à croître directement sur le PVC amianté en milieu solide. Les souches sont précultivées sur du milieu malt-agar solide afin de former un tapis puis des échantillons calibrés d'environ 1 cm^2 de PVC amiantés sont ajoutés sur le

dit tapis. La croissance est suivie sur 3 mois et les résultats sont présentés après 9 jours ou 3 mois d'incubation en **Figure 103.** A partir de 9 jours d'incubation, *T. versicolor* est capable de former un tapis duveteux plutôt fin sur toute la boîte et recouvrant les échantillons de PVC amiantés. Après 3 mois d'incubation, on voit que la souche a formé un tapis beaucoup plus dense et recouvre presque intégralement les déchets amiantés. En plus de pouvoir croître en présence des déchets de PVC amiantés, la souche est également capable de croître directement sur ce déchet puisqu'elle le recouvre entièrement. A l'opposé, après 9 jours d'incubation, *P. chrysosporium* a formé un tapis plutôt duveteux sur le milieu de culture mais le champignon ne s'est pas développé sur les échantillons. Après 3 mois d'incubation, aucun tapis n'est observable sur les échantillons de PVC amianté et le tapis préalablement présent en surface du milieu gélosé semble être désormais plus fin.

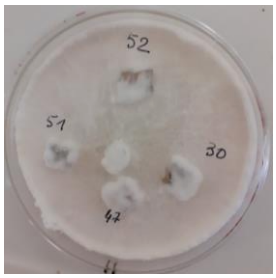
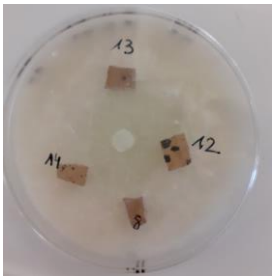
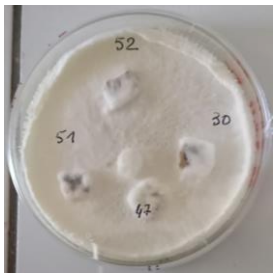
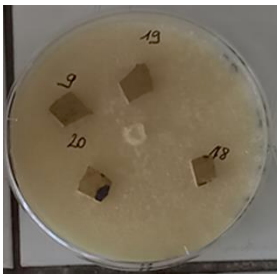
	Trametes versicolor	*Phanerochaete chrysosporium*
Incubation : 9 jours		
Incubation : 3 mois		

Figure 101 : Observation de *Trametes versicolor* ou *Phanerochaete chrysosporium* après 9 j et 3 mois de croissance en milieu malt 2 % agar 3 % en présence d'échantillons de déchets de PVC amiantés. Les champignons sont déjà cultivés sur les boîtes durant 6 jours puis les échantillons de PVC sont ajoutés après avoir été pesés.

Après ces trois mois d'incubation, les champignons sont séchés, retirés des échantillons de PVC puis les déchets de PVC amiantés sont pesés afin d'estimer le pourcentage de perte de masse induit par la présence des champignons sur le milieu de culture solide. Les pourcentages de perte de masse des échantillons de PVC sont présentés en **Figure 102.** Les deux champignons induisent une perte

de masse des échantillons cependant celle-ci reste relativement faible (0,28 % en moyenne pour *T. versicolor* et 0,11 % pour *P. chrysosporium*). Cela permet d'émettre une fois de plus l'hypothèse que *P. chrysosporium*, bien que ne colonisant pas directement les échantillons, est capable de produire des molécules, surement des enzymes, permettant de dégrader le PVC amianté. Ainsi, les deux souches sont capables d'induire une perte de masse du PVC amianté. Les souches sont ainsi capables d'attaquer les dalles vinyles amiantés, soit pour contrer une possible toxicité du déchet, soit afin d'y récupérer des nutriments essentiels à leur croissance. A ce niveau, il ne nous est cependant pas possible de conclure sur une attaque de la matrice de PVC ou d'un autre composant comme le carton par exemple.

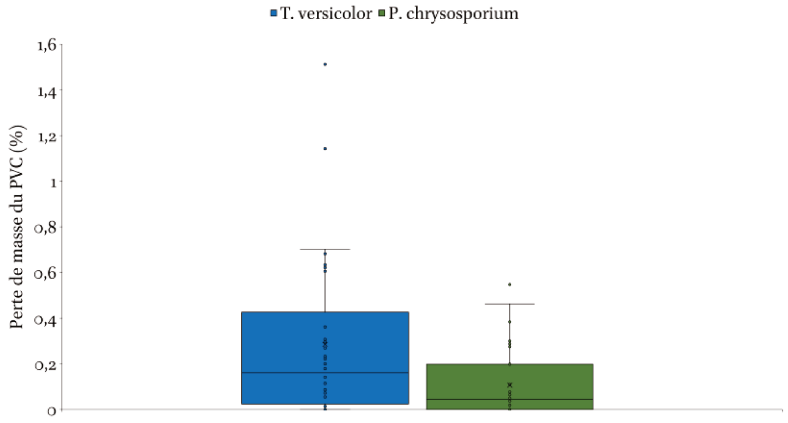


Figure 102 : Pourcentage de perte de masse des échantillons de PVC amiantés après 3 mois d'incubation avec *Trametes versicolor* (bleu) ou *Phanerochaete chrysosporium* (vert) en milieu malt 2 % agar 3 %

D'après ces premières explorations de la dissolution de dalles vinyles amiantées par voie biologique, *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* semblent être des candidates idéales qu'il serait intéressant d'étudier plus en détail. Ces résultats étant préliminaires, il serait intéressant de réaliser à nouveau des études d'altération en milieu liquide sur une durée importante de plusieurs mois. Cela permettrait à nouveau de réaliser une cinétique de dosage de l'activité laccases chez *T. versiolor* et d'identifier les enzymes produites par *P. chrysosporium*. Des études protéomiques pourraient ainsi être réalisées sur le sécrétome des champignons afin d'identifier l'ensemble des molécules produites à chaque moment de l'incubation et d'étudier de possibles

changements de production en fonction de la quantité de PVC amianté présente dans le milieu, entrainant une possible toxicité à long terme.

5 Matériel et Méthodes

5.1 Sécurité des manipulations

Toutes les expériences impliquant la manipulation d'amiante ont été menées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II en milieu liquide afin d'éviter toutes inhalation de fibres. Le manipulateur porte un masque FFP3 et des gants et les manipulations se déroulent dans un local dédié. La gestion des déchets solides et liquides a été respectée selon les normes en vigueur pour les déchets amiantés.

Toutes les expériences impliquant la manipulation de solvants volatiles sont réalisées sous hôte chimique ventilée conformément à la réglementation en vigueur. Le manipulateur porte un équipement de protection individuelle et un équipement de protection du visage. La gestion des déchets solides et liquides a été respectée selon les normes en vigueur.

5.2 Préparation des déchets de dalles vinyles amiantées

Les dalles vinyles amiantées sont issus d'un chantier de désamiantage privé. Concernant les expériences de dissolution chimique, les plaques PVC amiantés sont divisées en échantillons de 2,5 g. Pour la dissolution par voie biologique, les plaques de PVC amiantés sont réduites en morceaux de quelques mm à l'aide d'une pince coupante à l'exception des échantillons destinés à la dissolution biologique en milieu solide qui sont standardisés à 1 cm2. Avant utilisation, les déchets sont aliquotés puis autoclavés deux fois avant d'être séchés au four à 70 °C durant 2 semaines minimum.

5.3 Caractérisation des déchets de dalles vinyles amiantées

5.3.1 Caractérisation par microscopie électronique à transmission (MET)

La caractérisation du déchet et de ses composantes a également été réalisées par MET couplée à la spectroscopie par dispersion de rayons X (MET-EDS) en collaboration avec le Dr. Dris Ihiawakrim de l'ICPMS de Strasbourg. Le protocole utilisé est détaillé dans le chapitre précédent.

5.3.2 Caractérisation de la matrice de PVC par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La caractérisation par SEC du PVC a été réalisée en collaboration avec le Dr. Luc Averous de l'ICPEES de Strasbourg. Les masses molaires moyennes et nombre et masse (Mn, Mw) et la dispersité (Đ) ont été déterminées par SEC avec un appareil Acquity APC de Waters (USA) dans du THF à 40°C (0 ,6 mL/min). Trois colonnes (Acquity APC XT 450Å 2,5µm 4.6 × 150 mm, 200 et 45) ont été connectées. L'étalonnage a été fait en utilisant des normes de polystyrène (PS). L'analyse a été faite 2 fois.

5.4 Dissolution chimique des dalles vinyles amiantées

Les différentes étapes de la dissolution sont illustrées dans l'organigramme ci-dessous

5.4.1 Dissolution des déchets de PVC amianté par les solvants

Afin de dissoudre la matrice de PVC renfermant les fibres amiantées, des échantillons de 2,5 g de dalles vinyles amiantées sont dissous dans 25 mL de solvant durant 24 h à température ambiante (étape 1 de l'organigramme ci-dessous). Les solvants utilisés sont soit du THF (tétrahydrofurane) (Sigma-Aldrich™) pur ou un mélange THC/DMF (N,N-Diméthylformamide) (R.P. Normapur) dans un ratio 6:4. Le liquide obtenu est filtré sur un papier Whatman grâce à une filtration Büchner. Le filtre Büchner est relié à une pompe à vide ainsi qu'à un piège à vapeur de solvant rempli de carboglace et d'éthanol absolu afin de protéger la pompe. La filtration est répétée deux fois sur deux filtres en papier Whatman indépendants. Cette filtration permet d'obtenir un filtrat de PVC dissous

ainsi que plusieurs filtres sur lesquels se trouvent les fibres amiantées et les matrices non dissoutes (autres que PVC). Au filtrat contenant le PVC dissous, 2 volumes de méthanol (Carlo Erba) ont été ajoutés afin de reprécipiter le PVC pour des analyses ultérieures (étape 2 de l'organigramme ci-dessous).

5.4.2 Dissolution de la matrice blanche résiduelle

Après les étapes de dissolution du PVC et de filtration sur Büchner, on récupère les filtres en papier Whatman sur lesquels se trouvent les fibres amiantées. Cependant, ces fibres se trouvent toujours emprisonnées dans une matrice blanche. Pour dissoudre cette matrice, le papier filtre est alors divisé en plusieurs morceaux et immergé dans 20 mL de différentes solutions acides (HCl 0,1, 0,3, 0,5, 1 et 3 M ; acide acétique 0,5 et 1 M (soit 6 %) ; citrate 50 mM ou petit lait) dans un tube FALCON™ de 50 mL (étape 3 de l'organigramme ci-dessous, **Figure 105**). Après 2 heures de dissolution avec ou sans agitation, le surnageant est prélevé puis filtré sur filtre Millex 0,22 µM afin de récupérer le filtrat contenant la solution acide et la matrice blanche dissoute. La matrice non dissoute ainsi que les fibres amiantées restent dans le tube de réaction. Le pH, est mesuré sur le surnageant après la dissolution.

Le calcium extrait est dosé par méthode colorimétrique dont le protocole est décrit ci-dessous. A la fin de ces deux dissolutions, nous souhaitions conserver des fibres amiantées intactes afin de pouvoir les caractériser indépendamment de la matrice PVC originelle. Afin de s'assurer que les fibres amiantées sont intactes et n'ont donc pas été altérées par les réactifs utilisés, un dosage colorimétrique du fer est réalisé sur le surnageant d'après le protocole décrit dans le chapitre 3 précédent (étape 4 de l'organigramme ci-dessous). Le magnésium est également dosé grâce au protocole décrit dans le chapitre 3 précédent. Les différents composés obtenus après ces étapes de dissolution sont analysés par MET-EDS (étape 5 de l'organigramme ci-dessous).

5.4.3 Dosage colorimétrique du calcium

Lorsque le calcium est complexé avec l'Arsenazo III il forme un complexe de couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium. Les interférences du magnésium sont

éliminées par addition d'acide 8-hydroxyquinoléine-5-sulfonique. 100 mL de la solution de dosage sont préparés en amont de la façon suivante : à 88 mL d'H_2O purifiée (FranceEau) sont ajoutés 12 mL d'une solution d'Arsenazo III (TCI™) à 1 mM, 0,89 g de Na_2HPO_4, 2 H_2O et 0,113 g d'acide 8-hydroxyquinoléine-5-sulfonique (Sigma-Aldrich™). Le dosage est réalisé en microplaque 96 puits à fond plat où 1 puit contient 3 µL d'échantillon (surnageant filtré) et 300 µL de solution de dosage. Le milieu réactionnel est agité par aspiration refoulement puis incubé à température ambiante durant 5 min. La quantité de Ca^{2+} est estimée par lecture de l'absorbance à 650 nm au lecture de microplaque TECAN™.

5.4.4 Dosages colorimétriques du fer et du magnésium

Les dosages du fer et du magnésium sont réalisés sur les surnageants de dissolution de la matrice blanche en milieu acide afin d'estimer l'impact du traitement sur l'intégrité des fibres amiantées. Les protocoles utilisés sont décrits dans le **Matériel et Méthodes** du Chapitre 3 « Altération des déchets amiantés à matrices minérales : le flocage » de cette Partie II.

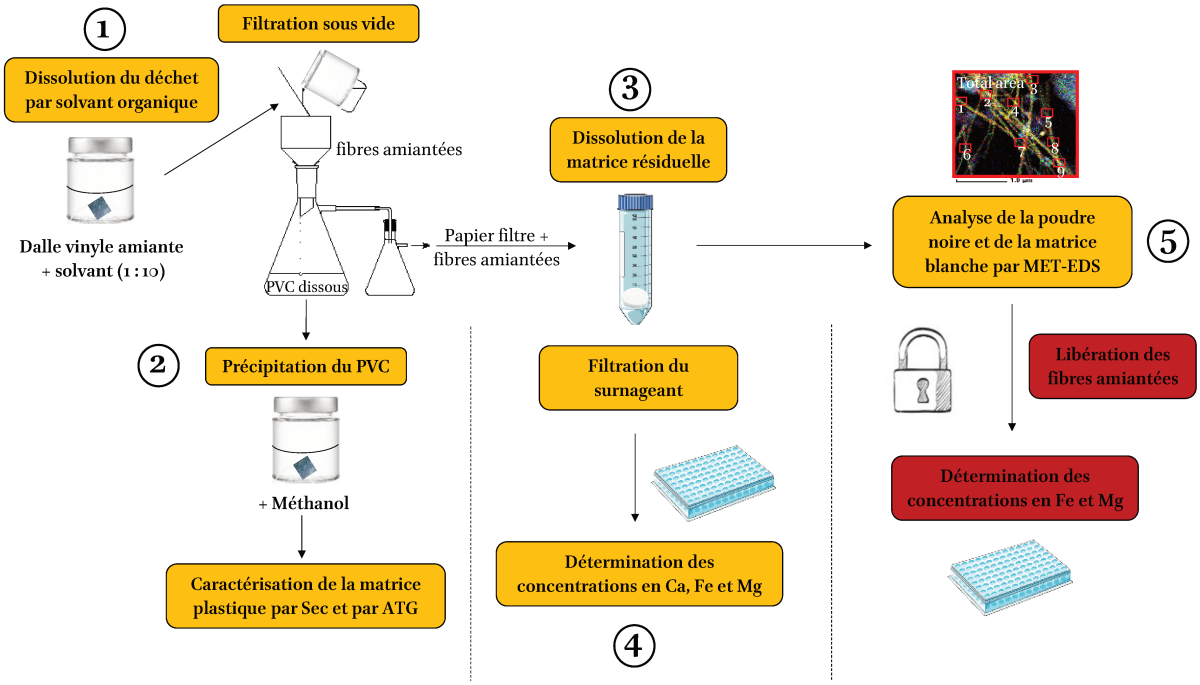


Figure 103 : Organigramme de la dissolution chimique des échantillons de dalle vinyles amiantées

5.5 Dissolution thermique des dalles vinyles amiantées

Les expériences préliminaires de dissolution thermique ont été menées en collaboration avec Eric Pelt, ingénieur de recherche à l'Institut Terre et Environnement de Strasbourg (ITES). La dissolution par pyrolyse des échantillons de dalle vinyles amiantées a été réalisée graduellement afin d'éviter de dégrader les fibres amiantées. La perte de masse des échantillons est suivie tout au long de la pyrolyse. Les échantillons ont dans un premier temps été chauffé graduellement dans un bécher en Pyrex recouvert d'aluminium jusqu'à 500 °C en augmentant de 100 °C toutes les 20 min à partir de 200 °C. Une fois les 550 °C atteins graduellement, la température est maintenue durant 14 h afin d'améliorer la perte de masse. L'aluminium est ensuite retiré du bécher pour continuer la pyrolyse jusqu'à 700 °C puisque son point de fusion est prévu à 660 °C. Après avoir maintenu une température de 700 °C et afin de ne pas faire fondre le Pyrex, les échantillons sont alors placés dans un creuset en alumine pour la suite de la pyrolyse puisque les étapes précédentes n'ont pas permis d'obtenir des fibres amiantées libérées de toute matrice. La température est ensuite élevée jusqu'à 800 °C puis 900 °C et enfin 1000 °C afin d'essayer de calciner la totalité du déchet, fibres amiantées comprises.

5.6 Dissolution biologique des dalles vinyles amiantées

Toutes les souches proviennent de l'équipe du Dr. Morel-Rouhier à Nancy. Tous les champignons sont précultivés sur milieu gélosé malt agar (Composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 20 g malt ; 30 g agar) afin de former un tapis dense qui formera ainsi la boîte stock. De ces boîtes stock sont prélevés des patchs à l'emporte-pièce afin d'inoculer les différents milieux de cultures.

5.6.1 Culture des champignons en milieu liquide en présence de PVC amianté

Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans des erlenmeyer de 100 mL contenant chacun 10 mL de milieu P25 stérile (Composition pour 1 l d'eau déminéralisée : 20 g glucose ; 1 g KH_2PO4 ; 5 g $MgSO_4$; 3 g $C_4H_4O_6$, 2 NH_3 ; 5 g $C_{12}H_{22}O_{11}$; 2 mL thiamine en solution à 6 mg /30 mL ; 2 mL de mélange Kanieltra (10 mg/l $MnCl_2$; 12 mg/l $FeSo_4$, 7 H_2O ; 4,56 mg/l $ZnSo_4$, 7 H_2O ; 1.24 mg/l CuCl2 ; 16,88 mg/l H_3BO_3 ; 1,40 mg/l $NaMoO_4$, 2 H_2O). Les milieux sont ensemencés grâce à un patch de culture stock de

chaque champignon ajouté dans les erlenmeyers. Les champignons sont précultivés durant 4 jours à 27 °C sans agitation. Une fois que les champignons se sont suffisamment développé, les échantillons de PVC amianté stériles sont ajoutés au milieu dans différentes quantités répertoriées dans le tableau ci-dessous. La culture est ensuite prolongée durant 10 j dans les mêmes conditions.A différents temps d'incubation, des échantillons de sécrétome sont prélevés afin d'y mesurer l'activité laccase de chaque champignon. A la fin de la période d'incubation, les échantillons de PVC amiantés sont récupérés puis séchés. Les champignons sont alors retirés de l'échantillons puis leur masse sèche est déterminée par une pesée sur une balance de précision.

Tableau 5 : Quantités de PVC utilisées pour la mise au point de la dissolution des dalles vinyles amiantées en milieu liquide

Quantité de PVC (mg)	*P. chrysosporium*	*S. lacrymans*	*T. versicolor*	*F. mediterranea*
Quantité 1	169	166	168	177
Quantité 2	372	354	355	355

5.6.2 Culture des champignons en milieu solide en présence de PVC amianté

De façon identique aux cultures liquide, les milieux gélosés malt agar sont ensemencés grâce à un patch de champignon puis incubés à 25 °C durant 6 jours afin d'obtenir un tapis de champignon dense sur l'ensemble du milieu. Les échantillons de PVC amianté stériles sont pesés sur une balance de précision avant d'être numérotés et disposé sur les milieux contenant les champignons. Les boîtes sont alors à nouveau incubées à 25 °C pour une durée totale de 3 mois et observées à 9 jours et 3 mois d'incubation. A la fin de l'incubation, les échantillons de PVC amianté sont à nouveau séchés, débarrassés des champignons puis pesés avec précision afin de déterminer leur pourcentage de perte de masse.

5.6.3 Mesure de l'activité laccase

Les activités enzymatiques ont été mesurées sur le sécrétome, soit le surnageant de culture. Pour cela, 1 ml de chaque surnageant de culture est prélevé puis centrifugé à 10 000 x g pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et utilisé dans des dosages enzymatiques. L'activité de type laccase a été

testée en suivant l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS ; Sigma-Aldrich). 20 µL de surnageant de culture sont ajoutés à 130 µL d'ABTS à 0,1 % dans un tampon citrate-phosphate 100 mM à pH 5. La densité optique est mesurée à 420 nm après 30 min d'incubation à 30 °C.

Partie III

Discussion et perspectives

La nécessité de traiter les déchets amiantés avec des procédés éco-responsables permettant d'inhiber leur dangerosité est primordiale pour préserver notre environnement et notre santé dans les années futures. L'enfouissement de ces déchets, moins coûteux, soulève des questions sur les conséquences pour la santé des sols et des générations futures. Dans le contexte « OneHealth », est-il justifiable de sacrifier la santé de notre environnement pour des raisons économiques ? Ne vaudrait-il pas mieux investir un peu plus pour arrêter de polluer une planète déjà en souffrance ? Il est ainsi du devoir de notre génération de se questionner sur l'utilisation de l'enfouissement, certes peu onéreux et simple à mettre en place mais présentant un impact négatif indéniable pour les générations à venir. Une autre option en développement est l'utilisation de la voie chimique qui considère avoir éliminé l'amiante lorsque la totalité des fibres est dissoute. Cette voie dissout ainsi efficacement les déchets mais ne permet pas d'envisager une revalorisation ultérieure des fibres. A l'opposé, un traitement biologique offre une solution intéressante en terme d'inhibition de la toxicité des déchets et d'une utilisation avec peu de contraintes (pas de site Cevezo, pas d'acides ou bases fortes, pas de montée en température et de pression). Bien qu'il soit sans aucun doute plus coûteux que l'enfouissement, il permet, entre autres, de revaloriser les fibres de silice obtenues à l'issu du procédé.

Concernant les déchets de dalle vinyles amiantées, les résultats préliminaires sont prometteurs et nous ont permis de mettre en avant les capacités du PVC amianté à stimuler la croissance des deux souches de basidiomycètes, laissant supposer qu'elles l'utilisent pour répondre à leurs besoins. Lorsque l'on fait référence à des souches fongiques capables de dégrader différentes matrices plastiques il s'agit le plus souvent de moisissures tels *qu'Aspergillus* (Gaur 2020). Les avancées de ce travail de thèse ouvrent donc la voie aux basidiomycètes pour la dégradation et tout est encore à découvrir concernant les PVC amiantés plus précisément. Les différentes enzymes impliquées dans la dégradation du PVC amianté, autres que les laccases, sont encore à identifier et, par exemple, il serait intéressant d'investiguer le rôle de la lignine peroxydase produite par *P. chrysosporium*, décrite comme participant à l'utilisation du PVC comme source de carbone (Khatoon *et al.*, 2019). Cette utilisation du PVC comme source de nutriments peut également faire appel à une combinaison d'activités enzymatiques qu'il reste à découvrir. Enfin, un broyage préalable des déchets permettrait

surement d'augmenter l'altération par les microorganismes, en analogie avec les déchets de fibrociment, augmentant ainsi la surface spécifique de contact (David, 2019). En somme, cette voie de dégradation biologique constitue un sujet majeur puisque le PVC représente le 2ème tonnage déchet amianté le plus important. Cette matière plastique étant encore utilisée actuellement à grande échelle, ces alternatives biologiques sont susceptibles d'intéresser de nombreux acteurs et pas seulement la filière de traitement des déchets à risque.

La première étape du procédé biologique sur les déchets de flocage à matrice minérale consiste en un traitement par voie acide, notamment grâce à l'utilisation du petit lait, un déchet de l'industrie alimentaire. Cette approche s'inscrit dans un cercle vertueux de valorisation des déchets, contribuant à réduire l'impact environnemental lié à la production de déchets et à l'utilisation des ressources naturelles. L'inoculation de *Lactobacilles* en milieu petit lait permet d'une part de maintenir un pH acide favorable à la dissolution des fibres de chrysotile, mais d'autre part contribue à la dissolution des matrices minérales, conséquence particulièrement intéressante dans le cas des fibrociments. En effet, contrairement au flocage, les amiantes sont piégés dans la matrice cimentaire, rendant impossible le traitement spécifique par les sidérophores. De plus, les bactéries lactiques n'ont pas besoin de fer pour leur croissance, ce qui rend ce procédé particulièrement adapté pour la revalorisation du fer libéré des fibres et restant en solution. Ce traitement pourrait être suffisant pour inhiber la toxicité du déchet compte tenu qu'il contribue non seulement à dégrader les matrices minérales mais aussi les fibres. Nous avons optimisé ce processus par la sélection des espèces de bactéries lactiques et il faudra dans le futur le transposer dans un bioréacteur afin d'améliorer, en culture continue, ce procédé

La seconde solution envisagée permet d'améliorer l'extraction spécifique du fer potentiellement encore mobilisable au niveau des couches internes des fibres, grâce aux *Pseudomonas* producteurs de pyoverdine. La forte affinité de la pyoverdine pour le fer permet ainsi une complexation spécifique d'atomes de fer au sein des fibres d'amiante. De plus, comme les bactéries lactiques, les *Pseudomonas* sont dépendants de la présence du magnésium pour leur croissance, élément issu de la couche externe de brucite $Mg(OH)_2$ des fibres de chrysotile. Cette dissolution va contribuer à la

déstructuration des fibres et avoir un effet synergique avec l'extraction du fer par les sidérophores. Néanmoins, la régulation du système pyoverdine a constitué un frein au processus compte tenu des faibles besoins en fer des bactéries.

Afin d'éviter la répression de la production de pyoverdine par le fer et de produire ainsi de la pyoverdine en présence des amiantes, des souches de *Pseudomonas* ont été ingénieriées durant mes travaux de thèse. Dans un premier temps, le mutant *Pseudomonas aeruginosa* PaM1 a permis de démontrer l'augmentation de l'altération des déchets de flocage en permettant une extraction plus importante du fer comme du magnésium des déchets. Dans une perspective de bioremédiation, l'objectif est d'optimiser la synthèse de la pyoverdine chez *Pseudomonas putida* KT2440, une souche environnementale. Dans un premier temps, nous avons construit 2 types de mutants dans lesquels l'activateur transcriptionnel des gènes de biosynthèse de la pyoverdine PvdS, normalement inhibé par la présence de fer, a été mis sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose ou d'un promoteur constitutif, remplaçant ainsi la région de régulation par le fer (Fur-box). Bien que ces premières constructions ne nous aient pas permis d'obtenir un mutant capable de produire d'assez grandes quantités de pyoverdine en présence de fer, elles ont permis de confirmer l'hypothèse que les systèmes PVD sont régulés différemment chez PAO1 et KT2440. Cela ouvre des perspectives intéressantes dans la compréhension du système pyoverdine chez *P. putida,* système moins bien connu à ce jour.

La délétion du régulateur Fur impliqué dans la répression de la voie pyoverdine en réponse à la présence de fer a permis d'évaluer le rôle de ce régulateur sur le métabolisme central de *P. putida* KT2440. Ce mutant décrit pour la première fois pour l'espèce *P. putida,* a prouvé que cette bactérie est viable en l'absence de ce régulateur, même si nous avons montré qu'un deuxième phénotype apparaissait en milieu riche. Malgré le fait que le régulateur Fur soit impliqué dans la résistance au stress oxydatif auquel pourrait être soumise les cellules en contact avec les amiantes, la souche PP_Δ*fur* n'a montré aucune difficulté à croître en présence de déchets de flocage et permet une extraction légèrement supérieure de fer et de magnésium par rapport à la souche KT2440 WT.

Le procédé d'altération des déchets amiantés requérant de nombreux cycles d'altération puisque les limites d'extraction n'ont toujours pas été atteintes, le risque potentiel est de voir le mutant

PP_Δ*fur* acquérir des mutations dans son système pyoverdine. Une perspective serait alors d'utiliser une stratégie identique afin de conférer d'autres fonctions à PP_Δ*fur* permettant de le stabiliser. Par exemple, une surexpression des ferritines pourrait permettre à la souche de stocker plus de fer. Sa production de pyoverdine pourrait peut-être être également améliorée grâce à l'utilisation efficace de diverses sources de carbone (Mendonca *et al.*, 2020). Le scale up vers un bioréacteur peut également permettre de restreindre l'accumulation de fer dans le milieu compte tenu de l'apport en continu de milieu durant l'altération.

Enfin, si on se permet de visualiser les cellules comme des usines nous permettant de produire ce que l'on désire par biologie synthétique, des essais pourraient être réalisés afin d'intégrer chez PP_Δ*fur* le métabolisme fermentaire des souches de *Lactobacilles* précédemment utilisée (Angermayr and Hellingwerf, 2013; Kumar and Prasad, 2011; Li *et al.*, 2020). Cela nous permettrait ainsi d'obtenir des souches capables de se développer et de produire de la pyoverdine ou un autre sidérophore dans un milieu dont le pH est maintenu très bas afin d'améliorer l'altération des déchets amiantés.

Même si nos résultats ont montré que la dissolution la plus importante du fer et du magnésium des déchets amiantés est réalisée par le petit lait-bactéries lactiques, qui extrait la majeure partie de ces métaux, ces données ne remettent pas en question l'intérêt des bactéries productrices de pyoverdine dans l'altération de déchets amiantés puisqu'elles peuvent compléter ce processus en extrayant spécifiquement le fer insoluble, en particulier le fer situé dans les couches plus internes des fibres amiantées structurées en feuilles de cigare. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes en jeu et évaluer l'impact réel de la pyoverdine sur l'extraction du fer des déchets de flocage. En effet, une cartographique serait indispensable car le chrysotile ne contenant pas de fer dans sa structure théorique, il est difficile de savoir où se sont faites les substitutions au cours de la genèse des fibres dans le sol ainsi que sous quel état d'oxydation se trouve le métal.

Les premières explorations de MET *in situ* en milieu liquide réalisées dans le cadre de ces travaux de recherche ont permis d'observer une fibre de CHR-Gy en milieu CAA-Mg ainsi qu'une cellule de

KT2440 et son flagelle. Ces observations préliminaires nous ont ainsi permis de déterminer les conditions de croissance et d'observation optimales mais doivent être encore investiguées afin d'observer PP_Δ*fur* qui semble être plus sensible au faisceau d'électrons. Après cette étape d'optimisation, ces avancées nous permettront, par la suite, de déterminer si un contact entre les bactéries et les fibres est nécessaire à l'altération et si un site de contact membranaire est privilégié. En effet, ces mécanismes généraux d'interactions entre les organismes et divers minéraux sont très peu décrits à ce jour. Une banque d'échantillons bien caractérisés devra être constituée afin de tester les approches développées et de comprendre les mécanismes d'altération. Ces stratégies pourront être testées sur les déchets de fibrociment, constituants la majorité des déchets stockés.

Somme toute, de nombreuses questions subsistent concernant le rôle des *Pseudomonas* et des sidérophores dans la dissolution du magnésium. Les différentes souches présentent en effet une différence de dépendance vis-à-vis du magnésium mais nous n'avons pas déterminé le rôle des bactéries sur la dissolution du magnésium des déchets de flocage.

En parallèle, il serait judicieux de mettre au point un test de cytotoxicité pour évaluer l'effet des traitements biologiques sur les fibres d'amiante avant et après traitement. Nous sommes partis du postulat que 100% du fer présent devait être extrait afin d'inhiber la toxicité de ces derniers et qu'ils ne présentent plus les caractéristiques spectrales des amiantes lors de l'analyse aux diffractions des rayons X. Cependant, aucune donnée n'existe sur la quantité de fer au sein des fibres entrainant des effets cytotoxiques. Si un test de toxicité pouvait être un indicateur de la toxicité des déchets après traitement, une altération complète pourrait ne pas être nécessaire. Il pourrait s'agir, par exemple de quantifier les ROS induits par les amiantes en présence de macrophages péritonéal de souris (Mohanty *et al.*, 2018) ou de détecter de la production de COO^- après incubation des fibres avec du formate de sodium (Daghino *et al.*, 2006). Cela permettrait alors définir des indicateurs d'altération à suivre durant le processus, comme par exemple la concentration en fer ou en magnésium, qui pourrait être modélisé afin de prédire la fin des cycles d'altération.

La littérature s'est enrichie depuis ces dernières années d'études mettant en jeu des micro-organismes possédant des métabolismes divers, des moisissures puis de nos recherches sur les *Pseudomonas* mettant en avant le rôle des sidérophores et dernièrement de l'utilisation de bactéries acidophiles telles que les *Acidithiobacillus thiooxidans* (Borges *et al.*, 2022). Aucune publication n'a à ce jour décrit la dégradation des déchets amiantés par des bactéries ferri-réductrices telles que *Paenibacillus* sp. (Loyaux-Lawniczak *et al.*, 2019) ou les bactéries fermentaires du genre *Shewanella*, qui utilisent le fer ferrique des minéraux comme accepteur terminal d'électrons et peuvent ainsi solubiliser des oxydes bien cristallisés comme la goethite ou moins bien cristallisé comme la ferrihydrite. La voie biologique recèle encore d'atouts qui pourraient être des solutions à explorer dans les années futures.

A ce jour, et enrichi des résultats obtenus au cours de mon doctorat, voici les différentes étapes de la mise en place d'un procédé de bioremédiation de déchets de flocage à matrice minérale envisagée :

1. Broyage des déchets de flocage en milieu liquide petit lait afin d'éviter la dissémination des fibres.
2. Transferts des déchets broyés dans la cuve d'un bioréacteur qui sera ensemencée avec *L. rhamnosus*. Cette étape préliminaire permet ainsi d'altérer la matrice de gypse et de dissoudre la majorité du magnésium contenu dans les couches de brucite externes grâce aux différents acides organiques du petit lait, entrainant ainsi la libération de quantités considérables de fer.
3. Lorsque la limite d'extraction est atteinte, transferts des déchets prétraités vers un second bioréacteur contenant un milieu de culture minimum permettant une production de pyoverdine optimale par PP_Δ*fur* désormais stabilisé.
4. Traitement des effluents comme dans une station d'épuration en ce qui concerne la biomasse, suivant la réglementation en vigueur, après en avoir extrait les différents métaux dans une visée de valorisation
5. Caractérisation des fibres résiduelles par META grâce à une société agrémentée afin de conclure sur l'efficacité du traitement qui viserait pour le moment, pour rappel, une

élimination totale du fer. Si des fibres d'amiantes sont encore présentes, un traitement chimique par des acides organiques faibles (acide citrique par exemple) pourra alors être envisagé. Si au contraire, il s'agit de fibres de silice de bonne qualité, comme cela a été démontré après des attaques en acide nitrique, elles pourront alors être revalorisées dans l'industrie chimique comme catalyseur ou dans le BTP en tant qu'additif dans le béton par exemple.

Il est cependant important de garder en mémoire que l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (tels que PP_Δ*fur*) reste controversée. En effet, l'utilisation d'OGM dans la bioremédiation soulève des préoccupations liées à la sécurité environnementale et à la propagation des organismes modifiés dans les écosystèmes. De plus, il y a, dans notre société, des inquiétudes quant aux possibles effets négatifs des OGM sur la santé humaine et des questions se posent sur la possibilité de transfert de gènes entre les OGM et d'autres organismes, y compris des organismes indigènes. En raison de ces préoccupations, il est important de mener des études approfondies sur les impacts potentiels des OGM utilisés dans notre procédé de bioremédiation avant leur utilisation bien qu'ils ne soient pas destinés à être retrouvés dans l'environnement. Des protocoles de confinement et de suivi doivent être mis en place suivant la réglementation en vigueur pour minimiser les risques de dissémination des OGM.

Pour conclure, si le procédé de bioremédiation développé dans l'équipe et optimisé dans ce projet aboutit, cela permettrait de ne plus stocker une large majorité des déchets amiantés générés mais également d'éliminer les déchets stockés depuis bientôt 30 ans.

Références bibliographiques

Ahmad, T., Wani, I.A., Lone, I.H., Ganguly, A., Manzoor, N., Ahmad, A., Ahmed, J., Al-Shihri, A.S., 2013. Antifungal activity of gold nanoparticles prepared by solvothermal method. Materials Research Bulletin 48, 12–20.

Ali, M. I., Ahmed, S., Javed, I., Ali, N., Atiq, N., Hameed, A., Robson, G., 2014. Biodegradation of starch blended polyvinyl chloride films by isolated *Phanerochaete chrysosporium* PV1. Int. J. Environ. Sci. Technol. 11, 339–348.

Ali, Muhammad Ishtiaq, Ahmed, S., Robson, G., Javed, I., Ali, N., Atiq, N., Hameed, A., 2014. Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates. Journal of Basic Microbiology 54, 18–27.

Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S., 2021. Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. Science of The Total Environment 759, 143536.

Angermayr, S.A., Hellingwerf, K.J., 2013. On the Use of Metabolic Control Analysis in the Optimization of Cyanobacterial Biosolar Cell Factories. J. Phys. Chem. B 117, 11169–11175.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Höfte, M., 2002. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. MPMI 15, 1147–1156.

Aznar, A., Dellagi, A., 2015. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? Journal of Experimental Botany 66, 3001–3010.

Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp.

Balducci, G., 2012. Process for treating an asbestos containing material. 2428254A1.

Barbalace, R.C., 2004. Asbestos, its Chemical and Physical Properties: Second in a series of articles on asbestos: Its history, chemical and physical properties, uses, health hazards and the legal implications of asbestosis & mesothelioma. (EnvironmentalChemistry.com) https://environmentalchemistry.com/yogi/environmental/asbestosproperties2004.html (accessed 11.16.22).

Barton, H.A., Johnson, Z., Cox, C.D., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 1996. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. Molecular Microbiology 21, 1001–1017.

Baune, M., Qi, Y., Scholz, K., Volmer, D.A., Hayen, H., 2017. Structural characterization of pyoverdines produced by *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas* taiwanensis VLB120. Biometals 30, 589–597.

Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., Lamont, I.L., 2003. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. Molecular Microbiology 47, 195–207.

Belardi, G., Piga, L., 2013. Influence of calcium carbonate on the decomposition of asbestos contained in end-of-life products. Thermochimica Acta 573, 220–228.

Belda, E., van Heck, R.G.A., José Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C., Klenk, H.-P., Petersen, J., Morgat, A., Nikel, P.I., Vallenet, D., Rouy, Z., Sekowska, A., Martins dos Santos, V.A.P., de Lorenzo, V., Danchin, A., Médigue, C., 2016. The revisited genome of *Pseudomonas*

putida KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. Environmental Microbiology 18, 3403–3424.

Beneš, M., Plaček, V., Matuschek, G., Kettrup, A., Györyová, K., Balek, V., 2006. Characterization of PVC cable insulation materials and products obtained after removal of additives. Journal of Applied Polymer Science 99, 788–795.

Bonneau, A., Roche, B., Schalk, I.J., 2020. Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. Sci Rep

Bordebeure, S., 2017. Déchets amiantés. ADEME 9.

Borges, R., Klaic, R., Farinas, C.S., Ribeiro, C., 2022. Biological treatment of asbestos cement wastes by *Aspergillus niger* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. Applied Clay Science 216, 106375.

Bouharoun, S., Leklou, N., Mounanga, P., 2015. Use of asbestos-free fiber-cement waste as a partial substitute of Portland cement in mortar. Mater Struct 48, 1679–1687.

Braun, V., Killmann, H., 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. Trends in Biochemical Science 24, 104–109.

Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., Cobessi, D., 2007. A β Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. Structure 15, 1383–1391.

Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., Guillon, L., Hannauer, M., Page, A., Schalk, I.J., 2012. An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. ACS Chemical Biology 2036–2045.

Butcher, B.G., Bronstein, P.A., Myers, C.R., Stodghill, P.V., Bolton, J.J., Markel, E.J., Filiatrault, M.J., Swingle, B., Gaballa, A., Helmann, J.D., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., 2011. Characterization of the Fur Regulon in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 ▿. J Bacteriol 193, 4598–4611.

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species 3, 3–8.

Cai, Z., Yang, F., Shao, X., Yue, Z., Li, Z., Song, Y., Pan, X., Jin, Y., Cheng, Z., Ha, U.-H., Feng, J., Yang, L., Deng, X., Wu, W., Bai, F., 2022. ECF Sigma Factor HxuI Is Critical for In Vivo Fitness of *Pseudomonas aeruginosa* during Infection. Microbiology Spectrum 10, e01620-21.

Campopiano, A., Cannizzaro, A., Olori, A., Angelosanto, F., Ramires, D., Basili, F., Gargaro, G., Massera, S., Novembre, G., Cavariani, F., Brizi, F., Francesco, M.D., Castri, G., Chiodo, A., Bruni, B., Iavi*coli*, S., 2021. Asbestos containing materials in schools of Rome and surrounding area (Italy). Ind Health 59,

Caza, M., Kronstad, J.W., 2013. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3.

Cha, J.Y., Lee, J.S., Oh, J.-I., Choi, J.W., Baik, H.S., 2008. Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas* syringae pv. tabaci 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. Biochemical and Biophysical Research Communications 366, 281–287.

Chan, D.C.K., Burrows, L.L., 2022. *Pseudomonas aeruginosa* FpvB Is a High-Affinity Transporter for Xenosiderophores Ferrichrome and Ferrioxamine B. Bacteriology 14.

Clevenger, K.D., Mascarenhas, R., Catlin, D., Wu, R., Kelleher, N.L., Drake, E.J., Gulick, A.M., Liu, D., Fast, W., 2017. Substrate Trapping in the Siderophore Tailoring Enzyme PvdQ. ACS Chem Biol 12, 643–647.

Cook, T.B., Rand, J.M., Nurani, W., Courtney, D.K., Liu, S.A., Pfleger, B.F., 2018. Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 45, 517–527.

Cornelis, P., Bodilis, J., 2009. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent *pseudomonads*. Environmental Microbiology Reports 1, 256–262.

Cornelis, P., Dingemans, J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3.

Cornelis, P., Tahrioui, A., Lesouhaitier, O., Bouffartigues, E., Feuilloley, M., Baysse, C., Chevalier, S., 2023. High affinity iron uptake by pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple regulators besides Fur, PvdS, and FpvI. Biometals 36, 255–261.

Cornu, J.Y., Elhabiri, M., Ferret, C., Geoffroy, V.A., Jezequel, K., Leva, Y., Lollier, M., Schalk, I.J., Lebeau, T., 2014. Contrasting effects of pyoverdine on the phytoextraction of Cu and Cd in a calcareous soil. Chemosphere 103, 212–219.

Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A.M., Malone, M., Nicolaisen, M.H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., Bjarnsholt, T., 2020. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. APMIS 128, 220–231.

Daghino, S., Turci, F., Tomatis, M., Favier, A., Perotto, S., Douki, T., Fubini, B., 2006. Soil fungi reduce the iron content and the DNA damaging effects of asbestos fibers. Environ Sci Technol 40, 5793–5798.

Damien, A., 2016a. Guide du traitement des déchets - Réglementation et choix des procédés, Dunod. ed, Technique et ingénierie.

Damien, A., 2016b. Guide du traitement des déchets - 7e éd.: Réglementation et choix des procédés. Dunod.

Damron, F.H., Oglesby-Sherrouse, A.G., Wilks, A., Barbier, M., 2016. Dual-seq transcriptomics reveals the battle for iron during *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. Sci Rep 6, 39172.

Danko, A.S., Luo, M., Bagwell, C.E., Brigmon, R.L., Freedman, D.L., 2004. Involvement of Linear Plasmids in Aerobic Biodegradation of Vinyl Chloride. Appl Environ Microbiol 70, 6092–6097.

David, S.R., 2019. Altération de déchets amiantés par des bactéries et des sidérophores en vue du développement d'un procédé de bioremédiation. Strasbourg.

David, S.R., Fritsch, S., Forster, A., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., 2020a. Flocking asbestos waste, an iron and magnesium source for *Pseudomonas*. Science of The Total Environment 709, 135936.

David, S.R., Geoffroy, V.A., 2020. A Review of Asbestos Bioweathering by Siderophore-Producing *Pseudomonas*: A Potential Strategy of Bioremediation. Microorganisms 8, 1870.

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., Geoffroy, V.A., 2020b. Iron removal from raw asbestos by siderophores-producing *Pseudomonas*. Journal of Hazardous Materials 385, 121563.

David, S.R., Ihiawakrim, D., Regis, R., Geoffroy, V.A., 2020c. Efficiency of pyoverdines in iron removal from flocking asbestos waste: An innovative bacterial bioremediation strategy. J Hazard Mater 394, 122532.

David, S.R., Jaouen, A., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., 2021. Biodeterioration of asbestos cement by siderophore-producing *Pseudomonas*. Journal of Hazardous Materials 403, 123699.

Davies, J.C., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. Paediatric Respiratory Reviews 3, 128–134.

Dell'Anno, F., Vitale, G.A., Buonocore, C., Vitale, L., Esposito, F.P., Coppola, D., Sala, G.D., Tedesco, P., de Pascale, D., 2022. Novel Insights on Pyoverdine: From Biosynthesis to Biotechnological Application 23, 11507.

Dériot, G., Godefroy, J.-P., 2005. Le drame de l'amiante en France. Sénat.

Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., Kong, X., Hider, R.C., Cornelis, P., Cámara, M., Williams, P., 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. Chemistry & Biology 14, 87–96.

Donovan, S., Pickin, J., 2016. An Australian stocks and flows model for asbestos. Waste Manag Res 34, 1081–1088.

Douguet, D., Carteron, H., Janiaud, P., Pinhas, N., 1997. Effets sur la santé des principaux types d'exposition à l'amiante 451.

Edgar, R.J., Xu, X., Shirley, M., Konings, A.F., Martin, L.W., Ackerley, D.F., Lamont, I.L., 2014. Interactions between an anti-sigma protein and two sigma factors that regulate the pyoverdine signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 14, 287.

Escolar, L., Pérez-Martín, J., de Lorenzo, V., 1999. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. J Bacteriol 181, 6223–6229.

European Comission, 2018. Lignes directrices relatives aux audits de déchets avant les travaux de démolition et de rénovation des bâtiments.

Favero-Longo, S.E., Castelli, D., Fubini, B., Piervittori, R., 2009. Lichens on asbestos–cement roofs: Bioweathering and biocovering effects. Journal of Hazardous Materials 162, 1300–1308.

Fillat, M.F., 2014. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. Archives of Biochemistry and Biophysics 546, 41–52.

Francis, J., Macturk, H.M., Madinaveitia, J., Snow, G.A., 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei* . 1. Isolation from *Mycobacterium phlei*. Biochemical Journal 55, 596–607.

Francis, J., Madinaveitia, J., Macturk, H.M., Snow, G.A., 1949. Isolation from Acid-Fast Bacteria of a Growth-Factor for *Mycobacterium johnei* and of a Precursor of Phthiocol. Nature 163, 365–366.

Gardan, L., 2002. *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 2065–2074.

Garibaldi, J.A., Neilands, J.B., 1956. Formation of Iron-binding Compounds by Micro-organisms. Nature 177, 526–527.

Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J.P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M., 2016. Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. PLoS ONE 11, e0150183.

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., Schalk, Isabelle.J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. Journal of Inorganic Biochemistry, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12) in Zurich, Switzerland, August 24-28, 2014 148, 27–34.

Gautier, A.L., Michel, P., Montfort-Climent, D., Lahondère, D., 2017. Recueil de données chiffrées sur les gisements de déchets d'amiante au regard des filières de traitement disponibles (BRGM).

Ghysels, B., Dieu, B.T.M., Beatson, S.A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Cornelis, P., 2004. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 150, 1671–1680.

Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., Fava, F., 2020. Biodegradation of polyvinyl chloride plastic films by enriched anaerobic marine consortia. Marine Environmental Research 158, 104949.

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. Frontiers in Microbiology 6.

Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., Schalk, I.J., Pattus, F., 2009. FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. Molecular Microbiology 72, 1246–1259.

Hahladakis, J.N., Velis, C.A., Weber, R., Iacovidou, E., Purnell, P., 2018. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. Journal of Hazardous Materials 344, 179–199.

Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L.A., Shanzer, A., Schalk, I.J., 2010. The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. J Bacteriol 192, 1212–1220.

Hannauer, M., Schäfer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G.L.A., Budzikiewicz, H., Schalk, I.J., 2012. Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. FEBS Letters 586, 96–101.

Hantke, K., 1987. Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiology Letters 44, 53–57.

Harrison, J.P., Schratzberger, M., Sapp, M., Osborn, A.M., 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. BMC Microbiology 14, 232.

Hassett, D.J., Sokol, P.A., Howell, M.L., Ma, J.F., Schweizer, H.T., Ochsner, U., Vasil, M.L., 1996. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. J Bacteriol 178, 3996–4003.

Helmann, J.D., 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Adv Microb Physiol 46, 47–110.

Henríquez, T., Stein, N.V., Jung, H., 2019. PvdRT-OpmQ and MdtABC-OpmB efflux systems are involved in pyoverdine secretion in *Pseudomonas putida* KT2440. Environmental Microbiology Reports 11, 98–106.

Hesse, C., Schulz, F., Bull, C.T., Shaffer, B.T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K.A., Varghese, N., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., Kyrpides, N., Woyke, T., Loper, J.E., 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. Environ Microbiol 20, 2142–2159.

Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. Natural product reports 27, 637–657.

Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W., Speert, D.P., 2002. Multidrug Efflux Systems Play an Important Role in the Invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. J Exp Med 196, 109–118.

Hmelo, L.R., Borlee, B.R., Almblad, H., Love, M.E., Randall, T.E., Tseng, B.S., Lin, C., Irie, Y., Storek, K.M., Yang, J.J., Siehnel, R.J., Howell, P.L., Singh, P.K., Tolker-Nielsen, T., Parsek, M.R., Schweizer, H.P., Harrison, J.J., 2015. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. Nat Protoc 10, 1820–1841.

INRS, 2018. Amiante Fiche Toxicologique n°145.

Jeannot, K., Guillard, T., 2019. *Pseudomonas aeruginosa*, SFM Microbiologie.

JORF, Journal Officiel de la République Française, 2012. Arrêté du 12 mars 2012 relatif au stockage des déchets d'amiante. Légifrance.

Josts, I., Veith, K., Normant, V., Schalk, I.J., Tidow, H., 2021. Structural insights into a novel family of integral membrane siderophore reductases. Proceedings of the National Academy of Sciences 118, e2101952118.

Jurkevitch, E., Hadar, Y., Chen, Y., Libman, J., Shanzer, A., 1992. Iron uptake and molecular recognition in *Pseudomonas putida*: receptor mapping with ferrichrome and its biomimetic analogs. Journal of Bacteriology 174, 78–83.

Kang, D., Turner, K.E., Kirienko, N.V., 2018. PqsA Promotes Pyoverdine Production via Biofilm Formation. Pathogens 7, 3.

Kasteren, J.M.N. van, Slapak, M.J.P., 2001. The influence of additives on the steam gasification of PVC waste. J Mater Cycles Waste Manag 3, 114–117.

Khatoon, N., Jamal, A., Ali, M.I., 2019. Lignin peroxidase isoenzyme: a novel approach to biodegrade the toxic synthetic polymer waste. Environmental Technology 40, 1366–1375.

Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquatic Sciences - Research Across Boundaries 66, 3–18.

Kumar, R.R., Prasad, S., 2011. Metabolic Engineering of Bacteria. Indian J Microbiol 51, 403–409.

Kumari, A., Chaudhary, D.R., Jha, B., 2019. Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain. Environ Sci Pollut Res 26, 1507–1516.

LAGA, 2023. Mitteilung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA) 23. Vollzugshilfe zur Entsorgung asbesthaltiger Abfälle.

Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, M., Zaruma, A., Garcia-Valdés, E., 2022. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of Stutzerimonas gen. Nov | Elsevier Enhanced Reader. Systematic and Applied Microbiology 45.

Lamont, I.L., Martin, L.W., 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 149, 833–842.

Lau, C.K.Y., Krewulak, K.D., Vogel, H.J., 2016. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. FEMS Microbiology Reviews 40, 273–298.

Leach, L.H., Morris, J.C., Lewis, T.A., 2007. The role of the siderophore pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by *Pseudomonas putida* DSM 3601. Biometals 20, 717–726.

Lemare, M., Puja, H., David, S.R., Mathieu, S., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., Rigouin, C., 2022. Engineering siderophore production in *Pseudomonas* to improve asbestos weathering. Microbial Biotechnology 15, 2351–2363.

Li, J., Rong, L., Zhao, Y., Li, S., Zhang, C., Xiao, D., Foo, J.L., Yu, A., 2020. Next-generation metabolic engineering of non-conventional microbial cell factories for carboxylic acid platform chemicals. Biotechnology Advances 43, 107605.

Little, A.S., Okkotsu, Y., Reinhart, A.A., Damron, F.H., Barbier, M., Barrett, B., Oglesby-Sherrouse, A.G., Goldberg, J.B., Cody, W.L., Schurr, M.J., Vasil, M.L., Schurr, M.J., 2018. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Phosphorylation Status Differentially Regulates Pyocyanin and Pyoverdine Production. mBio 9, e02318-17. 7

Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., Lamont, I.L., 2014. Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport, and pathogenicity. FEMS Microbiology Reviews 38, 569–597.

Loyaux-Lawniczak, S., Vuilleumier, S., Geoffroy, V.A., 2019. Efficient Reduction of Iron Oxides by *Paenibacillus* spp. Strains Isolated from Tropical Soils. Geomicrobiology Journal 36, 423–432.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes and Infection 2.

Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature 426, 306–310.

Marteau, P., 2011. Gypse, fiche détaillée. Société de l'industrie minérale.

Mathieu, S., 2019. Ingénierie de la voie de biosynthèse du sidérophore chez *Pseudomonas* pour la production de pyoverdine fonctionnalisée.

Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J.-M., Abbaspour-Tehrani, K., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., Cornelis, P., 2009. Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. Biometals 22, 951–964.

Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., Cornelis, P., 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. Environ Microbiol 9, 425–434.

Mendonca, C.M., Yoshitake, S., Wei, H., Werner, A., Sasnow, S.S., Thannhauser, T.W., Aristilde, L., 2020. Hierarchical routing in carbon metabolism favors iron-scavenging strategy in iron-deficient soil *Pseudomonas* species. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 117, 32358–32369.

Meyer, J.-M., 2010. Pyoverdine Siderophores as Taxonomic and Phylogenic Markers, in: Ramos, J.L., Filloux, A. (Eds.), *Pseudomonas*: Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–233.

Meyer, J.M., Abdallah, M.A., 1978. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. Journal of General Microbiology 107, 319–328.

Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. Biometals 21, 259–271.

Meyer, J.-M., Hornsperger, J.M., 1978. Role of PyoverdinePf, the Iron-binding Fluorescent Pigment of *Pseudomonas* fluorescens, in Iron Transport. Microbiology 107, 329–331.

Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., Budzikiewicz, H., 1997. Use of Siderophores to Type Pseudomonads: The Three *Pseudomonas Aeruginosa* Pyoverdine Systems. Microbiology 143, 35–43.

Migula, W., 1894. Über ein neues System der Bakterien. Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe 1, 235–238.

Miyada, C.G., Stoltzfus, L., Wilcox, G., 1984. Regulation of the araC gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on araBAD expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 4120–

Mohanty, S.K., Gonneau, C., Salamatipour, A., Pietrofesa, R.A., Casper, B., Christofidou-Solomidou, M., Willenbring, J.K., 2018. Siderophore-mediated iron removal from chrysotile: Implications for asbestos toxicity reduction and bioremediation. J Hazard Mater 341, 290–296.

Molina, L., Geoffroy, V.A., Segura, A., Udaondo, Z., Ramos, J.-L., 2016. Iron Uptake Analysis in a Set of Clinical Isolates of *Pseudomonas putida*. Frontiers in Microbiology 7.

Moon, C.D., Zhang, X.-X., Matthijs, S., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., Rainey, P.B., 2008. Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* fluorescens SBW25. BMC Microbiol 8, 7.

Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.-P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernández, D.U., Schäfer, M., Ravel, J., Cornelis, P., 2002. Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. Molecular Microbiology 45, 1673–1685.

Moussallam, K., 2017. Enquête sur les chantiers de désamiantage. Résultats et enjeux méthodologiques (Document d'études). Direction de l'animation de la recherche, des études et des statistiques.

Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology 12, 1513–1530.

Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C.R., Muntendam, R., Raj, H., Jeronimus-Stratingh, C.M., Cool, R.H., Quax, W.J., 2014. PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 196, 2681–2690.

Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P.C., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K.N., Düsterhöft, A., Tümmler, B., Fraser, C.M., 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environmental Microbiology.

Nguyen, A.T., O'Neill, M.J., Watts, A.M., Robson, C.L., Lamont, I.L., Wilks, A., Oglesby-Sherrouse, A.G., 2014. Adaptation of Iron Homeostasis Pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Mutant in the Cystic Fibrosis Lung. J Bacteriol 196, 2265–2276.

Nickel, E.H., 1995. Definition of a mineral. Mineralogical Magazine 59, 767–768.

Nikel, P.I., Chavarría, M., Danchin, A., de Lorenzo, V., 2016. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. Current Opinion in Chemical Biology, Synthetic Biology * Synthetic Biomolecules 34, 20–29.

Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H., 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50, 83–89.

Ochsner, U.A., Johnson, Z., Vasil, M.L., 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*.

Ochsner, U.A., Vasil, M.L., 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 4409–4414.

Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. Molecular Microbiology 45, 1277–1287.

O'Neill, M.J., Wilks, A., 2013. The P. *aeruginosa* Heme Binding Protein PhuS Is a Heme Oxygenase Titratable Regulator of Heme Uptake. ACS Chem. Biol. 8, 1794–1802.

Ongena, M., Jacques, P., Delfosse, P., Thonart, P., 2002. Unusual traits of the pyoverdin-mediated iron acquisition system in *Pseudomonas putida* strain BTP1. Biometals 15, 1–13.

Palleroni, N.J., 1984. *Pseudomonas*, in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Willkins, Co, Baltimore, pp. 141–199.

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.

Parveen, S., Wani, A.H., Shah, M.A., Devi, H.S., Bhat, M.Y., Koka, J.A., 2018. Preparation, characterization and antifungal activity of iron oxide nanoparticles. Microbial Pathogenesis 115, 287–292.

Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., Imperi, F., 2017. Ferric Uptake Regulator Fur Is Conditionally Essential in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 199, e00472-17.

Pepperl, G., 2000. Molecular weight distribution of commercial PVC. Journal of Vinyl and Additive Technology 6, 88–92.

Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., Galop, S., Signor, L., Crouzy, S., Michaud-Soret, I., De Rosny, E., 2016. Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. Biochemistry 55, 1503–1515.

Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V.P., Kuhn, L., Hammann, P., Mislin, G.L.A., Ehret-Sabatier, L., Schalk, I.J., 2020. Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. Molecular & Cellular Proteomics 19, 589–607.

Perraud, Q., Moynié, L., Gasser, V., Munier, M., Godet, J., Hoegy, F., Mély, Y., Mislin, G.L.A., Naismith, J.H., Schalk, I.J., 2018. A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. ACS Chem Biol 13, 2603–2614.

Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E., Vasil, M.L., 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. Molecular Microbiology 47, 903–915.

Poole, K., Neshat, S., Krebes, K., Heinrichs, D.E., 1993. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene fpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 175, 4597–4604.

Posey, J.E., Gherardini, F.C., 2000. Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. Science 288, 1651–1653.

Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A.M., Martínez-Pastor, M.T., 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. Metallomics 9, 1483–1500.

Puja, H., Mislin, G.L.A., Rigouin, C., 2023. Engineering Siderophore Biosynthesis and Regulation Pathways to Increase Diversity and Availability 13, 959.

Ravel, J., Cornelis, P., 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. Trends in Microbiology 195–200.

Raymond, K.N., Carrano, C.J., 1979. Coordination chemistry and microbial iron transport. Acc. Chem. Res. 12, 183–190.

Reddy, M.M., Goud, U.P., Babu, B.G., Sony, B., 2019. Experimental Investigation on Physical Properties of Black Cotton Soil with Admixtures 8.

Rédly, G.A., Poole, K., 2003. Pyoverdine-Mediated Regulation of FpvA Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a Probable Extracytoplasmic-Function Sigma Factor, FpvI. J Bacteriol 185, 1261–1265.

Ringel, M.T., Brüser, T., 2018. The biosynthesis of pyoverdines. Microb Cell 5, 424–437.

Ringel, M.T., Dräger, G., Brüser, T., 2018. PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Biological Chemistry 293, 2330–2341.

Ringel, M.T., Dräger, G., Brüser, T., 2016. PvdN Enzyme Catalyzes a Periplasmic Pyoverdine Modification *. Journal of Biological Chemistry 291, 23929–23938.

Ru, J., Huo, Y., Yang, Y., 2020. Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. Frontiers in Microbiology 11.

Ruangviriyachai, C., Fernández, D.U., Fuchs, R., Meyer, J.-M., Budzikiewicz, H., 2001. A New Pyoverdin from *Pseudomonas aeruginosa* R'. Zeitschrift für Naturforschung C 56, 933–938.

Saïda, F., Uzan, M., Odaert, B., Bontems, F., 2006. Expression of Highly Toxic Genes in *E. coli*: Special Strategies and Genetic Tools. Current protein & peptide science 7, 47–56.

Salah El Din, A.L.M., Kyslik, P., Stephan, D., Abdallah, M.A., 1997. Bacterial Iron Transport: Structure Elucidation by FAB-MS and by 2D NMR (1H, 13C, 15N) of Pyoverdin G4R, a Peptidic Siderophore Produced by a Nitrogen-Fixing Strain of *Pseudomonas putida*. Tetrahedron 53, 12539–12552.

Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M., Dominguez-Vera, J.M., 2017. Iron chemistry at the service of life. IUBMB Life 69, 382–388.

Schalk, I.J., Hannauer, M., Braud, A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance: Siderophores and metals other than iron. Environmental Microbiology 13, 2844–2854.

Schalk, I.J., Rigouin, C., Godet, J., 2020. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. Environ Microbiol 22, 1447–1466.

Schwartz, M., Perrot, T., Aubert, E., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Mulliert, G., Saiag, F., Didierjean, C., Gelhaye, E., 2018. Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot Trametes versicolor. Sci Rep 8, 8472.

Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160, 47–56.

Siegele, D.A., Hu, J.C., 1997. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 94, 8168–8172.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., Jackson, R.W., 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev 35, 652–680.

Smith, A.D., Wilks, A., 2015. Differential Contributions of the Outer Membrane Receptors PhuR and HasR to Heme Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biological Chemistry 290, 7756–7766.

Spasiano, D., Pirozzi, F., 2017. Treatments of asbestos containing wastes. Journal of Environmental Management 204, 82–91.

Stanik, I.A., Cedzynska, K., Zakowska, Z., 2006. Destruction of chrysotile asbestos structure with a population of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* 644–648.

Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., Mascher, T., 2009. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. Molecular Microbiology 74, 557–581.

Steingard, C.H., Helmann, J.D., 2023. Meddling with Metal Sensors: Fur-Family Proteins as Signaling Hubs. Journal of Bacteriology 205, e00022-23.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., Olson, M.V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959–964.

Sumathi, T., Viswanath, B., Sri Lakshmi, A., SaiGopal, D.V.R., 2016. Production of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated from Plastic Dumped Soils and Their Ability to Degrade Low Molecular Weight PVC. Biochemistry Research International 2016, e9519527.

Sun, G.-X., Zhou, W.-Q., Zhong, J.-J., 2006. Organotin Decomposition by Pyochelin, Secreted by *Pseudomonas aeruginosa* Even in an Iron-Sufficient Environment. Appl Environ Microbiol 72, 6411–6413.

Timmis, K.N., 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. Environ Microbiol 4, 779–781.

Troxell, B., Hassan, H.M., 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. Front Cell Infect Microbiol 3, 59.

Tsuyoshi Ohnishi, S., 1979. A method of estimating the amount of calcium bound to the metallochromic indicator arsenazo III. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 586, 217–230.

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M., 2017. Antifungal activities of wood extractives. Fungal Biology Reviews 31, 113–123.

Vasil, M.L., 2007. How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. Biometals 20, 587–601.

Vela, A.I., Gutiérrez, M.C., Falsen, E., Rollán, E., Simarro, I., García, P., Domínguez, L., Ventosa, A., Fernández-Garayzábal, J.F., 2006. *Pseudomonas* simiae sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (Callithrix geoffroyi). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 2671–

Virta, R.L., 2002. Asbestos: Geology, Mineralogy, Mining, and Uses (U.S. Geological Survey Open-File Report), Open-File Report.

Visca, P., Imperi, F., 2018. An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur. Future Microbiology 13, 853–856. https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0081overdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends in Microbiology 15, 22–30.

Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., Lamont, I.L., 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. Molecular Microbiology 45, 1177–1190.

Wang, H., Hu, Y., Zhang, W., Sun, L., 2009. Construction of an attenuated *Pseudomonas* fluorescens strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. Vaccine 27, 4047–4055.

Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. Nat Rev Microbiol 4, 752–764.

Weinberg, E.D., 1997. The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. Perspectives in Biology and Medicine 40, 578–583.

Weinstein, R.A., Gaynes, R., Edwards, J.R., National Nosocomial Infections Surveillance System, 2005. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. Clinical Infectious Diseases 41, 848–854.

Williams, P.A., Murray, K., 1974. Metabolism of Benzoate and the Methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: Evidence for the Existence of a TOL Plasmid. J Bacteriol 120, 416–423.

Williamson, M.J., Tromp, R.M., Vereecken, P.M., Hull, R., Ross, F.M., 2003. Dynamic microscopy of nanoscale cluster growth at the solid–liquid interface. Nature Mater 2, 532–536.

Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., Brinkman, F.S.L., 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. Nucleic Acids Res 44, D646–D653.

Winterbourn, C.C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. Toxicology Letters 82/83, 969–974.

Worwood, M., 2012. Estimation of Body Iron Stores, in: Anderson, G.J., McLaren, G.D. (Eds.), Iron Physiology and Pathophysiology in Humans, Nutrition and Health. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 499–528.

Yang, G., Han, L., Wen, J., Zhou, S., 2013. *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63, 4599–4605.

Zhang, S., He, Y., Sen, B., Wang, G., 2020. Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Bioresource Technology 307, 123234.

Zichella, L., Baudana, F., Zanetti, G., Marini, P., 2021. Vinyl-Asbestos Floor Risk Exposure in Three Different Simulations. International Journal of Environmental Research and Public Health 18, 2073.

Monitorat

Lors de chacune de mes années de thèse, j'ai eu la chance d'obtenir des postes en tant que monitrice au sein de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS). Lors de la première année de ma thèse j'étais en charge des **TP de microbiologie** (68 h) avec le Dr. Coraline Rigouin durant lesquels j'ai pu encadrer des élèves de 1ère et de 2ème année de l'école. Durant ma seconde année j'étais en charge des **TP de Genetical Engineering** (68 h) avec le Dr. Anne-Laure Duchemin durant lesquels j'ai pu encadrer des élèves de 1ère année de l'école ainsi que des Master 1. Enfin, durant ma 3ème année j'étais en charge des **TP d'enzymologie** (68 h) avec le Dr. Claire Gaveriaux-Ruff durant lesquels j'ai pu encadrer des élèves de 1ère année de l'école.

Etudiants encadrés

Durant ce projet de thèse, j'ai eu l'opportunité d'encadrer des étudiants ayant contribué à l'avancée de mes travaux de doctorat :

- **Walckiers Gabriel** 2021 : Master Microbiologie 1ère année. Université de Strasbourg. Rapport bibliographique : Biodégradation des matrices plastiques dans le traitement des dalles vinyle amiante. **4 semaines**
- **Chervier-Legourd Chloé** 2021 : CBT 2ème année. ESBS Strasbourg. Optimisation de la production de pyoverdine chez P. putida KT2440 et le mutant PP_Δ*fur*. **13 semaines**
- **Portal Cloé** 2022 : BTS Biotechnologies 2ème année Lycée Jean Rostand Strasbourg. Bioremédiation des déchets amiantés par des bactéries lactiques. **6 semaines**
- **Bettle Océane** 2022 : Master Microbiologie 1ère année. Université de Strasbourg. Evaluation de la toxicité des déchets amiantés traités biologiquement pour le dosage des ROS chez les *Pseudomonas.* **4 semaines**
- **Liang Junge** 2022 : CBT 2ème année ESBS Strasbourg. Optimisation de la dégradation des dalles vinyles amiantées. **16 semaines**
- **Serre Sandrine** 2022. Licence Microbiologie 3ème année. Université de Strasbourg. Bioremédiation des déchets amiantés par des bactéries lactiques. **8 semaines**

- **Fitsch Julien** 2022 : BTS Biotechnologies 2ème année Lycée Jean Rostand Strasbourg. Construction de mutants rapporteurs de sidérophores chez *P. putida*. **7 semaines**

Publications scientifiques

Lemare, M., Puja, H., David, S.R., Mathieu, S., Ihiawakrim, D., Geoffroy, V.A., Rigouin, C., 2022. Engineering siderophore production in *Pseudomonas* to improve asbestos weathering. Microbial Biotechnology 15, 2351–2363.

Geoffroy, V.A., David, S.R., **Lemare, M.** Brevet PCT/FR2022/051706. Rédaction des résultats pour extension à l'international

Lemare, M, David, S.R., Geoffroy, V.A, 2023 (en cours de soumission dans « Journal of Environmental Management »). The hazards of asbestos exposure How can biological processes help asbestos waste management?

Lemare, M., Geoffroy, V.A., Rigouin, C., 2023 (soumis prochainement).

Communications orales

Lemare, M., Geoffroy, V.A., Rigouin, C. How siderophore producing bacteria can remove asbestos toxicity. Seminars of Chemical Biology 2021. ESBS Strasbourg.

Lemare, M., Geoffroy, V.A., Rigouin, C. Bioremédiation de déchets amiantés : optimisation de la production de pyoverdine chez les *Pseudomonas*. Séminaire de Micrioblogie de Strasbourg 2022. **Prix de la meilleure communication orale**.

Lemare, M., Geoffroy, V.A., Rigouin, C. Les *Pseudomonas* fluorescents une stratégie de bioremédiation de déchets amiantés. Microbes 2022. Montpellier.

Lemare, M., Geoffroy, V.A., Rigouin, C. Bioremédiation de déchets amiantés : extraction du fer et du mg par les *Pseudomonas* producteurs de pyoverdine. GDR Pseudomonas 202. Université de Caen. Cabourg

Communication par affiche

Lemare, M., Rigouin, C. G. Mislin, L. Averous, Geoffroy, V.A. Dégradation d'amiantes plastiques et extraction de métaux par voie biologique. Compte rendu Biometap - Mettalomix 2022. Financement renouvelé

Vulgarisation scientifique

Fête de la science 2020 : Les microorganismes qui nous entourent. Iliade - Illkirch. Tenue d'un stand sur 2 jours

Fête de la science 2021 : Les microorganismes de l'environnement. La Villa - Illkirch. Tenue d'un stand sur 2 jours

Marion LEMARE

Utilisation de microorganismes pour la bioremédiation de déchets amiantés à matrices minérales et organiques

Résumé

Les méthodes actuelles de gestion des déchets amiantés sont insatisfaisantes. Ce projet a pour but d'optimiser un traitement biologique visant à éliminer la toxicité des déchets amiantés à matrices minérales et organiques par extraction du fer et du magnésium présent au sein des fibres. Une première approche a permis la construction du premier mutant PP_*Δfur* décrit chez *Pseudomonas putida*, dérégulé dans la production de pyoverdine, sidérophore capable de complexer le fer. Par une production continue de pyoverdine, ce mutant permet une altération plus efficace des déchets de flocage. La deuxième approche, basée sur la solubilité de ces déchets en milieu acide, a mis en évidence l'efficacité du petit-lait ensemencé par *Lactobacillus rhamnosus* pour dissoudre de grandes quantités de fer et de magnésium. Pour les dalles vinyles amiantés, nos résultats ouvrent la voie à l'utilisation de basidiomycètes utilisant le PVC amianté grâce à des mécanismes restant à identifier. Ces résultats permettent d'envisager le développement de procédés de bioremédiation respectueux de l'environnement.

Mots clés : amiantes, métaux, *Pseudomonas*, pyoverdine, ingénierie génétique, petit lait, *Lactobacillus*, basidiomycètes

Abstract

Current methods for managing asbestos waste are unsatisfactory. This project aims to optimize a biological treatment that eliminates the toxicity of asbestos waste composed of mineral and organic matrices by extracting iron and magnesium present within the fibers. A first approach involved the construction of the first mutant PP_*Δfur* described in *Pseudomonas putida*, which is deregulated in pyoverdine production, a siderophore complexing iron with high affinity. Through continuous production of pyoverdine, this mutant allows a more efficient degradation of asbestos flocking waste. The second approach, based on the solubility of these asbestos waste in an acidic environment, demonstrated the effectiveness of whey inoculated with *Lactobacillus rhamnosus* in dissolving large quantities of iron and magnesium. For vinyl asbestos tiles, our results pave the way for the use of basidiomycetes that utilize asbestos-containing PVC through mechanisms yet to be identified. These data offer the potential for developing environmentally friendly bioremediation processes.

Keywords: asbestos, metals, *Pseudomonas*, pyoverdine, genetic engineering, whey, *Lactobacillus*, basidiomycetes