



UNIVERSITE DE STRASBOURG
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée publiquement le **07 juillet 2010** pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie

Par : **Ahmed MEKSEM**

**Études structurales et fonctionnelles des
récepteurs TonB-dépendants de
bactéries à Gram-négatif**

Commission d'examen :

Président

M. Jean-Luc GALZI

Directeur de recherche au CNRS - École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

Rapporteurs

Mme Nadia IZADI-PRUNEYRE

Chargée de recherche au CNRS - Institut Pasteur de Paris

Mme Isabelle MICHAUD-SORET

Directrice de recherche au CNRS – iRTSV, CEA de Grenoble

Examineurs

M. Arnaud DUCRUIX

Professeur des universités – Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes

M. Juan-Carlos FONTECILLA-CAMPS

Directeur de recherche au CEA - Institut de Biologie Structurale J-P. EBEL de Grenoble

Directrice de thèse

Mme Isabelle SCHALK

Directrice de recherche au CNRS - École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

UNIVERSITE DE STRASBOURG
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée publiquement le **07 juillet 2010** pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie
Par

Ahmed MEKSEM

**Études structurales et fonctionnelles des
récepteurs TonB-dépendants de
bactéries à Gram-négatif**

Commission d'examen :

Président

M. Jean-Luc GALZI

Directeur de recherche au CNRS - École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

Rapporteurs

Mme Nadia IZADI-PRUNEYRE

Chargée de recherche au CNRS - Institut Pasteur de Paris

Mme Isabelle MICHAUD-SORET

Directrice de recherche au CNRS – iRTSV, CEA de Grenoble

Examineurs

M. Arnaud DUCRUIX

Professeur des universités - Université Paris Descartes

M. Juan-Carlos FONTECILLA-CAMPS

Directeur de recherche au CEA - Institut de Biologie Structurale J-P. EBEL de Grenoble

Directrice de thèse

Mme Isabelle SCHALK

Directrice de recherche au CNRS - École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE

*Vu le Code de l'Education,
Vu le décret N° 84-573 du 5 juillet 1984 sur les diplômes nationaux de l'enseignement supérieur,
Vu l'arrêté du 6 janvier 2005 relatif à la cotutelle internationale de thèse,
Vu l'arrêté du 7 août 2006 relatif à la Formation Doctorale,*

Vu les pré-rapports stipulant que la thèse mérite d'être soutenue établis par :

*Mme N. IZADI-PRUNEYRE, Chargé de recherches - HDR, Institut Pasteur
Mme I. MICHAUD-SORET, Directeur de recherches - HDR, CEA Grenoble*

Sur proposition du Directeur (s) de thèse :
Mme I. SCHALK, Directeur de Recherches

Le Président de l'Université de Strasbourg autorise

M. Ahmed MEKSEM

à présenter le : **07/07/2010 à 14H**

à : **ESBS, Pôle API, Amphithéâtre J.-P. Ebel, boulevard Sébastien Brant - Illkirch**

en vue du DOCTORAT, une thèse ayant pour titre :

Etudes structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif.

Autre(s) membre(s) du jury :

M. J-L. GALZI Directeur de recherches Université de Strasbourg

M. A. DUCRUIX Professeur Université Paris V

M. J-C. FONTECILLA-CAMPS Directeur de recherches - HDR Inst. de biologie structurale Jean-Pierre EBEL

Avis favorable et signature du Directeur de l'école doctorale Sciences de la vie et de la santé

La soutenance est publique.

Strasbourg le 23/06/2010

Pour le Président,
Le Vice-Président,
E. WESTHOFF



E. Westhoff

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé ce travail de thèse dans un environnement scientifique et matériel très privilégié. Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement et profondément le Docteur **Isabelle SCHALK**, qui a assuré la direction de ce travail. Je lui suis reconnaissant pour son aide, son accessibilité, sa disponibilité et pour tout le temps qu'elle a consacré à ma thèse et aux problèmes auxquels j'ai été confronté. Je la remercie de m'avoir accordé sa confiance et prodigué son aide durant mon séjour au laboratoire. J'espère que ces trop courtes années de thèse à ses côtés m'auront permis de commencer à acquérir un peu de la curiosité, de l'esprit critique et de la rigueur que tout le monde lui reconnaît.

Merci au Professeur **Arnaud DUCRUIX** ainsi qu'aux Docteurs **Juan-Carlos FONTECILLA-CAMPS**, **Jean-Luc GALZI**, **Nadia IZADI-PRUNEYRE** et **Isabelle MICHAUD-SORET** d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Docteur **Valérie GEOFFROY** d'avoir pris le temps de lire et de corriger le manuscrit.

Un grand merci aux Docteurs **Gaetan MISLIN** et **Laure JOURNET** pour leurs conseils constructifs et leur disponibilité à chaque fois que j'ai eu à solliciter leurs compétences.

Je voudrais également remercier **Françoise HOEGY** pour son aide précieuse.

Cette thèse est l'occasion d'exprimer mes remerciements les plus chaleureux aux autres membres du laboratoire 'métaux et micro-organismes': **Karl BRILLET**, **Sophie EBERLING**, **Claire FERRET**, **Véronique GASSER**, **Laurent GUILLON**, **Melissa HANNAUER**, **Sabrina NOEL**, **Bénédicte PESSET**, **Mirella NADER** et **Emilie YETERIAN**. Leur aménité, leur bonne humeur et leur estime depuis le début sont pour beaucoup dans l'accomplissement de ce travail. Du fond du cœur, je vous dis donc « merci ». Je garde de vous tous un souvenir très précieux.

Merci à ceux, grâce à qui j'ai eu cette brillante idée de poursuivre mes études après avoir obtenu l'Ingéniorat et surtout d'entamer une thèse : **Amar HADJ KACI & Abderrahmane MATI** (Professeurs de Biochimie à l'Université de Tizi-Ouzou, Algérie)

Merci à ma belle famille et à mes amis particulièrement **Rabah AKSOUM**, **Mahdi BELAID**, **A/Aziz BENDOUCHE**, **Ramdane HADDOUCHE**, **Ramdane KHATI** et **Kader REBAINE**.

Le plus important, je remercie **mes parents** sans qui ces quelque 200 pages seraient blanches. Malgré la distance qui nous sépare, vous avez sû être toujours près de moi. Merci à mon frère Yaçine et à ma sœur Fariza pour leur soutien.

Enfin, une mention spéciale et particulière pour **ma femme Farida**, avec qui nous nous sommes accompagnés pendant des années et nous nous accompagnerons encore pendant au moins 70 ans... Merci pour ton soutien, mais aussi de la patience dont tu as fait preuve lorsque je suis stressé (et je l'ai été). Sans toi cette période de ma vie aurait été beaucoup plus difficile à vivre.

SOMMAIRE

Liste des figures.....	6
Liste des tableaux.....	8
Avant-propos.....	9

PARTIE I : Synthèse des données bibliographiques

Chapitre I : Les sources de fer pour les bactéries

I.1. Le fer.....	14
I.1.1. Le fer sur terre.....	14
I.1.2. Le fer chez les micro-organismes.....	14
I.1.3. Biodisponibilité du fer.....	14
I.1.4. Le fer et le pouvoir pathogène.....	15
I.1.5. Homéostasie du fer.....	16
I.2. Les sources de fer lors d'une infection.....	17
I.2.1. Les protéines de régulation de la concentration du fer.....	17
I.2.1.1. La transferrine et la lactoferrine.....	17
I.2.1.2. La ferritine.....	18
I.2.2. L'hème et les hémoprotéines.....	20
I.2.2.1. L'hème.....	20
I.2.2.2. Les hémoprotéines.....	21
a) L'hémoglobine.....	21
b) L'haptoglobine.....	22
c) L'albumine.....	22
d) L'hémopexine.....	23
e) Autres hémoprotéines.....	23
I.2.3. Le dicitrate de fer.....	23
I.3. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif.....	24
I.3.1. Acquisition du fer ferreux libre par le système FeoABC.....	25
I.3.2. Acquisition du fer par les sidérophores.....	25
I.3.2.1. Définition.....	25
I.3.2.2. Structure.....	26
I.3.2.3. Fonctions.....	26
I.3.3. Acquisition du fer par les hémophores.....	28
I.3.3.1. Définition.....	28
I.3.3.2. Les systèmes à hémophores.....	28
a) Le système HxuA.....	28
b) Le système HasA.....	29

Chapitre II : Les voies de transport de fer impliquant les sidérophores et les récepteurs TonB-dépendants

II.1. Les récepteurs TonB-dépendants (RTBDs).....	32
II.1.1. Abondance.....	32
II.1.2. Rôles biologiques.....	33

II.1.3. Structures primaire et tridimensionnelle.....	33
a) Le tonneau β	37
b) Le bouchon.....	38
c) Le domaine de signalisation.....	40
II.1.4. Classification.....	41
II.1.5. Interaction ferri-sidérophore-RTBD.....	42
II.1.5.1. Site de liaison et formation du complexe ferri-sidérophore-RTBD.....	42
II.1.5.2. Changements de conformation du RTBD.....	43
a) Changements de conformation au niveau des boucles.....	43
b) Changements de conformation au niveau de la boîte TonB.....	44
c) Changements de conformation au niveau du domaine de signalisation.....	44
II.2. Le complexe TonB-ExbB-ExbD (système Ton).....	45
II.2.1. La protéine TonB d' <i>E. coli</i>	45
a) Topologie.....	45
b) Structures du domaine C-terminal.....	46
II.2.2. Les protéines ExbB-ExbD d' <i>E. coli</i>	47
a) La protéine ExbB.....	47
b) La protéine ExbD.....	47
II.2.3. Stoechiométrie du complexe TonB-ExbB-ExbD.....	48
II.2.4. Interaction TonB-RTBD.....	49
II.2.5. Transduction d'énergie par le complexe TonB-ExbB-ExbD.....	50
II.2.5.1. Le modèle navette.....	50
II.2.5.2. Le modèle impliquant une rotation.....	51
II.3. Transport à travers la membrane externe.....	53
II.4. Transport à travers la membrane interne.....	55
II.5. Dissociation des complexes ferri-sidérophores.....	58
II.6. Régulation génétique de l'acquisition du fer.....	58
II.6.1. Régulation par la protéine Fur.....	58
II.6.2. Régulation par les facteurs ECF.....	60
<u>Chapitre III : Acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif</u>	
III.1. Systèmes d'acquisition de l'hème	63
III.2. Acquisition directe de l'hème	65
III.2.1. Transport de l'hème à travers la membrane externe.....	66
III.2.2. Interaction RTBD-hème.....	67
III.2.3. Devenir de l'hème.....	67
<u>Chapitre IV : Acquisition du fer par la voie pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i></u>	
IV.1. La bactérie <i>P. aeruginosa</i>	70
IV.1.1. Présentation générale.....	70
IV.1.2. Caractéristiques génétiques.....	71
IV.1.3. Facteurs de virulence.....	71
IV.1.4. Les sidérophores utilisés par <i>P. aeruginosa</i>	73
IV.2. Les Pvds de <i>P. aeruginosa</i>	73
IV.2.1. Généralités.....	73
IV.2.2. Pvd de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	75
a) Structure.....	75
b) Caractéristiques spectrales	75
c) Biosynthèse et maturation.....	78

IV.3. Transport à la membrane externe <i>via</i> FpvA.....	80
IV.3.1. Structure de FpvA.....	81
IV.3.2. Site de liaison de la ferri-pyoverdine	81
IV.3.3. Changements de conformation induits par la liaison de la ferri-pyoverdine	82
IV.3.4. La protéine TonB.....	84
IV.3.5. Translocation à travers la membrane interne.....	84
IV.4. Devenir du complexe ferri-pyoverdine.....	85
IV.4.1. Dissociation dans le périplasme.....	85
IV.4.2. Transport à travers la membrane interne.....	85
IV.5. Régulation de l'acquisition du fer par voie Pvd.....	86

PARTIE II : Résultats et discussion

Chapitre V : Études structurales des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif

Introduction.....	91
V.1. Mise en place d'un protocole pour l'étude structurale des RTBDs.....	97
V.2. Structure de ShuA, récepteur de l'hème/hémoglobine de <i>Shigella dysenteriae</i>	111

Chapitre VI : Caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans le transport de la ferri-pyoverdine à travers la membrane interne chez *P. aeruginosa*

Introduction.....	134
VI.1. Caractérisation fonctionnelle des protéines de l'opéron <i>fpvCDEF</i>	138
VI.2. Caractérisation fonctionnelle du transporteur ABC FpvGHJK.....	163

PARTIE III : Conclusion générale

Références bibliographiques.....	186
----------------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la Tf et de la Lf humaines sous leurs formes apo.....	18
Figure 2 : Structure de la ferritine humaine.....	19
Figure 3 : Représentation schématique de la molécule d'hème.....	20
Figure 4 : Structure de l'oxyhémoglobine humaine.....	21
Figure 5 : Structure de l'albumine humaine sous sa forme apo.....	22
Figure 6 : Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif.....	24
Figure 7 : Groupements chélateurs et structures de sidérophores de différents types.....	27
Figure 8 : Structure du complexe HasA-hème de <i>Serratia marcescens</i>	29
Figure 9 : Structures primaire et tridimensionnelle des RTBDs.....	35
Figure 10 : Représentation schématique en deux dimensions du bouchon.....	39
Figure 11 : Structures des domaines de signalisation des RTBDs FhuA, FpvA et PupA.....	40
Figure 12 : Représentation schématique de la structure primaire des différentes sous-classes de RTBDs.....	41
Figure 13 : Structures cristallographiques du RTBD FecA sous ses différentes formes.....	44
Figure 14 : Représentation schématique de la topologie transmembranaire des trois protéines du complexe TonB-ExbB-ExbD.....	44
Figure 15 : Structure de fragments et du domaine C-terminal de TonB.....	47
Figure 16 : Structure du domaine périplasmique de ExbD.....	48
Figure 17 : Transduction d'énergie entre TonB et le RTBD FepA selon le modèle navette....	51
Figure 18 : Transduction d'énergie entre la protéine TonB et le RTBD FepA selon le modèle rotation.....	52
Figure 19A : Mécanisme en 4 étapes d'import des ferri-sidérophores à travers les RTBDs.....	54
Figure 19B : Structure de FpvA-Pvd de <i>P. aeruginosa</i>	54
Figure 20 : Représentation schématique du transporteur ABC.....	55
Figure 21 : Les systèmes d'acquisition du fer chez <i>E. coli</i>	57
Figure 22 : Structure cristallographique du transporteur ABC de la vitamine B12 en complexe avec BtuF-vit B12.....	57
Figure 23 : Représentation schématique du mécanisme de régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par la protéine Fur.....	61
Figure 24 : Systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif.....	64
Figure 25 : Représentation schématique de l'opéron (A) et du système d'acquisition (B) de l'hème « Shu » de <i>Shigella dysenteriae</i>	65
Figure 26 : Bâtonnets de <i>P. aeruginosa</i>	70
Figure 27 : Structures primaires des trois types de Pvd's produites par <i>P. aeruginosa</i>	74
Figure 28 : Structure primaire de la Pvd de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	75
Figure 29 : Caractéristiques spectrales de la Pvd.....	77
Figure 30 : Visualisation par FRET des interaction FpvA- ferri-pyoverdine lors transport du fer <i>via</i> la Pvd.....	77
Figure 31 : Biosynthèse et maturation de la Pvd.....	79
Figure 32 : <u>A</u> Structures primaires, et <u>B</u> tridimensionnelles de FpvA, FpvA- Ferri-pyoverdine et de FpvA-Pvd	80
Figure 33A : Interaction des différentes parties de la Pvd avec les résidus du site de liaison du récepteur FpvA.	83

Figure 33B : Ferri-pyoverdine sur le site de liaison de FpvA.	83
Figure 34 : Transport de la ferri-pyoverdine et transduction du signal à travers la membran externe.....	83
Figure 35 : Cascade de signalisation et régulation de la voie Pvd.....	87
Figure 36 : Acquisition du fer par la voie Pvd chez <i>P. aeruginosa</i>	88
Figure 37 : Du gène à la structure tridimensionnelle détaillée des protéines.....	96
Figure 38 : Structure de ShuA à 2,6 Å.....	116
Figure 39 : His420, His86 et résidus de la boucle L7 de ShuA.....	117
Figure 40 : Représentation schématique du locus <i>pvd</i>	136
Figure 41 : Devenir périplasmique de la ferri-pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i>	168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : RTBDs dont les structures tridimensionnelles sont disponibles.....	34
Tableau 2 : Alignements de séquences multiples des RTBDs.....	36
Tableau 3 : Exemples de « boîtes TonB ».....	39
Tableau 4 : Facteurs de virulence produits par <i>P. aeruginosa</i>	72
Tableau 5 : Structures tridimensionnelles résolues par les différentes techniques analytiques déposées dans la PDB.....	- 92
Tableau 6 : Gènes du locus <i>pvd</i> et leur implication dans la voie Pvd.....	136

AVANT-PROPOS

Le fer est un oligo-élément essentiel à la croissance de la majorité des êtres vivants, à quelques rares exceptions. C'est un constituant de nombreuses protéines et enzymes qui ont des rôles critiques dans une multitude de processus cellulaires majeurs comme la synthèse des acides nucléiques, la respiration, la photosynthèse, le transport et le stockage de l'oxygène. Le fer présente une forte réactivité grâce à sa capacité à être réduit ou oxydé et à former des complexes organométalliques solubles. Bien qu'il soit le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, le fer est très peu soluble en milieu aérobie et à pH physiologique et est de ce fait très peu biodisponible. La concentration de l'ion Fe^{3+} accessible dans l'organisme humain durant une infection est d'environ 10^{-18} M. Cette concentration est bien trop basse pour les micro-organismes qui exigent entre 10^{-7} et 10^{-5} M de fer pour prospérer et se multiplier (Guerinot, 1994). Pour contourner ce problème, les bactéries à Gram-négatif ont développé différents systèmes sophistiqués d'acquisition du fer. Selon la source du fer, on distingue deux systèmes : le premier implique un contact direct entre la bactérie et les sources de fer exogènes (hème, hémoglobine ou transferrine), le deuxième est basé sur l'utilisation des sources indirectes du fer grâce à la production et à la libération dans le milieu extracellulaire de molécules chélatrices de fer : les sidérophores et les hémophores. Le mécanisme le plus répandu est celui qui implique les sidérophores, ayant une très forte affinité pour l'ion Fe^{3+} . Les sidérophores sont extrêmement importants, ils assurent le transport et l'incorporation du fer et peuvent également, dans le cas des bactéries pathogènes, participer à la virulence chez les plantes ou les animaux. Dans le milieu extracellulaire, les sidérophores sont capables de capter et solubiliser le fer et de le transporter à l'intérieur des cellules *via* des récepteurs spécifiques appartenant à la classe des récepteurs TonB-dépendants (RTBDs). Les RTBDs sont également impliqués dans le transport actif d'autres molécules comme la vitamine B12, l'hème, le saccharose, le maltodextrine, le nickel, le cobalt, etc. Il n'existe pas de potentiel électrique au niveau de la membrane externe et il n'y a pas de source d'énergie directement disponible dans le périplasme. L'énergie nécessaire au transport actif par les RTBDs est dérivée de la force proton-motrice générée au niveau de la membrane cytoplasmique, due à la différence de potentiel électrochimique de protons de la membrane interne.

Cette énergie est transmise au RTBD par un complexe multi-protéique ancré dans la membrane interne, TonB-ExbB-ExbD, suite à son interaction avec la partie N-terminale du RTBD. Dans le périplasme, le ferri-sidérophore est généralement pris en charge par une protéine affine périplasmique (PBP). Cette protéine est un des éléments du transporteur ABC permettant le transport du ferri-sidérophore à travers la membrane interne grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Ferguson & Deisenhofer, 2002).

Malgré les nombreuses études structurales et fonctionnelles, les modèles mécanistiques décrivant le passage du ferri-sidérophore au travers les membranes externes et internes restent très spéculatifs.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à l'étude structurale des RTBDs de bactéries à Gram-négatif et au devenir au niveau du périplasme de la ferri-pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*, après son transport à travers la membrane externe *via* le RTBD FpvA.

Pour les **études structurales**, nous avons défini et optimisé une stratégie de surexpression, de purification et de cristallisation de 4 RTBDs :

- FauA : récepteur du sidérophore « alcaligine » de *Bordetella pertussis*
- ShuA : récepteur de l'hème de *Shigella dysenteriae*
- FetA : récepteur du sidérophore « énantio-pyochéline » de *P. fluorescens*
- SuxA : récepteur du saccharose de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Le protocole mis en place nous a permis de purifier, de cristalliser et d'enregistrer des données de diffraction pour les 4 récepteurs. Ainsi, les structures de FauA et ShuA ont été résolues à 2,3 Å et 2,6 Å, respectivement. Celle de FetA est en cours d'affinement à 3,2 Å de résolution.

Pour les **études fonctionnelles**, nous nous sommes intéressés à la voie d'acquisition du fer utilisant la pyoverdine (Pvd) chez *P. aeruginosa*. Dans le locus *pvd* de cette bactérie se trouve le cluster FpvCDEFGHJK (PA2403-10) dont le rôle dans l'acquisition du fer était inconnu. Ce cluster conservé chez toutes les espèces de *Pseudomonas* produisant la Pvd (Ochsner *et al.*, 2002) est organisé en 2 opérons : *fpvCDEF* et *fpvGHJK*. Nous avons analysé l'implication des gènes de ces deux opérons dans le transport du fer par le système Pvd chez *P. aeruginosa*.

La première partie de ce manuscrit est une synthèse des données bibliographiques, elle comporte quatre chapitres :

Dans le premier chapitre, nous présentons la place du fer dans l'environnement et chez les micro-organismes en général et les bactéries à Gram-négatif en particulier, les sources de fer lors d'une infection et les mécanismes d'acquisition du fer des différentes sources par les bactéries à Gram-négatif.

Dans le deuxième chapitre, nous faisons le point sur l'état des connaissances concernant les RTBDs et les mécanismes moléculaires d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif *via* les sidérophores impliquant les RTBDs.

Dans le troisième chapitre, nous présentons brièvement les mécanismes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif.

Dans le quatrième chapitre, nous détaillons le système spécifique d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* par la voie Pvd. Nous décrivons, notamment, le mécanisme de transport de la Pvd à travers la membrane externe *via* le RTBD FpvA.

Dans la deuxième partie du manuscrit, les résultats obtenus lors de cette thèse seront présentés et discutés. Cette partie comporte deux chapitres :

Le cinquième chapitre, concerne les résultats de l'étude structurale des RTBDs. Dans ce chapitre, nous présentons d'abord l'approche mise en place pour surexprimer, purifier et cristalliser les quatre RTBDs de différentes bactéries à Gram-négatif (**article I**), et les résultats des études structurales du RTBD ShuA (**articles II et III**).

Le sixième chapitre, concerne l'étude du devenir de la ferri-pyoverdine dans le périplasme après son transport par le RTBD FpvA. Nous présentons les résultats des études fonctionnelles des protéines codées par les gènes *fpvCDEFGHJK* (**articles IV et V**).

La troisième partie de ce manuscrit est une conclusion générale.

PARTIE I

Synthèse des données bibliographiques

Chapitre I : Les sources de fer pour les bactéries à Gram-négatif

Chapitre II : Les voies de transport de fer impliquant les sidérophores et les récepteurs TonB-dépendants

Chapitre III : Acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif

Chapitre IV : Acquisition du fer par la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*

CHAPITRE I

Les sources de fer pour les bactéries à Gram-négatif

I.1. Le fer

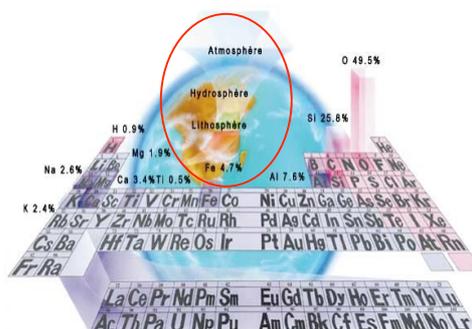
- I.1.1. Le fer sur terre
- I.1.2. Le fer chez les micro-organismes
- I.1.3. Biodisponibilité du fer
- I.1.4. Le fer et le pouvoir pathogène
- I.1.5. Homéostasie du fer

I.2. Les sources de fer lors d'une infection

- I.2.1. Les protéines de régulation de la concentration du fer
 - I.2.1.1. La transferrine et la lactoferrine
 - I.2.1.2. La ferritine
- I.2.2. L'hème et les hémoprotéines
 - I.2.2.1. L'hème
 - I.2.2.2. Les hémoprotéines
 - a) L'hémoglobine
 - b) L'haptoglobine
 - c) L'hémopexine
 - d) L'albumine
 - e) Autres hémoprotéines
- I.2.3. Le dicitrate de fer

I.3. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif

- I.3.1. Acquisition du fer ferreux libre par le système FeoABC
- I.3.2. Acquisition du fer par les sidérophores
 - I.3.2.1. Définition
 - I.3.2.2. Structure
 - I.3.2.3. Fonctions
- I.3.3. Acquisition du fer par les hémophores
 - I.3.3.1. Définition
 - I.3.3.2. Les systèmes à hémophores
 - a) Le système HxuA
 - b) Le système HasA



Dans ce chapitre, nous présentons brièvement les propriétés chimiques du fer, sa place dans l'environnement et chez les micro-organismes, les sources de fer lors d'une infection et les voies d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif.

I.1. Le fer

I.1.1. Le fer sur terre

Le fer est un métal de transition très répandu sur terre. Par ordre d'abondance, c'est le quatrième élément le plus représenté (4,7%), après l'oxygène (49,5%), le silicium (25,8%) et l'aluminium (7,8%). Le fer est présent à l'intérieur du soleil ainsi que dans beaucoup d'autres étoiles, c'est le principal composant d'une classe de météorites : les sidérites. Avec le nickel, le fer constitue un des deux éléments fondamentaux du noyau terrestre (34,6%). Dans l'environnement, le fer est présent essentiellement sous forme d'hydroxydes de fer (minerai, notamment hématite) ou sous forme d'alliages (aciers).

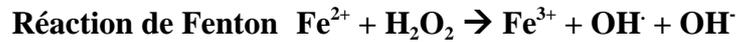
I.1.2. Le fer et les micro-organismes

À l'exception de quelques souches de *Lactobacilli* (Imbert & Blondeau, 1998) et des agents de la maladie de **lyme** : *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000) et de la **sypphilis** : *Treponema pallidum* (Posey *et al.*, 1999), tous les autres micro-organismes ont besoin du fer pour se multiplier. Le fer est impliqué en tant que co-facteur enzymatique dans de nombreux processus métaboliques majeurs comme la synthèse des acides nucléiques (Dougherty & Downs, 2006), la photosynthèse (Okamura *et al.*, 1975), la phosphorylation oxydative (Schäfer *et al.*, 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou le transfert d'électrons ((Andrews *et al.*, 2003) (Wandersman & Delepelaire, 2004)). Dans l'environnement, les degrés d'oxydation du fer les plus courants et surtout les plus stables, sont 2+ et 3+, ainsi le fer peut exister sous deux formes : **la forme réduite ferreuse** (fer ferreux : Fe²⁺) et **la forme oxydée ferrique** (fer ferrique : Fe³⁺). Grâce à sa configuration électronique, le fer ferrique est plus stable que le fer ferreux. Le potentiel redox Fe²⁺/Fe³⁺ du fer est extrêmement variable selon le ligand et les protéines présentes dans l'environnement local (entre -300 et +700 mV), expliquant son implication dans une multitude de fonctions biologiques et son pouvoir d'adaptation à différentes réactions chimiques (Braun & Killmann, 1999).

I.1.3. Biodisponibilité du fer

La biodisponibilité du fer est définie par sa capacité à être transféré dans un organisme vivant. Elle dépend des conditions acido-basiques, des conditions oxydo-réductrices et de la présence de composés complexants.

Malgré son abondance dans la nature, le fer est peu biodisponible par l'insolubilité du Fe^{3+} à pH physiologique. En milieu saturé en oxygène (8 mg/L) et à pH neutre (entre 6 et 8), le Fe^{2+} est très réactif, instable et potentiellement toxique. Il est rapidement oxydé, *via* la réaction de Fenton, en Fe^{3+} qui précipite alors sous forme d'hydroxydes de fer ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) insolubles en solution aqueuse (solubilité $< 10^{-38}$ M) (Imperi *et al.*, 2008).



La réaction de Fenton crée aussi des espèces oxygénées très réactives (ROS) comme le radical hydroxyde (OH^\cdot), qui constitue le deuxième oxydant le plus puissant présent dans la nature après le fluor. Les ROS provoquent la peroxydation des lipides membranaires, altérant la structure des lipoprotéines et la perméabilité des membranes. Les ROS entraînent également la dénaturation et l'inactivation des protéines par l'oxydation des acides aminés et leur désamination en dérivés carbonylés et par la fragmentation des chaînes polypeptidiques. Au niveau de l'ADN, de nombreuses lésions sont induites par les ROS. Les bases azotées de l'ADN sont en effet très sensibles aux espèces oxygénées, qui induisent la formation de nombreux dérivés par addition, oxydation ou fragmentation (Touati, 2000). Dans la cellule, il est donc nécessaire que le fer soit séquestré et stocké dans différentes protéines, qui contiennent majoritairement les espèces ferreuses et ferriques, afin d'éviter la formation des radicaux libres. Le stockage intracellulaire strict du fer accentue l'effet de carence dû à sa très faible solubilité. À pH 7, la concentration du fer ferrique soluble dans les cellules est de l'ordre de 10^{-9} M (Ratledge & Dover, 2000b). Dans les fluides corporels, cette concentration est d'environ 10^{-18} M, alors que la croissance optimale des micro-organismes nécessite 10^{-7} à 10^{-5} M (environ 10^5 ions Fe^{2+} /cellule bactérienne) (Bullen, 1981). Pour faire face à la faible disponibilité du fer chez les organismes qu'ils colonisent, les micro-organismes ont donc développé deux stratégies sophistiquées pour acquérir le fer de leur environnement (Guerinot, 1994) : réduction du fer ferrique en fer ferreux ou utilisation de chélateurs capables de capter et de solubiliser le fer ferrique (sidérophores ou hémophores) (Neilands, 1995).

I.1.4. Le fer et pouvoir pathogène

La capacité d'un pathogène à se multiplier avec succès chez l'hôte colonisé est un facteur essentiel à l'établissement et au maintien de l'infection. Le niveau de fer environnemental est un facteur important lié à la synthèse de certains déterminants de la virulence requis pour la pathogénicité des micro-organismes. Ainsi, un faible taux de fer

induit l'expression d'un certain nombre de toxines bactériennes et les facteurs de virulence (Sritharan, 2006). Il a été montré que la production des facteurs de virulence, tels que l'endoprotéase et l'exotoxine A, chez *P. aeruginosa* est régulée par la quantité de fer environnemental (Wilderman *et al.*, 2001). Chez certaines bactéries pathogènes, comme *Yersinia*, la virulence de certaines souches est corrélée avec la présence sur le chromosome bactérien d'une région appelée **îlot de haute pathogénicité**, codant pour un système d'acquisition du fer permettant à la bactérie d'acquérir, de séquestrer et d'utiliser rapidement le fer de l'hôte lors d'une infection (Rakin *et al.*, 1999).

I.1.5. Homéostasie du fer

Le fer est un élément paradoxal, indispensable à toutes les formes de vie, mais également toxique en raison de sa capacité à réagir avec l'oxygène et à catalyser la production de formes radicalaires. L'homéostasie du fer est strictement régulée chez les êtres vivants afin d'assurer un équilibre entre leur besoin d'acquérir le fer et le maintien d'une concentration en fer non toxique pour les cellules. Par conséquent, le fer à l'état libre n'existe pas chez les mammifères qui possèdent un grand nombre de protéines permettant de véhiculer le fer dans les fluides biologiques ou à travers les membranes cellulaires et de le mettre en réserve sous une forme facilement disponible, mais non toxique (Storz & Imlay, 1999). Cinq stratégies de base sont utilisées par les bactéries pour assurer l'homéostasie du fer :

- Transport, avec une grande affinité, du fer environnemental sous ses différentes formes.
- Stockage du fer dans la cellule (bacterioferitine, ferritine ...) (Andrews, 1998).
- Utilisation des systèmes de résistance au stress oxydant par dégradation des espèces oxygénées réactives et réparation des dommages induits par le stress oxydant.
- Contrôle de la consommation du fer par la régulation de l'expression des protéines impliquées dans son acquisition, son utilisation et son stockage.
- Coordination de la machinerie d'homéostasie du fer en fonction de la disponibilité du fer.

Bien que ces cinq stratégies forment la base générale de l'homéostasie du fer chez les bactéries à Gram-négatif, la manière dont elles sont remplies varie considérablement selon les conditions environnementales, la niche écologique et la phylogénie considérée (Andrews *et al.*, 2003).

I.2. Les sources de fer lors d'une infection

Quel que soit l'environnement colonisé par les bactéries, sa concentration en fer est généralement très faible (entre 10^{-9} et 10^{-18} M) et est largement inférieure aux besoins des bactéries (10^{-7} à 10^{-5} M). Pour pallier cette carence et afin de pouvoir coloniser l'environnement dans lequel elles se trouvent, les bactéries à Gram-négatif ont développé plusieurs mécanismes pour solubiliser et acquérir le fer des diverses sources. Selon la nature du contact établi entre les bactéries et la source du fer, on distingue deux mécanismes généraux :

- Le premier implique un contact direct entre les bactéries et les sources de fer exogènes comme l'hème, l'hémoglobine ou la transferrine.
- Le second implique un contact entre les bactéries et des molécules synthétisées par les micro-organismes (bactéries et champignons) et libérées dans le milieu extracellulaire (sidérophores et hémophores), ces molécules sont capables de chélater le fer avec une grande affinité et le délivrent aux bactéries.

La femme et l'homme adultes contiennent un niveau constant de fer de l'ordre de 45 et 55 mg par kg, respectivement, réparti entre les sites d'utilisation (essentiellement moelle osseuse et hématies), et les sites de stockage (essentiellement macrophages et foie). Le fer circule entre les sites de stockage et les sites d'utilisation en fonction des besoins. L'hémoglobine contient environ 60% du fer total, la myoglobine, les cytochromes et les autres enzymes à fer en comprennent 10%, le reste se distribuant entre la protéine majeure de stockage : la ferritine (29%) et son produit de dégradation, l'hémosidérine (1%). La transferrine, protéine de transport extracellulaire, n'intervient que dans le stockage de 0,1-0,2% du fer total. Le fer fonctionne pratiquement en circuit fermé, il est majoritairement recyclé.

I.2.1. Les protéines de régulation de la concentration du fer

I.2.1.1. La transferrine et la lactoferrine

La transferrine (Tf) (ou sidérophiline) et la lactoferrine (Lf) (ou lactotransferrine) (**figure 1**) sont deux glycoprotéines monomériques ubiquitaires chez les vertébrés, leur poids moléculaire est d'environ 80 kDa. La Tf est présente dans le sérum, la Lf dans la lymphe et les sécrétions mucoales (Wandersman & Delepelaire, 2004). Ces protéines présentent une très forte affinité pour le fer ferrique (Lf : K_a d'environ 10^{22} M⁻¹) (Aisen & Harris, 1989) et une faible affinité pour le fer ferreux (Lf : K_a d'environ 10^3 M⁻¹) (Aisen & Listowsky, 1980). La Tf et la Lf peuvent agir comme des protéines bactériostatiques en privant les

bactéries du fer indispensable à leur croissance. La Lf et la Tf partagent plusieurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, comme la capacité de lier le fer très fortement et de façon réversible, des structures primaires (environ 60% d'identité de séquence) et tridimensionnelles (deux lobes globulaires C et N, dont chacun contient un site de liaison d'un atome de fer) hautement conservées (Baker, 1994.). Cependant, la Lf a des propriétés exclusives la différenciant de la Tf comme sa capacité à retenir le fer à un pH très bas, une surface chargée positivement et d'autres caractéristiques de sa surface lui conférant des fonctions additionnelles telle que son double rôle de transport du fer vers les cellules et de protection contre la toxicité du fer ((Schryvers & Stojiljkovic, 1999) (Ratledge & Dover, 2000)). De nombreux micro-organismes, comme les *Neisseriaceae*, les *Pasteurellaceae* et les *Moraxellaceae*, etc., ont développé des stratégies pour se procurer le fer à partir de la Tf et de la Lf (Cornelissen, 2003).

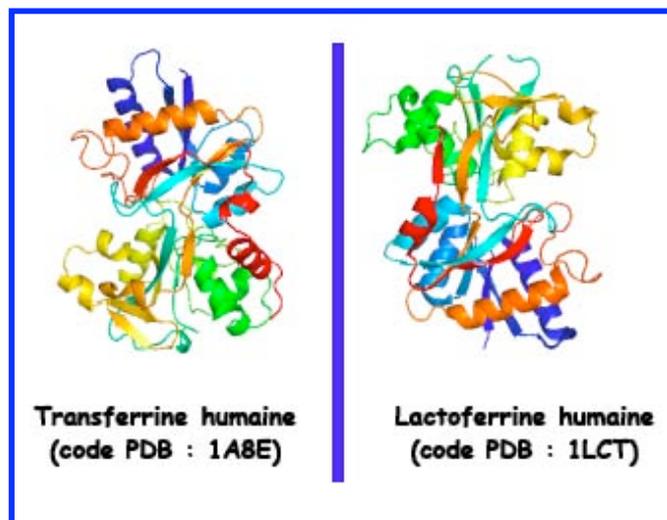


Figure 1 : Structure de la Tf et de la Lf humaines sous leurs formes apo

I.2.1.2. La ferritine

La ferritine (**figure 2**) est une hétéroprotéine cytoplasmique de stockage du fer d'un poids moléculaire d'environ 500 kDa. La ferritine est conservée chez tous les organismes, elle est présente non seulement chez les vertébrés mais aussi chez les insectes, les plantes (phytoferritines) et les micro-organismes (bactérioferritine chez les bactéries) (Carrondo, 2003). Seules les levures semblent pouvoir se passer de la ferritine en stockant le fer dans la vacuole.

La ferritine comporte :

Une **enveloppe** d'environ 120 Å de diamètre, correspondant à l'apo-ferritine (**figure 2A et B**), constituée de 24 sous-unités identiques ou très similaires assemblées en forme de sphère. Un **noyau** de stockage de fer d'environ 80 Å de diamètre (**figure 2C**), pouvant renfermer jusqu'à 4500 ions Fe^{3+} : cas des iso-ferritines basiques. Les différentes isoformes sont formées par l'assemblage de deux types de sous-unités : les sous-unités H (*Heavy*) acides et les sous-unités L (*Light*) basiques. Le poids moléculaire des sous-unités L est de 19 kDa, celui des sous-unités H est de 21 kDa. Les iso-ferritines basiques interviennent dans le stockage du fer à long terme, elles sont principalement présentes dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les iso-ferritines acides sont rencontrées principalement dans le myocarde, le placenta, les cellules tumorales et, en plus petites quantités, dans les organes de stockage du fer (You & Wang, 2005). Il a été démontré que le stockage de fer dans la ferritine inclut une première étape de liaison du Fe^{2+} à la ferroxidase, suivie d'une étape d'oxydation au sein du centre de la ferroxidase et finalement l'entrée du fer Fe^{3+} au centre de la ferritine (**figure 2C et D**) ((Andrews, 1998) (Carrondo, 2003)). Il existe peu d'études montrant la capacité des bactéries à utiliser la ferritine comme source de fer pour leur croissance. Néanmoins, il a été démontré que le fer de la ferritine peut être réduit par *Listeria monocytogenes* à l'aide d'une réductase associée à la surface de la bactérie (Deneer *et al.*, 1995).

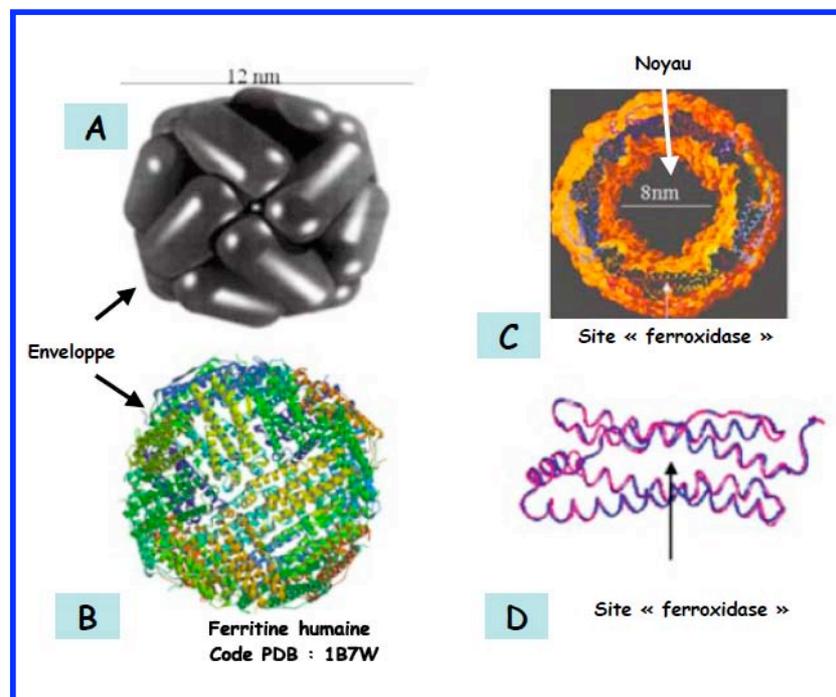


Figure 2 : Structure de la ferritine humaine

I. 2. 2. L'hème et les hémoprotéines

I. 2. 2.1. L'hème

L'hème (**figure 3**) est une ferro-protoporphyrine de type IX issue de l'association d'une protoporphyrine IX et d'un atome de Fe^{2+} . *In vitro*, l'hème s'oxyde facilement en hémine (Berl & Chandra, 1993). L'hème constitue le groupement prosthétique des apo-hémoprotéines impliquées dans des processus métaboliques très variés, devenant ainsi des hémoprotéines actives. Par conséquent, la fonction de l'hème dépendra des protéines auxquelles il se lie (Dawson, 1988). L'hème constituant de l'hémoglobine et de la myoglobine est responsable du transport et du stockage de l'oxygène, respectivement. Au centre de la protoporphyrine, l'atome de fer est hexacoordiné. Quatre de ces coordinations fixent le fer sur les 4 atomes d'azote de la porphyrine. Les deux autres le lient à deux His de l'hémoprotéine. Cette structure peut recevoir une molécule d' O_2 . Dans les cytochromes, l'hème est impliqué dans le transport d'électrons et la génération d'énergie. Dans les catalases, il sert à transformer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Panek & O'Brian, 2000). Dans les peroxydases, il catalyse l'oxydation des substrats en présence du peroxyde d'hydrogène (Maines, 1997). L'hème agit également comme molécule régulatrice qui peut moduler la transcription de certains gènes, la traduction, mais aussi la localisation et la stabilité des protéines (Yamamoto *et al.*, 1982). L'hème constitue une source importante de fer pour plusieurs bactéries, mais également une source de protoporphyrine pour les bactéries incapables de synthétiser l'anneau tétrapyrrolo, telles que *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* et *Haemophilus influenzae* (Wandersman & Delepelaire, 2004). Les bactéries ont développé différentes stratégies pour utiliser les différentes formes d'hème exogène et obtenir ainsi le fer.

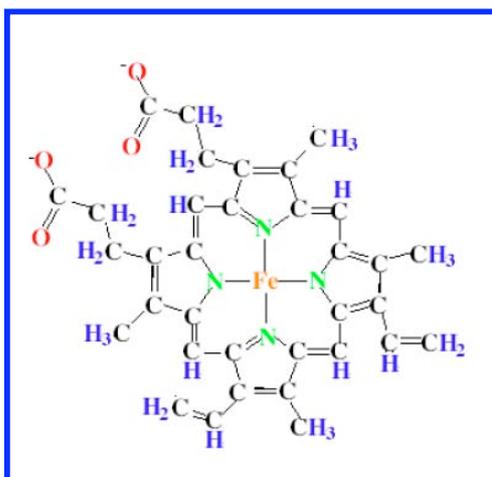


Figure 3 : Représentation schématique de la molécule d'hème

La structure de la protoporphyrine IX consiste en l'assemblage de quatre noyaux pyrroles (tétrapyrrole). Le fer (II) est lié au noyau tétrapyrrole pour former la molécule d'hème.

I. 2. 2.2. Les hémoprotéines

Une hémoprotéine, appelée aussi protéine à hème, est une protéine contenant

comme groupement prosthétique une molécule d'hème, liée de façon covalente ou non covalente à la protéine elle-même. Les hémoprotéines regroupent aussi bien les protéines de stockage et de transport du fer, que des protéines enzymatiques.

a) L'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) (**figure 4**) est un hétéro-tétramère de 64 kDa contenu dans les globules rouges dont il représente environ 35% de la masse totale. Sa principale fonction est de transporter l'O₂ des poumons aux tissus et de ramener le CO₂ des tissus aux poumons. L'Hb fait partie de la superfamille des globulines, il est constitué de 4 chaînes de globines : 2 chaînes α (144 acides aminés chacune) et 2 chaînes β (146 acides aminés chacune). Chaque globine lie une molécule d'hème contenant un atome de fer, constituant ainsi le site actif où se fixe réversiblement l'O₂ (Wandersman & Delepelaire, 2004). Dans l'organisme, l'Hb est trouvée sous diverses formes : la déoxyhémoglobine (hème-Fe²⁺), l'oxyhémoglobine (hème-Fe²⁺-O₂) et la méthémoglobine (hème-Fe³⁺, pas de fixation possible de l'O₂). L'affinité de l'Hb pour l'hème varie entre 10¹³ M⁻¹ (hème-Fe³⁺) et de 10¹⁶ M⁻¹ (hème-Fe²⁺) (Genco & Dixon, 2001). Des bactéries pathogènes comme *Neisseria* spp. et *Hemophilus influenzae* ont développé différentes stratégies spécifiques pour acquérir l'hème de l'hémoglobine (Wandersman & Stojiljkovic, 2000).

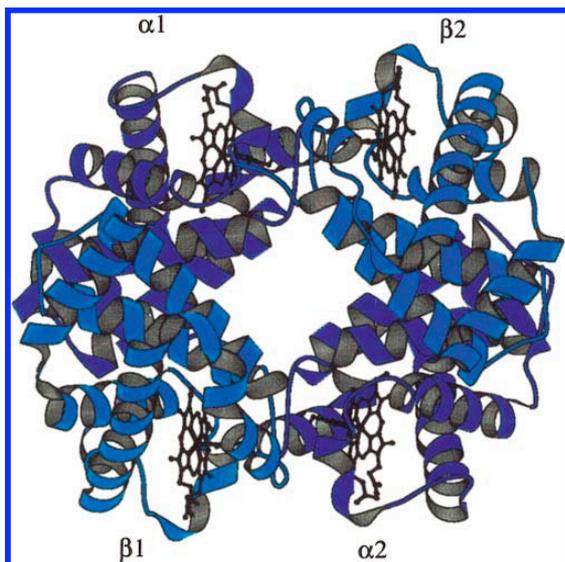


Figure 4 : Structure de l'oxyhémoglobine humaine (code PDB : 1HGA)

L'hémoglobine est un hétéro-tétramère constitué de deux globines α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et deux globines β ($\beta 1$ et $\beta 2$) liées par des liaisons faibles. Les sous-unités sont structurellement similaires et ont le même poids moléculaire. Chaque globine contient une molécule d'hème.

b) L'haptoglobine

L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine tétra-mérique comprenant deux chaînes α légères et deux chaînes β lourdes, on la retrouve essentiellement dans le plasma sanguin. Suite à une hémolyse spontanée des érythrocytes, 80 à 800 nM d'Hb se retrouvent dans le sérum. L'Hb est rapidement complexée de façon équimolaire à l'Hp permettant de conserver le fer qu'elle contient en empêchant son élimination par les reins. L'Hp présente une forte affinité pour l'Hb, le complexe Hp-Hb est indissociable ($K_d < 10^{-15}$ M (Dryla *et al.*, 2003)), stable, soluble et non-filtrable par le glomérule. Le complexe Hp-Hb constitue une source de fer pour plusieurs bactéries comme *Haemophilus influenzae* (Morton *et al.*, 1999).

c) L'albumine

L'albumine (**figure 5**) est une protéine globulaire d'environ 68 kDa, qui représente 55 à 65% des protéines plasmatiques totales. Elle est composée de trois domaines homologues codés probablement par le même gène, chaque domaine lie une molécule d'hème avec une affinité d'environ 10^8 M⁻¹ (Gattoni *et al.*, 1996). L'albumine est essentielle pour le maintien de la pression osmotique indispensable à la bonne répartition des liquides entre les vaisseaux sanguins et les tissus ou le milieu interstitiel (Morgan *et al.*, 1988). En absence d'études qui montrent la présence de récepteurs spécifiques pour l'albumine chez les bactéries, il est très probable que l'hème lié à l'albumine soit reconnu par les récepteurs de l'hème permettant son transfert passif de l'albumine (Wandersman & Delepelaire, 2004).

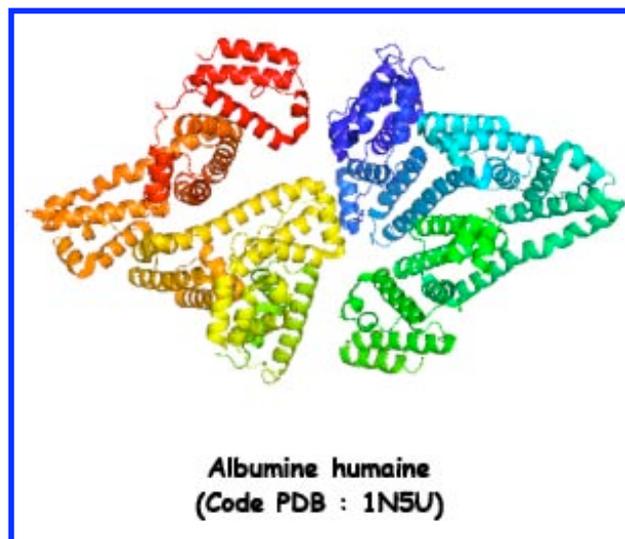


Figure 5 : Structure de l'albumine humaine sous sa forme apo

d) L'hémopexine

L'hémopexine (Hpx) est une glycoprotéine plasmatique de 60 kDa formée de deux domaines similaires agencés en feuillet β , l'hème se lie à l'interface des deux domaines. L'Hpx lie l'hème avec une affinité d'environ 10^{13} M^{-1} (Paoli *et al.*, 1999). Plusieurs bactéries sont capables d'utiliser le complexe hème-Hpx comme par exemple *Haemophilus influenzae* (Stull, 1987). Cependant, il n'existe pas d'études montrant une utilisation directe et spécifique de ce complexe par les bactéries (Wandersman & Delepelaire, 2004).

e) Autres hémoprotéines

Chez les animaux, il existe beaucoup d'autres hémoprotéines dans lesquelles l'hème n'est pas lié de façon covalente à la protéine comme la myoglobine, la leghémoglobine, la catalase et le cytochrome de type b. Les bactéries ne sont pas dotées de systèmes permettant d'acquérir l'hème contenue dans ces hémoprotéines.

I.2.3. Le dicitrate de fer

Le citrate est un intermédiaire réactionnel produit lors du cycle de Krebs par la citrate synthétase. Dans le milieu extracellulaire, le citrate peut se dimériser et devient un chélateur d'ions, notamment du fer. Le dicitrate de fer peut être transporté par des porines, PhoE (Saken *et al.*, 2000). Cependant, le transport du dicitrate de fer peut aussi être effectué de manière spécifique par le système *fecABCDE*, identifié initialement chez *E. coli* et par la suite chez plusieurs autres bactéries Gram-négatives (Pressler *et al.*, 1988).

I.3. Acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif

Le fer libre est extrêmement limité chez l'hôte mammifère, ce qui constitue un obstacle important pour la multiplication des bactéries pathogènes lors du processus infectieux. Le corps humain contient 3 à 5 g de fer, dont 99.9% ne sont pas accessibles aux bactéries (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). Le fer est généralement complexé avec les protéines de stockage et de transport (décrites précédemment) ou réduit sous sa forme ferreuse dans les cellules. La limitation du fer libre dans le sang fait partie des réponses de la phase aiguë de la réaction immunitaire innée de l'hôte pendant la première phase de l'infection. Une acquisition adéquate du fer est essentielle à la croissance et à la survie des bactéries pathogènes, mais aussi à l'expression des facteurs de virulence indispensables à l'établissement et au maintien des infections. Les bactéries à Gram-négatif ont développé plusieurs systèmes pour pouvoir acquérir le fer de l'hôte lors de l'infection (**figure 6**). La mise en oeuvre de ces systèmes dépend à la fois de la disponibilité du fer dans l'environnement, mais aussi de la forme sous laquelle il existe (ionique, complexe héminique...) et de ses différents degrés d'oxydation.

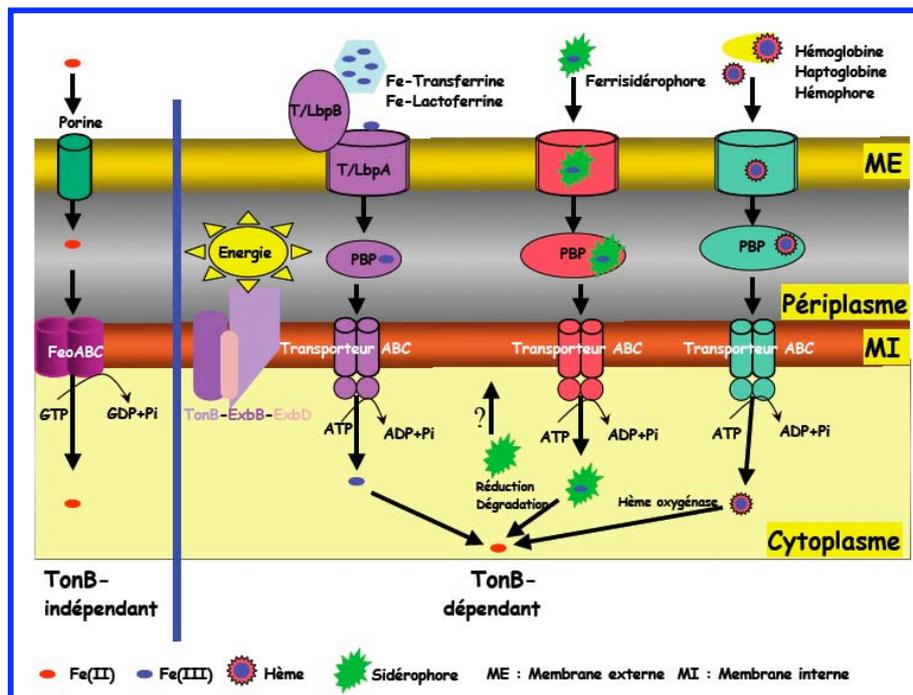


Figure 6 : Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif

Le transport passif du Fe^{2+} à travers la membrane externe se fait par diffusion passive à travers les porines, son transport actif à travers la membrane interne est assuré par le système FeoABC. L'énergie nécessaire à ce transport est issue de l'hydrolyse du GTP par FeoB. L'acquisition du fer *via* la transferrine, l'hème, les hémoprotéines et les sidérophores implique les récepteurs TonB-dépendants et nécessite de l'énergie, elle est fournie par le complexe multi-protéique TonB-ExbD-ExbB de la membrane interne. Le transport à travers la membrane interne implique généralement un transporteur ABC, l'énergie nécessaire à ce transport est fournie par l'hydrolyse cytoplasmique de l'ATP.

I.3.1. Acquisition du fer ferreux libre par le système FeoABC

Dans les conditions anaérobies (concentration en oxygène < 2 mg/L) et/ou à pH acide (pH < 4), le Fe³⁺ environnemental est réduit par les réductases ferriques produites par les entérobactéries en Fe²⁺ soluble. Ce dernier traverse la membrane externe par diffusion passive via les porines (Andrews *et al.*, 2003). Les gènes *feoABC*, identifiés initialement chez *E. coli*, codent pour les protéines du système FeoABC impliquées dans le transport à travers la membrane cytoplasmique du Fe²⁺ internalisé dans le périplasme par les porines (Kammler *et al.*, 1993). Dans le système FeoABC : **FeoB** est une protéine intégrale de la membrane interne d'environ 773 acides aminés spécifique du fer ferreux et contenant un domaine à activité GTPase situé dans la partie N-terminale de la protéine. Le rôle des protéines **FeoA** et **FeoC** dans l'acquisition du fer ferreux n'est pas encore complètement élucidé ((Marlovits *et al.*, 2002) (Hantke, 2003)). Le système FeoABC est particulièrement important dans des environnements particuliers (pH acides, anaérobiose) où le fer extracellulaire se trouve essentiellement sous forme ferreuse. C'est le cas par exemple chez *Helicobacter pylori* qui colonise l'estomac (Velayudhan *et al.*, 2000) et chez *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* qui colonise l'intestin (Boyer *et al.*, 2002)

I.3.2. Acquisition du fer par les sidérophores

I.3.2.1. Définition

Les sidérophores sont des composés chimiques généralement hydrosolubles, de faible poids moléculaire (< 2500 Da) produits par les micro-organismes aérobies (bactéries et champignons) et les plantes (phytosidérophores des graminées) dans les conditions de carence en fer (Ratledge & Dover, 2000a). Les sidérophores sont considérés comme des métabolites secondaires. Ils sont riches en hétéro-atomes oxygénés et azotés susceptibles d'entrer en interaction avec les ions métalliques. Les sidérophores sont capables de chélater le Fe³⁺ avec une grande affinité (jusqu'à 10⁵² M⁻¹ pour l'entérobactine et l'altérobactine (Drechsel & Jung, 1998)). Les bactéries peuvent utiliser leurs propres sidérophores (endogènes), mais également des sidérophores synthétisés par d'autres micro-organismes (exogènes ou hétérologues), dans ce cas on parle de « *cross-feeding* ». Par exemple, *E. coli* ne produit qu'un seul sidérophore : l'entérobactine, mais elle est capable d'utiliser une large variété de sidérophores exogènes dont le ferrichrome produit par le champignon *Ustilago sphaerogena*.

I.3.2.2. Structure

Plus de 500 sidérophores bactériens ont été décrits et caractérisés chimiquement (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Malgré une grande diversité structurale, tous les sidérophores sont caractérisés par la présence **d'un, de deux** ou, dans la majorité des cas, **de trois** groupements bidentés de chélation qui sont généralement oxygénés (Loomis & Raymond, 1991). Les groupements bidentés sont cruciaux, ils servent à la formation d'un complexe octaédrique hexacoordonné stable entre le sidérophore et le Fe^{3+} . Il faut trois groupements bidentés pour satisfaire les règles de coordination de l'ion Fe^{3+} (Neilands, 1995). Selon le nombre de groupes bidentés présents par molécule de sidérophore, la chélation du fer se fera avec une stœchiométrie (fer/sidérophore) de 1:1, 2:1 ou encore 3:1 (Winkelmann, 2002). Les ligands du fer sont généralement classés en trois groupes différents selon la nature de la fonction chimique impliquée dans la chélation du fer : les **phénols/catéchols**, les **hydroxamates** et les **α -hydroxycarboxyliques (figure 7)** (Faraldo-Gomez & Sansom, 2003). Cette classification est très succincte, elle ne doit pas masquer la grande variété structurale de ces molécules à l'intérieur de chaque classe. Les sidérophores varient généralement par le nombre ou l'organisation tridimensionnelle des groupements chélateurs. Tous les sidérophores n'obéissent pas à cette règle de classification. En effet, plusieurs fonctions peuvent être impliquées chez un même sidérophore, ou encore la chélation du fer peut faire intervenir d'autres fonctions que celles qui sont décrites. Les bactéries du genre *Pseudomonas* produisent des sidérophores mixtes et fluorescents, appelés pyoverdines. Ils sont constitués d'un chromophore dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, d'un groupement peptidique (de 6 à 12 acides aminés) fixé au chromophore en position C1 et d'une chaîne latérale fixée en position C3 du chromophore ((Budzikiewicz, 1993) (Budzikiewicz, 2004)).

I.3.2.3. Fonctions

Les sidérophores peuvent extraire le fer des hydroxydes ferriques insolubles, mais également des divers composés ferriques solubles de l'hôte (Tf-fer, ferritine-fer...), ou encore des chélateurs artificiels. De ce fait, ils se comportent comme des chélateurs, médiant l'échange de fer entre les stocks extracellulaires et les transporteurs de sidérophores localisés dans la membrane externe des bactéries. Le système d'acquisition du fer *via* les sidérophores est essentiel à la survie et la croissance des bactéries vivant dans le sol et les milieux aqueux, mais également lors des infections (Lamont *et al.*, 2002).

Les sidérophores sont le plus souvent considérés comme des facteurs de virulence, ils

permettent la compétition entre le pathogène et l'hôte pour le fer (Miethke & Marahiel, 2007). Des pathogènes animaux et végétaux altérés dans leurs outils génétiques de production de sidérophores, d'acquisition des ferri-sidérophores ou de régulation de la capture du fer sont hypo-virulents. Par exemple, chez *Erwinia chrysanthemi* (phytopathogène provoquant la pourriture molle chez les plantes à tubercules), des mutants non producteurs de chrysobactine ou d'achromobactine (deux sidérophores produits par la bactérie) sont très affectés dans leur pouvoir pathogène (Expert *et al.*, 1996). Les sidérophores, ou leurs analogues, peuvent également agir directement comme antibiotiques en privant de fer un micro-organisme pathogène par chélation compétitive.

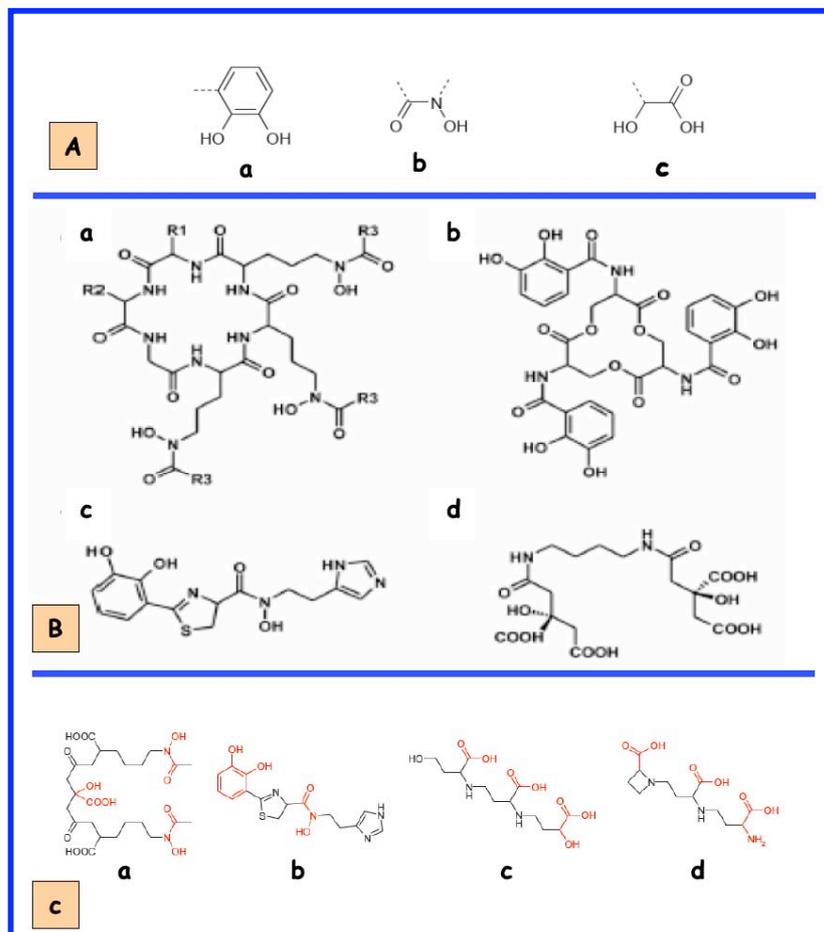


Figure 7 : Groupements chélateurs et structures de sidérophores de différents types

A) Groupements chélateurs :

- (a) phénol/catéchol
- (b) hydroxamate
- (c) acide α -hydroxycarboxylique

B) Structure de sidérophores de type :

- (a) hydroxamate (Ferrichrome)
- (b) catécholate (Entérobactine)
- (c) catécholate-hydroxamate (Vibriobactine)
- (d) hydroxycarboxylate (Dicitrate)

C) Sidérophores n'appartenant à aucune classe définie

- (a) aérobactine
- (b) anguibactine
- (c) acide avénique
- (d) nicotianamine

I.3.3. Acquisition du fer par les hémophores

I.3.3.1. Définition

Les hémophores sont des protéines synthétisées et sécrétées dans le milieu extracellulaire par certaines bactéries dans les conditions de carence en fer. Leur rôle consiste à chélater l'hème libre, ou l'extraire des hémoprotéines et de le délivrer à des récepteurs spécifiques au niveau de la membrane externe (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). Le transfert de l'hème, des hémoprotéines à l'hémophore, se fait par diffusion passive grâce à la grande affinité des hémophores pour l'hème (Letoffe *et al.*, 1999). Les hémophores décrits jusqu'à présent étaient produits par les bactéries à Gram-négatif. Cependant, des protéines sécrétées (IsdX1 et IsdX2) agissant comme les hémophores ont été récemment identifiées chez une bactérie à Gram-positif : *Bacillus anthracis* (Maresso *et al.*, 2008). Deux systèmes à hémophores ont été décrits : le système HxuA identifié chez *Haemophilus influenzae* (Cope *et al.*, 1995) et le système HasA identifié chez plusieurs bactéries dont *Serratia marcescens* (Letoffe *et al.*, 1994), *P. auruginosa* (Letoffe *et al.*, 1998), *P. fluorescens* (Idei *et al.*, 1999) et *Yersinia pestis* (Rossi *et al.*, 2001).

I.3.3.2. Les systèmes à hémophores

a) Le système HxuA

Hxu (pour *Hemopexin utilization*) est un système à hémophore décrit chez *Haemophilus influenzae*. Cette bactérie est dépourvue de la voie de synthèse de l'hème, indispensable à sa croissance aérobie. Par contre, elle peut utiliser les différentes sources d'hème disponibles dans l'environnement et plus particulièrement le complexe hème-hémopexine grâce au système Hxu. Le système Hxu comprend trois protéines : HxuA, HxuB et HxuC.

- **HxuA**, protéine sécrétée de 100 kDa, correspond à l'hémophore (Hanson *et al.*, 1992). Dans le milieu extracellulaire, HxuA pourrait reconnaître le complexe hème-hémopexine, extraire l'hème et le délivrer au récepteur de la membrane externe HxuC (Morton *et al.*, 2007).
- **HxuB**, protéine de la membrane externe de 65 kDa, serait requise pour la sécrétion de l'hémophore HxuA dans le milieu extracellulaire.
- **HxuC**, récepteur de la membrane externe de 70 kDa appartenant à la classe des RTBDs, est requis pour le transport de l'hème au travers de la membrane externe (Cope *et al.*, 1995).

b) Le système HasA

Has (pour *Haem acquisition system*), identifié pour la première fois chez *Serratia marcescens* (Letoffe *et al.*, 1994), constitue le second système à hémophore. Chez *Serratia marcescens*, l'hémophore HasA, protéine monomérique de 19 kDa sécrétée dans le milieu extracellulaire, permet l'acquisition de l'hème extracellulaire libre ou lié à l'hémoglobine. Elle fixe l'hème avec une très forte affinité ($5,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (Deniau *et al.*, 2003)). Les structures tridimensionnelles d'HasA en présence et en absence de l'hème sont résolues par cristallographie et par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), respectivement. HasA ne présente aucune homologie structurale avec les autres protéines fixant l'hème, elle adopte un repliement de type α/β (**figure 8**). HasA est constituée de quatre hélices α qui occupent une face de la structure, et d'un feuillet de sept brins β antiparallèles occupant l'autre face. A l'interface α/β , deux boucles (en regard l'une de l'autre) constituent la poche de fixation d'une molécule d'hème à l'état oxydé (Arnoux *et al.*, 1999).

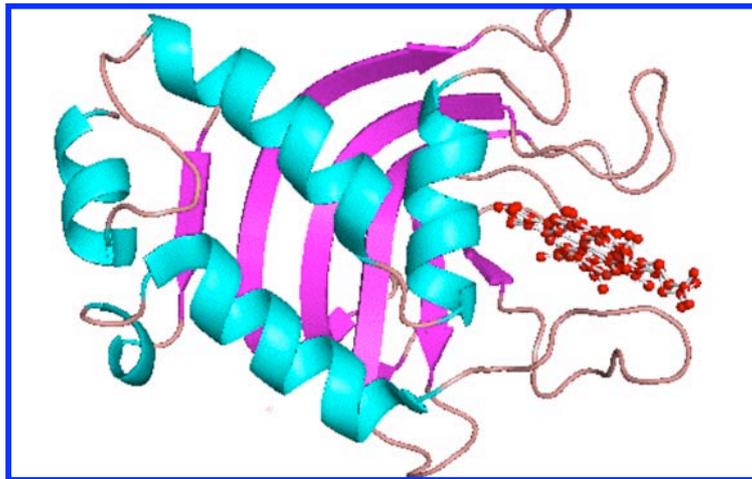


Figure 8 : Structure du complexe HasA-hème de *Serratia marcescens* (Arnoux *et al.*, 1999)

CHAPITRE II

Les voies de transport de fer impliquant les sidérophores et les récepteurs TonB-dépendants

II.1. Les récepteurs TonB-dépendants (RTBDs)

II.1.1. Abondance

II.1.2. Rôles biologiques

II.1.3. Structures primaire et tridimensionnelle

- a) Le tonneau β
- b) Le bouchon
- c) Le domaine de signalisation

II.1.4. Classification

II.1.5. Interaction ferri-sidérophore-RTBD

II.1.5.1. Site de liaison et formation du complexe ferri-sidérophore-RTBD

II.1.5.2. Changements de conformation du RTBD

- a) Changements de conformation au niveau des boucles
- b) Changements de conformation au niveau de la boîte TonB
- c) Changements de conformation au niveau du domaine de signalisation

II.2. Le complexe TonB-ExbB-ExbD (système Ton)

II.2.1. La protéine TonB d'*E. coli*

- a) Topologie
- b) Structures du domaine C-terminal

II.2.2. Les protéines ExbB-ExbD d'*E. coli*

- a) La protéine ExbB
- b) La protéine ExbD

II.2.3. Stoechiométrie du complexe TonB-ExbB-ExbD

II.2.4. Interaction TonB-RTBD

II.2.5. Transduction d'énergie par le complexe TonB-ExbB-ExbD

II.2.5.1. Le modèle navette

II.2.5.2. Le modèle impliquant une rotation

II.3. Transport à travers la membrane externe

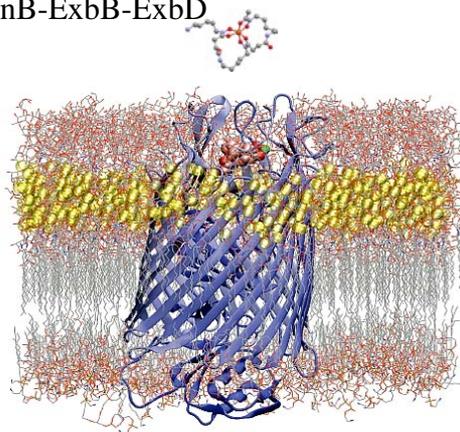
II.4. Transport à travers la membrane interne

II.5. Dissociation des complexes ferri-sidérophores

II.6. Régulation génétique de l'acquisition du fer

II.6.1. Régulation par la protéine Fur

II.6.2. Régulation par les facteurs ECF



Dans ce chapitre, nous faisons le point sur l'état actuel des connaissances concernant les RTBDs et l'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries à Gram-négatif.

L'enveloppe des bactéries à Gram-positif est composée d'une seule membrane, la membrane cytoplasmique, entourée d'une épaisse couche de biopolymère appelé peptidoglycane ou muréine. Le peptidoglycane est une structure rigide mais hautement dynamique, son épaisseur est comprise entre 5 et 8 nm. Il confère à la bactérie sa forme et constitue en quelque sorte un squelette, lui permettant de résister à la pression osmotique interne et de renforcer son imperméabilité aux molécules potentiellement toxiques et aux antibiotiques.

Les bactéries à Gram-négatif possèdent une enveloppe constituée de deux membranes, l'une interne et l'autre externe, séparées par l'espace périplasmique.

La membrane interne est symétrique, elle est constituée d'une bicouche de phospholipides traversée par des protéines dont la partie transmembranaire est organisée en hélices α (transporteurs ABC, cytochromes...).

Le périplasma est un compartiment visqueux pouvant représenter jusqu'à 40% du volume total de la bactérie, il contient essentiellement le peptidoglycane. Ce dernier est lié de manière covalente à la lipoprotéine majeure de Braun de la membrane externe.

La membrane externe est très asymétrique, elle est composée de phospholipides du côté périplasmique et majoritairement de lipopolysaccharides (ou lipooligosaccharides : cas de *Neisseriae*) dans sa face extracellulaire. Cette membrane est riche en protéines (près de 50% de sa masse) permettant un échange avec le milieu extérieur, et pouvant former des canaux spécifiques ou non et permettant l'entrée de nutriments ou l'extrusion de macromolécules. Ces protéines ont pour caractéristique d'adopter une structure en tonneaux β . Au niveau de la membrane externe on retrouve aussi une autre catégorie de protéines membranaires associée à la membrane par une modification lipidique en N-terminal : les lipoprotéines (Koebnik *et al.*, 2000).

Chez les bactéries à Gram-négatif, l'enveloppe bactérienne constitue à la fois une barrière efficace qui protège la machinerie cellulaire contre les agents toxiques externes (agressions physiques, chimiques et biologiques) et une structure complexe qui contient divers complexes protéiques assurant le transport d'éléments indispensables à la survie et à la croissance bactérienne. Le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité membranaires joue un rôle primordial dans la défense naturelle de la bactérie. L'activité des diverses familles d'antibiotiques est fortement dépendante des mécanismes de transport membranaire, qui interviennent en modulant la concentration intracellulaire de la molécule antibactérienne.

II.1. Les récepteurs TonB-dépendants (RTBDs)

Les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 600 Da (acides aminés, monosaccharides, ions...) et se trouvant dans le milieu extracellulaire à fortes concentrations, diffusent passivement à travers la membrane externe des bactéries à Gram-négatif *via* les porines (Braun, 2001).

En plus de leur faible concentration dans le milieu extracellulaire, les complexes ferriques (sidérophores, hème...) sont trop volumineux pour diffuser passivement à travers la membrane externe qui ne permet pas le passage des molécules dont le poids moléculaire est supérieure à 600 Da (Nikaido, 2003). Le transport actif de ces complexes est assuré par des protéines spécifiques appartenant à la famille des récepteurs de la membrane externe et à la classe des récepteurs TonB-dépendants (RTBDs) (Ferguson & Deisenhofer, 2002), présentant des caractéristiques communes quant à leur structure et leurs fonctions (Krewulak & Vogel, 2007). Les RTBDs sont généralement spécifiques d'un ligand particulier et ont pour lui une très grande affinité (Kd d'environ 0,1 nM dans le cas des sidérophores) ((Schalk *et al.*, 2001) (Schalk, 2008)). Le contact entre les RTBDs et la source du fer peut être direct (cas de hème, de l'hémoglobine...) ou indirect par l'intermédiaire d'une molécule adaptatrice produite par les bactéries comme les sidérophores et les hémophores (Wandersman & Delepelaire, 2004).

II.I.1. Abondance

L'analyse des 686 génomes bactériens séquencés a permis d'identifier 4600 RTBDs putatifs chez 347 espèces, 98 d'entre eux sont caractérisés et leurs ligands déterminés (complexes ferriques, oligosaccharides...) (Mirus *et al.*, 2009). Le nombre de gènes qui code pour les RTBDs varie selon les bactéries, il varie entre un dans le cas de certaines bactéries aquatiques et 120 chez de nombreuses bactéries opportunistes (Blanvillain *et al.*, 2007). Chez les bactéries à Gram-négatif, une analyse géomique a révélé la présence de gènes codant pour les RTBDs chez 71% d'entre elles. Par exemple, l'étude du génome de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (un pathogène végétal) a permis d'identifier 72 gènes codant pour des RTBDs. L'analyse fonctionnelle de ces 72 RTBDs a permis de montrer que 9 gènes RTBD sont surexprimés dans les conditions de carence en fer, l'expression des autres est spécifiquement induite par des molécules d'origine végétale comme le saccharose (sucre majeur chez les végétaux) (Blanvillain *et al.*, 2007).

II.1.2. Rôles biologiques

Il a été longtemps considéré que les RTBDs étaient impliqués essentiellement dans le transport actif des complexes ferriques. Depuis 2004, de nombreuses études menées chez des espèces bactériennes colonisant les différentes niches écologiques terrestres, aquatiques et humaines suggèrent l'implication des RTBDs dans des voies de signalisation et dans des processus métaboliques très différents de l'acquisition du fer. Des données récentes montrent que les RTBDs sont impliqués dans le transport des sucres (maltose et sucrose) (Schauer *et al.*, 2008) et de nombreux métaux (Braud *et al.*, 2009b). Les RTBDs peuvent également véhiculer des antibiotiques sous forme de complexes, ferri-sidérophore-antibiotique, appelés sidéromycines (Ferguson *et al.*, 2001). Ainsi, le RTBD FhuA est capable de transporter l'albomycine liée au sidérophore phenylferricrocine (analogue structural synthétique du ferrichrome). FhuA transporte également un autre antibiotique dérivé de la rifamycine, appelé CGP 4832. Dans ces exemples, la membrane externe ne constitue plus une barrière sélective pour l'entrée des antibiotiques, mais facilite et augmente leur taux d'entrée grâce à ce transport actif. La concentration minimale inhibitrice de ces antibiotiques peut ainsi être réduite de plusieurs centaines de fois ((Ferguson *et al.*, 2000) (Braun & Bran, 2002a)). Les RTBDs peuvent également servir de sites de liaison pour les bactériophages (T1, T5, Φ 80...) et les bactériocines (colicines E, M, B et D, microcine 25 et albomycine) (Cascales *et al.*, 2007). Des mutants dans le système TonB sont dans certains cas résistants à des bactériophages et-ou aux colicines (Cao & Klebba, 2002). La corrélation entre l'expression des RTBDs et le développement et la virulence des bactéries à Gram-négatif font de ces récepteurs des cibles potentielles pour l'élaboration d'une nouvelle génération d'antibiotiques. Pour cela une meilleure connaissance des RTBDs, de leurs partenaires et de leurs interactions est indispensable.

II.1.3. Structures primaire et tridimensionnelle

Les structures tridimensionnelles de 10 RTBDs d'espèces bactériennes différentes, vides ou en complexe avec leurs ligands naturels et-ou avec des molécules utilisées lors de la cristallisation (antibiotiques, détergent, ions...) ont été résolues par cristallographie : FhuA, FepA, FecA, BtuB et Cir d'*E. coli*, FpvA et FptA de *P. aeruginosa*, FauA de *Bordetella pertussis*, HasR de *Serratia marcescens* et ShuA de *S. dysenteriae* (**tableau 1**). Malgré la faible conservation des séquences (8 à 35% d'identité - **tableau 2**) et une étroite spécificité pour leurs ligands, tous les RTBDs sont formés des mêmes domaines caractéristiques (**figure 9**).

Tableau 1 : RTBDs dont les structures tridimensionnelles sont disponibles

RTBD	Ligand naturel	Structures résolues en complexe avec :	Micro-organisme	Références
FhuA	Ferrichrome	LPS	<i>E. coli</i>	(Ferguson <i>et al.</i> , 2002b)
		Ferrichrome-Fer +LPS		(Ferguson <i>et al.</i> , 2002b)
		Albomycine + LPS		(Ferguson <i>et al.</i> , 2000)
		TonB		(Pawelek <i>et al.</i> , 2006)
		Rifamycine		(Ferguson <i>et al.</i> , 2001)
		Ferrichrome-Fer Ferrichrome-Fer		(Ferguson <i>et al.</i> , 1998a) (Locher <i>et al.</i> , 1998)
FepA	Entérobactine	Vide		(Buchanan <i>et al.</i> , 1999)
FecA	Dicitrate	Vide		(Yue <i>et al.</i> , 2003)
		Dicitrate		(Yue <i>et al.</i> , 2003)
		Dicitrate de fer		Yue <i>et al.</i> , 2003)
		Dicitrate de fer		(Ferguson <i>et al.</i> , 2002a)
BtuB	Vitamine B12	Vide		(Chimento <i>et al.</i> , 2003)
		Vit B12		
		Vit B12 + Ca ²⁺		
		Vit B12 + Colicine E3		
Cir	Colicine	Vide		(Buchanan <i>et al.</i> , 2007)
		Colicine I		
FpvA	Pyoverdine	Vide		(Brillet <i>et al.</i> , 2007)
		Pyoverdine	<i>P. aeruginosa</i>	(Cobessi <i>et al.</i> , 2005b)
		Pyoverdine-Fer		(Wirth <i>et al.</i> , 2007)
FptA	Pyochéline	Pyochéline-Fer		(Cobessi <i>et al.</i> , 2005a)
HasR	Hème	HasA	<i>Serratia marcescens</i>	(Krieg <i>et al.</i> , 2009)
		HasA-Hème		
FauA*	Alcaligine	Vide	<i>Bordetella pertussis</i>	(Brillet <i>et al.</i> , 2009)
ShuA*	Hème	Vide	<i>S. dysenteriae</i>	(Cobessi <i>et al.</i> , 2010)

LPS : Lipopolysaccharide

Vit : Vitamine

*Structure résolue lors de cette thèse

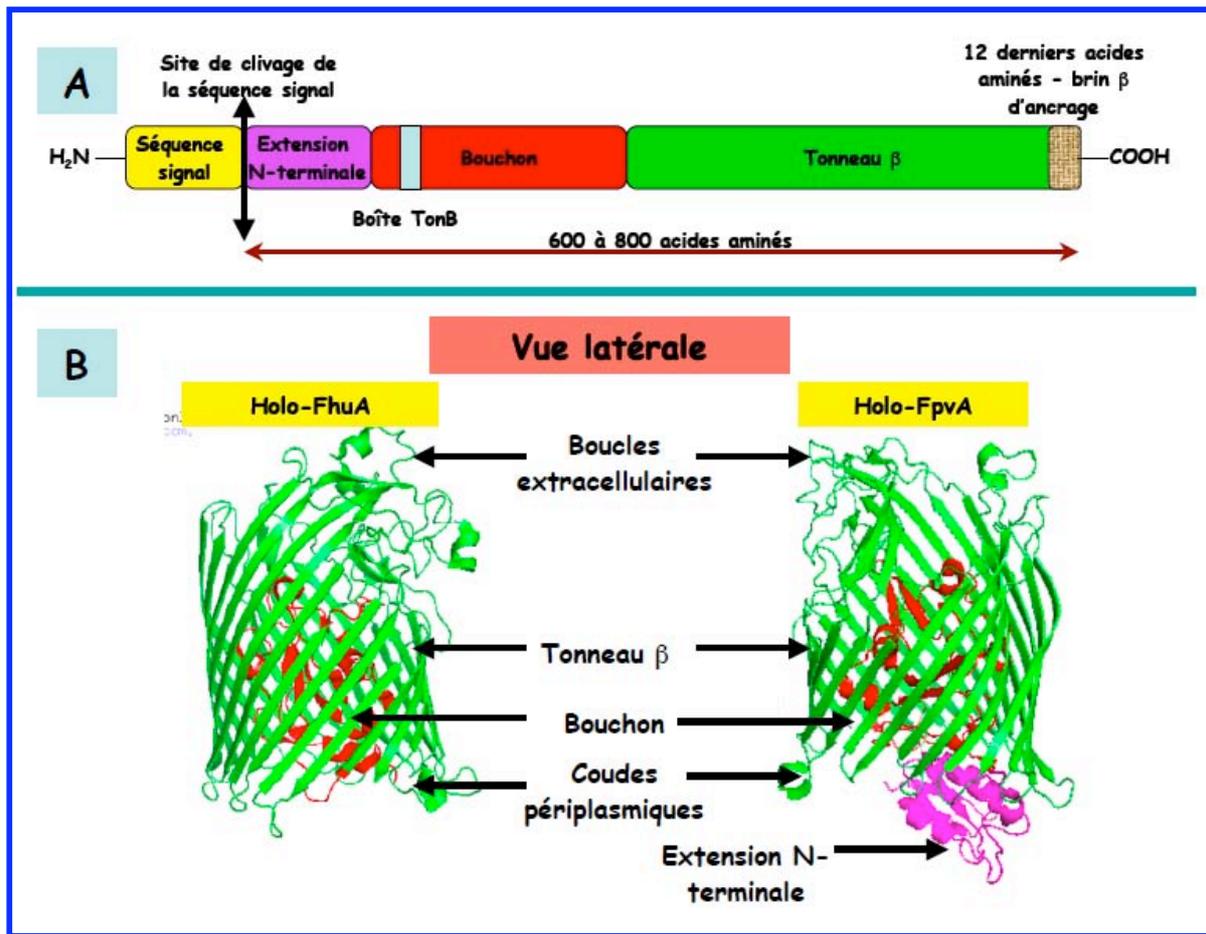


Figure 9 : Structures primaire et tridimensionnelle des RTBDs

A) Représentation schématique par domaines de la structure primaire des RTBDs. Le domaine de signalisation est présent uniquement dans les RTBDs transducteurs (comme FpvA).

B) Structure tridimensionnelle de FhuA d'*E. coli* et de FpvA de *P. aeruginosa* sous leurs formes apo. Les RTBDs sont constitués de deux à trois domaines structuraux distincts. Le transport est assuré par les domaines tonneau et bouchon.

Tableau 2 : Alignements de séquences multiples des RTBDs

TBDR -1-	aa	TBDR-2-	aa	Identité (%)
FhuA	747	FecA	774	14
		BtuB	614	15
		FepA	746	8
		FpvA	815	17
		FptA	720	17
		Cir	663	12
		HasR	899	14
		FauA	734	16
FecA	774	BtuB	614	16
		FepA	746	11
		FpvA	815	11
		FptA	720	11
		Cir	663	16
		HasR	899	13
		FauA	734	10
BtuB	614	FepA	746	17
		FpvA	815	15
		FptA	720	15
		Cir	663	24
		HasR	899	16
		FauA	734	16
FepA	746	FpvA	815	13
		FptA	720	11
		Cir	663	29
		HasR	899	10
		FauA	734	11
FpvA	815	FptA	720	31
		Cir	663	12
		HasR	899	13
		FauA	734	35
FptA	720	Cir	663	13
		HasR	899	15
		FauA	734	30
Cir	663	HasR	899	14
		FauA	734	15
HasR	899	FauA	734	13

De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, on trouve une séquence signal, suivie dans certains cas d'un domaine de signalisation, puis du domaine bouchon (*plug*), et enfin le tonneau β (*β -barrel*). La séquence signal, petit peptide d'environ 30 acides aminés permettant l'adressage des protéines de la membrane externe et des protéines extracellulaires au-delà de la membrane interne de la bactérie, est clivée au cours de la maturation de la protéine. Les différences majeures entre les structures des différents RTBDs résident dans la conformation et la longueur des boucles extracellulaires du tonneau β , qui est spécifique pour chaque RTBD.

a) Le tonneau β

Le tonneau β ou domaine C-terminal (en vert sur la **figure 9**) forme un tonneau hydrophobe ancré dans la membrane externe, il correspond au domaine structural du RTBD donnant à la protéine sa forme de tonneau β . Il traverse de part et d'autre la membrane externe et fait face directement aux lipides membranaires, il entretient avec les lipopolysaccharides des interactions électrostatiques et des liaisons de Van der Waals. Le dernier acide aminé du tonneau est toujours aromatique (Trp ou Phe), il serait important pour l'adressage des RTBDs au niveau de la membrane externe (Struyvé *et al.*, 1991). La hauteur du tonneau varie entre 55 Å (BtuB) et 70 Å (FepA), le diamètre du pore qu'il forme varie entre 30 Å (FepA) et 40 Å (BtuB) (Chimento *et al.*, 2005). Le tonneau β est constitué de 22 brins β transmembranaires antiparallèles inclinés de 45° par rapport à l'axe du tonneau, ils s'étendent de 30 à 40 Å au-delà des limites de la membrane externe. Les brins β sont connectés par 11 longues boucles flexibles (« *loops* » : L1 à L11) du côté extracellulaire et par 10 courts coudes (« *short turns* » : T1 à T10) du côté périplasmique (Ferguson & Deisenhofer, 2002). La longueur en acides aminés des boucles est très variable selon le ligand fixé et-ou transporté par le RTBD, elle varie entre 2 acides aminés (L6 de FptA) et 37 acides aminés (L7 de FepA) (Krewulak & Vogel, 2007). En raison de leur flexibilité et-ou de l'absence du ligand, certaines boucles ne sont pas observées dans la densité électronique lors de la résolution des différentes structures des RTBDs. L'implication des boucles dans la fixation et lors du transport est démontrée par les expériences de mutagenèse dirigée (Schalk *et al.*, 2009).

b) Le bouchon

Le bouchon « domaine *plug* » (en rouge sur la **figure 9**) correspond au domaine N-terminal du RTBD. Ce domaine globulaire comporte environ 150 acides aminés, il obture le tonneau et empêche ainsi le passage passif et incontrôlé des nutriments dans le périplasma à travers les RTBDs. Ce domaine délimite deux régions au sein du tonneau β :

La première est extracellulaire, elle est exposée au solvant et comprend le site de liaison du ligand.

La seconde est exposée au périplasma et elle est accessible aux protéines périplasmiques et de la membrane interne comme la protéine TonB.

Le bouchon est constitué d'un **coeur hydrophobe** de 4 brins β parcourus d'un nombre variable d'hélices α , et de 3 boucles apicales (*loop 1*, *loop 2* et *loop 3*, en rouge sur la **figure 10**) exposées au milieu extracellulaire et impliquées dans la fixation du ligand ((Ferguson & Deisenhofer, 2002) (Wiener, 2005)). Il est lié au tonneau β par 40 à 70 liaisons hydrogène, et par deux ponts salins conservés formés entre les résidus conservés du bouchon (2 Arg) et du tonneau β (2 Glu) (Yue *et al.*, 2003). Les alignements de séquences de BtuB, FepA, FhuA et FecA ont montré que 26 résidus sont strictement conservés dans les séquences de ces RTBDs, 14 d'entre eux sont situés dans le bouchon et 12 dans le tonneau β . Les 14 résidus conservés dans le bouchon forment 9 motifs de séquences. Deux d'entre eux «IRG et PGV» seraient indispensables au repliement correct du bouchon à l'intérieur du tonneau β , à la stabilisation du RTBD et à la structuration du site d'interaction avec le ligand (**figure 10**) (Chimento *et al.*, 2005). Les 12 résidus conservés dans le tonneau β sont situés au niveau des brins β . Parmi ces résidus, deux Glu sont toujours impliquées dans la formation de ponts salins avec deux Arg conservées du bouchon : Glu542 (brin β 14) et Glu587 (brin β 16) du tonneau et Arg150 et Arg196 du bouchon dans le cas de FhuA (Yue *et al.*, 2003).

Il existe dans la partie N-terminale du bouchon une séquence consensus conservée sans structure secondaire particulière constituant une signature de la classe des RTBDs, appelée «boîte TonB» (**tableau 3**). La boîte TonB est composée essentiellement d'acides aminés hydrophobes. Lors du transport, la boîte TonB interagit « physiquement » avec la protéine TonB de la membrane interne. Cette interaction est essentielle pour l'énergisation du RTBD et donc à la translocation et à l'internalisation du ligand à travers la membrane externe *via* le RTBD (Krewulak & Vogel, 2007).

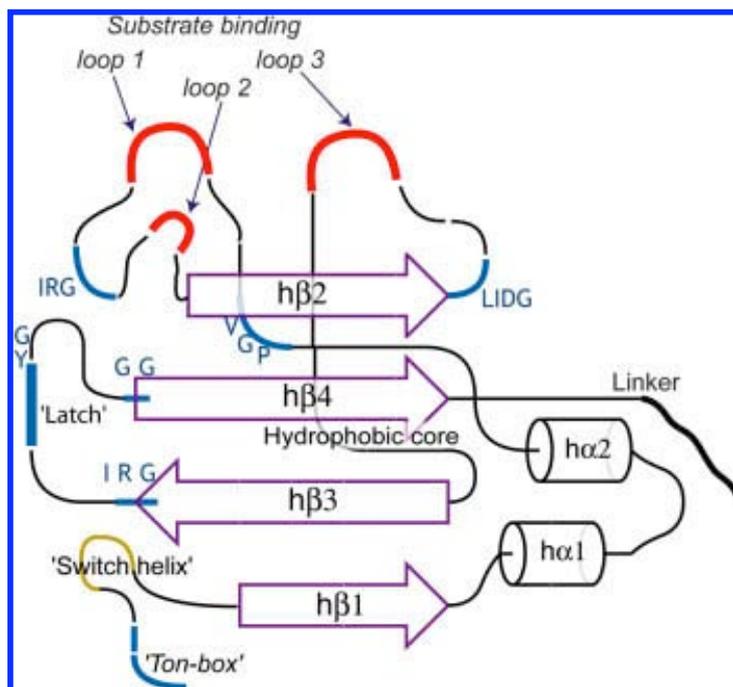


Figure 10 : Représentation schématique en deux dimensions du bouchon (Chimento *et al.*, 2005)

Les structures secondaires conservées sont indiquées (hélices α : cylindres, brins β : rectangles, boucles : traits simples). Les motifs conservés de fonction connue ou inconnue sont représentés en bleu. Les boucles apicales constituant le site de liaison du ligand en rouge. La « Switch helix », présente uniquement chez FhuA et FecA, en jaune.

Tableau 3 : Exemples de « boîtes TonB »

RTBD	Ligand fixé et-ou transporté	Boîte TonB
FpvA	Pyoverdine	GATMITS
FptA	Pyochéline	ESTSATQ
HasR	Hème-Hémophore HasA	DSLTV
BtuB	Vitamine B12	DTLVV
ShuA	Hème/Hémoglobine	MTVTATG
FepA	Entérobactine	DDTIV
FhuA	Ferrichrome	DTITV
FecA	Dicitrate de fer	DALTV

c) Le domaine de signalisation

Les RTBDs transducteurs (*cf.* § II.1.4) présentent un domaine globulaire supplémentaire d'environ 80 résidus, situé en N-terminal entre la séquence signal et le bouchon, appelé «extension N-terminale» ou «domaine de signalisation» ((Schalk *et al.*, 2004) (Koebnik, 2005)). Par interaction avec un facteur anti- σ de la membrane interne, ce domaine a pour rôle de signaler la présence du ferri-sidérophore à un facteur σ cytoplasmique approprié, permettant ainsi la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer (*cf.* § II.6.1 et IV.5) (Visca *et al.*, 2002). Le domaine de signalisation n'existe que chez une petite proportion de RTBDs, par exemple, les RTBDs FecA d'*E. coli* (Buchanan *et al.*, 1999) et FpvA de *P. aeruginosa* (Cobessi *et al.*, 2005b) en possèdent un domaine de ce type. Le domaine de signalisation n'est pas impliqué dans le transport du ligand, les RTBDs FecA et FpvA délaîtés de ce domaine restent fonctionnels pour le transport du fer ((Shen *et al.*, 2002) (Schalk, 2008)). La structure tridimensionnelle du domaine de signalisation a été résolue par cristallographie pour FpvA (Brillet *et al.*, 2007) et par RMN pour FecA (Garcia-Herrero & Vogel, 2005) et PupA (récepteur de la pseudobactine de *P. putrida*) (Ferguson *et al.*, 2007) (**figure 11**). Pour les trois RTBDs, le domaine de signalisation est formé de 2 hélices α prises en «sandwich» entre deux 2 feuillets β composés de plusieurs brins β antiparallèles (Ferguson *et al.*, 2007).

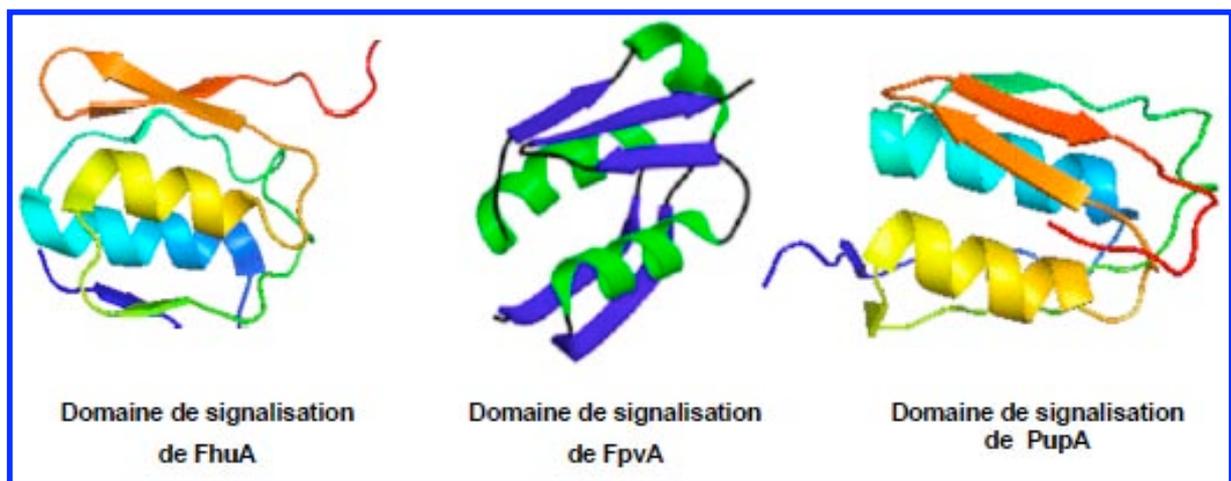


Figure 11 : Structures des domaines de signalisation des RTBDs FhuA, FpvA et PupA
Le domaine de signalisation est formé de 2 hélices α prises en « sandwich » entre deux 2 feuillets β .

II.1.4. Classification

Les RTBDs peuvent être classés en 4 sous-classes en fonction de la présence d'un domaine de signalisation et/ou du domaine Oar en plus des deux domaines caractéristiques de la classe des RTBDs, en l'occurrence le bouchon et le tonneau β (**figure 12**) :

- Les RTBDs conventionnels présentent une structure conventionnelle comprenant le bouchon et le tonneau β .
- Les RTBDs transducteurs conventionnels possèdent, en plus des deux domaines conventionnels, un domaine de signalisation.
- Les RTBDs transducteurs de type Oar présentent une seconde extension N-terminale (domaine Oar), en *sandwich* entre le domaine de signalisation et le bouchon. Le domaine Oar, identifié initialement chez des pathogènes végétaux comme *Myxococcus xanthus* et *Xanthomonas* spp, serait impliqué dans la différenciation et dans l'entrée en sporulation.
- Les RTBDs conventionnels de type Oar présentent un domaine Oar juste avant le bouchon (Koebnik, 2005).

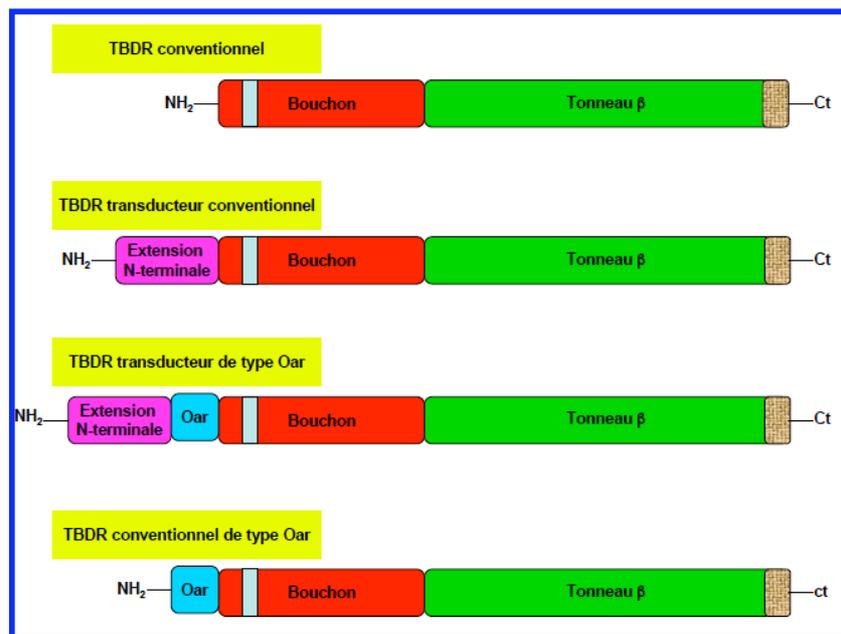


Figure 12 : Représentation schématique de la structure primaire des différentes sous-classes de RTBDs (Koebnik, 2005)

Les différents arrangements protéiques possibles définissent 4 sous-classes de RTBDs, en fonction de l'absence ou de la présence du domaine de signalisation et/ou du domaine Oar en plus des 2 domaines caractéristiques de la classe des RTBDs : le bouchon et le tonneau β .

Dans la suite de ce chapitre, nous développons le système d'acquisition du fer par les sidérophores.

II.1.5. Interaction ferri-sidérophore-RTBD

II.1.5.1. Site de liaison et formation du complexe ferri-sidérophore-RTBD

Le site de liaison du ferri-sidérophore est toujours localisé sur la face extracellulaire des RTBDs. Il est spécifique d'un seul ou d'un nombre restreint de ferri-sidérophores. Il est composé de résidus localisés dans les boucles apicales et extracellulaires et dans les brins du bouchon et du tonneau. La composition en acides aminés et les propriétés électrostatiques du site de liaison dépendent étroitement de la nature chimique du ferri-sidérophore. Par exemple dans le cas de FecA, il est composé de résidus chargés positivement (5 Arg) qui interagissent avec le citrate chargé négativement ((Ferguson *et al.*, 2002) (Yue *et al.*, 2003)). Dans le cas de FptA, il est constitué de résidus hydrophobes qui interagissent avec la pyochéline hydrophobe (Cobessi *et al.*, 2005a). Les structures de FpvA-Pvd (Cobessi *et al.*, 2005b) et de FecA-dicitrate (Yue *et al.*, 2003) montrent une conformation ouverte au niveau des boucles, ce qui les rend prêts à accueillir une molécule de ferri-sidérophore. Cette observation indique qu'en absence de ferri-sidérophore, les RTBDs ne sont pas fonctionnellement actifs. Les études de liaison réalisées sur FepA (Payne *et al.*, 1997) et sur FpvA (Clément *et al.*, 2004) ont montré que la liaison du ferri-sidérophore se fait selon une cinétique biphasique énergie indépendante. **La première étape** est rapide et dépendante de la concentration en ferri-sidérophores. Elle correspond probablement à l'attraction, à l'adsorption et à la liaison du ferri-sidérophore à la surface du RTBD grâce à des résidus situés à la surface et au niveau du site de liaison. **La deuxième étape** est plus lente et indépendante de la concentration en ferri-sidérophores. Elle correspondrait au positionnement «correct» du ferri-sidérophore dans son site de liaison. Les ferri-sidérophores se lient à leur RTBD correspondant avec des affinités de l'ordre du nano molaire ((Schalk *et al.*, 2001) (Hoegy *et al.*, 2005)). Cette liaison se fait par des interactions électrostatiques et des contacts de van der Waals. Elle implique essentiellement les trois boucles apicales du bouchon (L1, L2 et L3), mais aussi des résidus du tonneau et des boucles extracellulaires comme les boucles L3 (BtuB et FhuA), L4 (BtuB, FhuA et FecA), L7 ou L8 (FhuA et FecA). Dans le cas de FpvA, les études cristallographiques et de mutagenèse dirigée ont montré que les boucles L4, L7, L9 et L11 sont impliquées dans l'acquisition du complexe ferri-pyoverdine ((James *et al.*, 2005) (Nader *et al.*, 2007) (Greenwald *et al.*, 2009)). L'ensemble de ces résultats suggère l'implication des boucles extracellulaires dans l'acquisition des ferri-sidérophores par les RTBDs. La résolution des structures de FhuA-albomycine (Ferguson *et al.*, 2000) et FhuA-rifamycine (Ferguson *et al.*, 2001), révèle que ces antibiotiques se lient également au niveau du site de liaison du récepteur.

II.1.5.2. Changements de conformation du RTBD

a) Changements de conformation au niveau des boucles

La liaison du ferri-sidérophore à son site de liaison n'induit que très peu de changements conformationnels au niveau des domaines tonneau et bouchon du récepteur. Ainsi, la comparaison des structures des trois formes de FecA (FecA vide, FecA-citrate et FecA-dicitrate-Fe), ne montre aucune différence sur la structure du tonneau β et du bouchon, en présence et en absence du dicitrate ou du dicitrate de fer (**figure 13A**). En revanche, des changements conformationnels importants sont observés au niveau des boucles extracellulaires, des boucles apicales du bouchon et de la boîte TonB. En présence du dicitrate de fer, les boucles L7 et L8 recouvrent le site de liaison du ferri-sidérophore et l'isolent ainsi complètement du milieu extracellulaire (Yue *et al.*, 2003). La délétion de ces boucles, abolie la liaison et le transport du dicitrate de fer (Sauter & Braun, 2004). Dans la structure de FptA-ferri-pyochéline, la boucle L8 recouvre également le site de liaison (Cobessi *et al.*, 2005a). Dans le cas de FhuA, les études structurales ne révèlent pas le recouvrement du site de liaison par les boucles extracellulaires. Par contre, la délétion de la boucle L8 abolie la fixation et le transport du ferrichrome (Endriss & Braun, 2004). Dans le même contexte, des études de dynamique moléculaire suggèrent que cette boucle pourrait recouvrir le site de liaison (**figure 13B**) (Feraldo-Gomez *et al.*, 2003). Le recouvrement du site de liaison par les boucles extracellulaires semble donc être une caractéristique commune pour tous les RTBDs.

b) Changements de conformation au niveau de la boîte TonB

La liaison du ferri-sidérophore à son site de liaison engendre la propagation d'un signal à travers le bouchon, qui engendre des changements de conformation en N-terminal au niveau de la boîte TonB. Ces changements de conformation se traduisent dans le cas de FhuA et FecA par le déroulement d'une hélice adjacente de la boîte TonB : la "switch helix" ((Ferguson *et al.*, 1998a) (Ferguson *et al.*, 2001) (Ferguson & Deisenhofer, 2002) (Yue *et al.*, 2003)). Le déroulement de cette hélice entraînerait un changement de la conformation au niveau du bouchon permettant à la boîte TonB de se déplacer vers le périplasme et d'interagir avec la protéine TonB de la membrane interne (Ferguson & Deisenhofer, 2004).

Dans la cellule, le nombre de protéines TonB est limité par rapport au nombre de RTBDs, ces derniers rentrent alors en compétition pour la protéine TonB. Un signal serait donc nécessaire pour différencier l'état libre de l'état chargé en holo-sidérophore du RTBD.

Lorsque le ferri-sidérophore se fixe au niveau de son site de liaison, le signal est propagé à travers le tonneau et le bouchon et est transmis jusqu'à la protéine TonB *via* la boîte TonB, indiquant la présence du ferri-sidérophore et l'occupation du RTBD. La flexibilité de la boîte TonB, due essentiellement à la liaison du ferri-sidérophore, augmente la probabilité d'interaction entre le RTBD et la protéine TonB (Howard *et al.*, 2001).

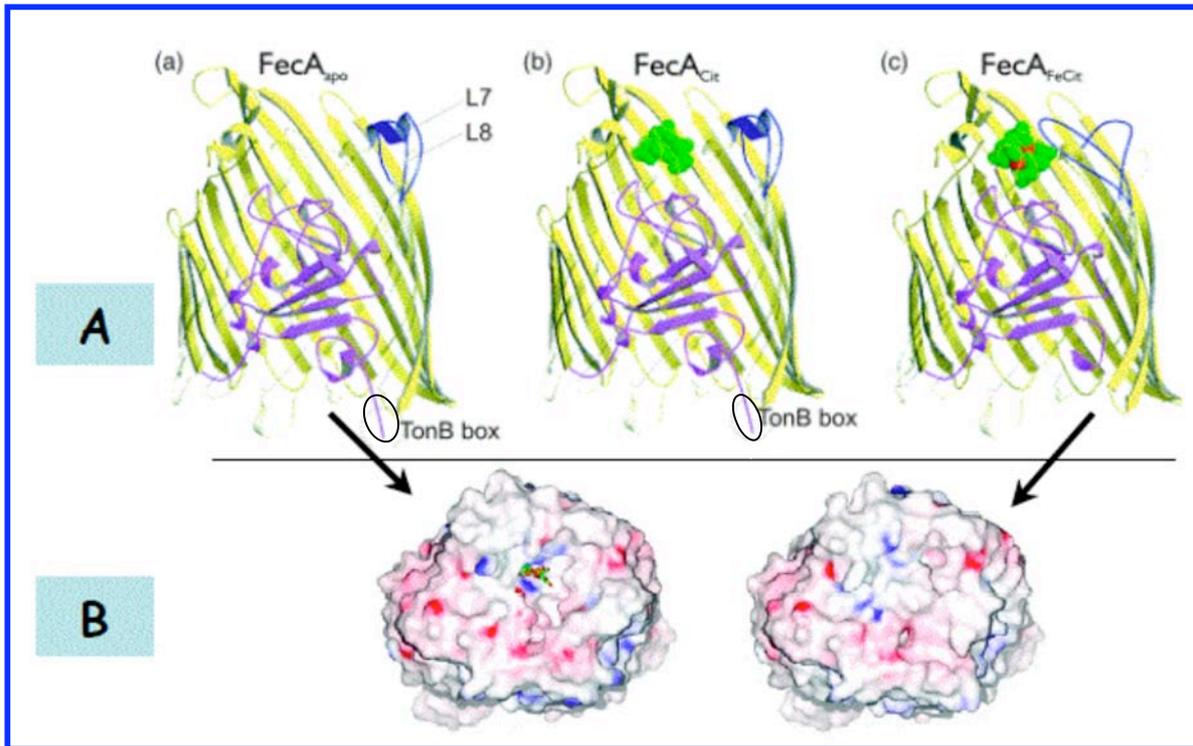


Figure 13 : Structures cristallographiques du RTBD FecA sous ses différentes formes

A : (a) FecA_{apo} : vide, (b) FecA_{Cit} : chargée en dicitrate, (c) FecA_{FeCit} : chargée en dicitrate de fer. Le tonneau est coloré en jaune, le bouchon en violet, les boucles extracellulaires L7 et L8, qui changent de conformation lors de la liaison du dicitrate de fer, sont colorées en bleu. La boîte TonB, visible dans les structures de FecA et de FecA-Citrate, est encerclée (Yue *et al.*, 2003).

B : Représentation des potentiels électrostatiques positif (en bleu) et négatif (en rouge) de la surface de FecA.

A gauche, avec le dicitrate, le site de liaison est ouvert et accessible.

A droite, avec le dicitrate-Fe, le site de liaison est invisible suite à son recouvrement par les boucles L7 et L8 (Ferguson *et al.*, 2002).

C. Changements de conformation au niveau du domaine de signalisation

Dans la structure de FpvA, le positionnement du domaine de signalisation dépend de la présence ou non de la ferri-pyoverdine dans le site de liaison du transporteur (Wirth *et al.*, 2007). En absence de la ferri-pyoverdine, le domaine de signalisation interagit avec la boîte TonB de FpvA (Brillet *et al.*, 2007), cette interaction est similaire à celle qui a été observée entre la boîte TonB de FhuA ou BtuB avec la protéine TonB. En présence de la ferri-pyoverdine, le domaine de signalisation subit des changements de conformation et n'interagit plus avec la boîte TonB. Cette dernière devient alors accessible à la protéine TonB.

II.2. Le complexe TonB-ExbB-ExbD (système Ton)

Il n'existe pas de force proton-motrice au niveau de la membrane externe, ni de nucléotides triphosphate dans le périplasma. L'énergie nécessaire au transport actif par les RTBDs est apportée par la force proton-motrice de la membrane interne et est transmise au RTBD grâce au complexe multi-protéique TonB-ExbB-ExbD. Ce complexe composé de trois protéines membranaires est situé dans la membrane interne (**figure 14**) ((Bradbeer, 1993) (Postle & Kadner, 2003)). Les gènes codant pour les protéines de ce complexe ont été initialement identifiés comme étant impliqués dans l'infection par le phage T1 (T-one) (Cascales *et al.*, 2007).

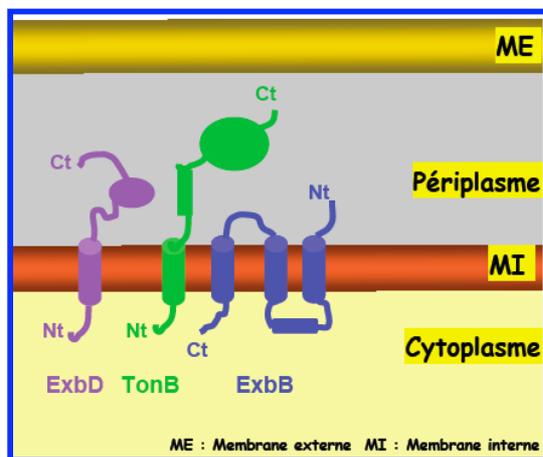


Figure 14 : Représentation schématique de la topologie transmembranaire des trois protéines du complexe TonB-ExbB-ExbD

TonB comporte un domaine transmembranaire, l'essentiel de la protéine est périplasmique.

ExbB possède 3 segments transmembranaires, par contre l'essentiel de la protéine est cytoplasmique.

ExbD présente une topologie proche de celle de TonB. A la différence de TonB et ExbB, l'extrémité C-terminale d'ExbD est périplasmique.

II.2.1. La protéine TonB d'*E. coli*

a) Topologie

TonB est une protéine intégrale de la membrane interne de 26 kDa très riche en résidus Pro (17%). La protéine TonB est constituée de 3 domaines bien distincts : le domaine N-terminal, le domaine central et le domaine C-terminal (**figure 14**) (Roof *et al.*, 1991).

Le domaine N-terminal (résidus 1-32) est formé d'une courte région cytoplasmique (résidus 1-11) et d'une hélice transmembranaire «putative» (résidus 12-33). L'hélice transmembranaire permettrait l'adressage de la protéine TonB dans la membrane interne et participerait probablement à la formation du complexe TonB-ExbB-ExbD par interaction avec les protéines ExbB et ExbD, son remplacement entraînant la perte de l'activité TonB (Jaskula *et al.*, 1994). L'His20 de l'hélice transmembranaire serait particulièrement importante, elle serait directement impliquée dans l'énergisation du RTBD. Son remplacement par une Arg abolie le transport TonB-dépendant.

L'His20 serait responsable de la réponse à la force proton-motrice de la membrane cytoplasmique par fixation d'un proton, cela peut entraîner des changements structuraux et induire ainsi le passage de la protéine TonB en une forme dite «énergisée». C'est sous cette forme, qu'elle interagit avec le RTBD. Cette interaction, permet la translocation du ligand à travers la membrane externe. Le résidu Asp25 de la protéine ExbD servirait de donneur-accepteur de protons lors du cycle d'activation et de désactivation de la protéine TonB (Braun & Braun, 2002b).

Le domaine central périplasmique (résidus 33-102) comprend une région particulièrement riche en résidus Pro (40%) appelée bras poly-Pro (résidus 66-102) correspondant à une répétition des motifs Pro-Glu et Pro-Lys. Des études de RMN suggèrent que le bras poly-Pro confère à cette partie de la protéine une structure très rigide et étendue, de plus de 100 Å (Evans *et al.*, 1986). Le bras poly-Pro jouerait un rôle de «rallonge» permettant au domaine C-terminal de la protéine TonB d'atteindre le RTBD (Larsen *et al.*, 1993). La délétion totale (Δ 33-102) ou partielle (Δ 32-65, Δ 66-100) de cette région n'affecte pas l'activité TonB, suggérant qu'elle n'est donc pas impliquée dans l'interaction entre la protéine TonB et le RTBD.

Le domaine C-terminal périplasmique (résidus 103-239) correspond au domaine permettant l'interaction entre la protéine TonB et la boîte TonB des RTBDs (Larsen *et al.*, 1996).

b) Structures du domaine C-terminal

La structure de la protéine TonB entière n'est pas résolue, en revanche les structures du domaine C-terminal entier (résidus 103-239) et de 2 fragments de ce domaine (fragments 165-239 et 150-239) ont été résolues par RMN et par cristallographie, respectivement (**figure 15**) :

Fragment 165-239 : la structure de ce fragment a été résolue par cristallographie (**figure 15A**). Il se présente sous forme d'un dimère dont chaque monomère est constitué de trois brins β et d'une hélice α . Les deux monomères interagissent *via* les trois brins formant un large feuillet β (Chang *et al.*, 2001).

Fragment 150-239 : la structure de ce fragment a été résolue par cristallographie (**figure 15B**). Elle met en évidence un dimère dont l'interface entre les monomères est peu étendue. La structure des deux monomères montre des différences notables, notamment dans les régions C-terminales qui forment l'interface des dimères observés (Koedding *et al.*, 2004).

Domaine C-terminal entier (103-239) : la structure de ce domaine a été résolue par RMN (**figure 15C**). Elle met en évidence un monomère constitué de 2 hélices α , positionnées en face d'un feuillet β formé de 4 brins β antiparallèles (Sean Peacock *et al.*, 2005). Le brin β_4 est situé dans la partie C-terminale de la protéine TonB (Pawelek *et al.*, 2006).

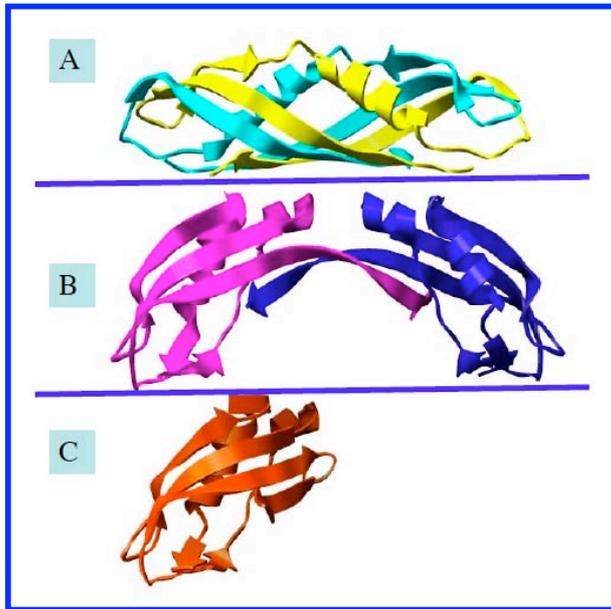


Figure 15 : Structure de fragments et du domaine C-terminal de la protéine TonB

(A) Structure cristalline en dimère du fragment 165-239. Les deux monomères entrelacés étroitement en interaction sont montrés respectivement en jaune et en cyan.

(B) Structure cristalline en dimère du fragment 150-239, un monomère est montré en violet, l'autre en bleu.

(C) Structure du domaine C-terminal (résidus 103-239) résolue par RMN.

II.2.2. Les protéines ExbB-ExbD d'*E. coli*

a) La protéine ExbB

ExbB est une protéine intégrale de la membrane interne de 26 kDa et de 241 acides aminés. Elle comporte trois segments transmembranaires (16→39, 128→155 et 162→194), une courte boucle périplasmique et une longue boucle cytoplasmique qui sépare les deux premiers segments (**figure 14**). La partie N-terminale de cette protéine est localisée dans le périplasme ((Kampfenkel & Braun, 1993) (Karlsson *et al.*, 1993b)). La structure de la protéine ExbB n'est toujours pas résolue.

b) La protéine ExbD

ExbD est une protéine intégrale de la membrane interne de 17 kDa et 141 acides aminés. Elle est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique (résidus 1-22), un segment transmembranaire (résidus 23-43) et un domaine C-terminal périplasmique (résidus 44-141) (**figure 14**) (Kampfenkel & Braun, 1992). La protéine ExbD est une composante essentielle du système TonB, elle est nécessaire au fonctionnement de la protéine TonB (Brinkman & Larsen, 2007).

Bien que le rôle exact de la protéine ExbD demeure encore inconnu, elle aurait une fonction de «chaperon» et interviendrait dans la régulation de la dynamique et de la conformation de la protéine TonB (Ghosh & Postle, 2004). Les acides aminés Asp25 (situé dans le domaine transmembranaire) et Leu132 (situé dans le domaine périplasmique) ont été identifiés comme essentiels à l'activité de la protéine ExbD (Braun *et al.*, 1996). La structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD a été résolue par RMN (**Figure 16**). Il est composé de deux hélices α localisées sur une des faces d'un feuillet β constitué de 5 brins β (Garcia-Herrero *et al.*, 2007). Le domaine C-terminal de la protéine ExbD pourrait participer à la formation du complexe TonB-ExbB-ExbD (Braun *et al.*, 1996).

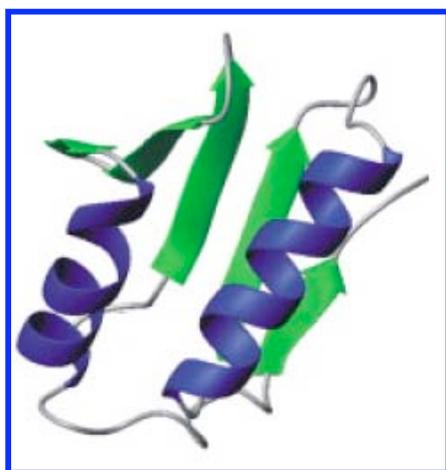


Figure 16 : Structure du domaine périplasmique de la protéine ExbD

Le domaine périplasmique de la protéine ExbD est composé de deux hélices α localisées sur une des faces d'un feuillet β composé de 5 brins β .

II.2.3. Stoechiométrie du complexe TonB-ExbB-ExbD

La protéine TonB doit sa stabilité et ses fonctions biologiques à son association avec les protéines ExbB et ExbD (Karlsson *et al.*, 1993). Chez *E. coli*, en l'absence des protéines ExbB et ExbD les bactéries deviennent résistantes aux colicines et aux bactériophages (Ahmer *et al.*, 1995), le transport TonB-dépendant est également réduit de 90%. Le transport résiduel observé serait dû à la présence au niveau de la membrane interne de deux analogues fonctionnels des protéines ExbB et ExbD : TolQ et TolR ((Braun & Hermann, 1993) (Postle & Kadner, 2003)).

L'interaction entre les protéines ExbB et TonB a été observée initialement, *in vitro*, par les expériences de pontage covalent au formaldéhyde (Skare *et al.*, 1993). Par la suite, cette interaction a été montrée par des expériences de pontage chimique *in vivo* (Higgs *et al.*, 1998). Elle implique probablement le segment transmembranaire de la protéine TonB et le premier segment transmembranaire de la protéine ExbB (Karlsson *et al.*, 1993a). L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre la protéine TonB d'*E. coli* et ayant une réaction croisée avec les protéines TonB d'autres entérobactéries, a permis d'observer des complexes

ExbB-TonB par pontage chimique chez huit entérobactéries, suggérant alors que l'organisation du système TonB est conservée chez les entérobactéries (Larsen *et al.*, 1996). Les interactions TonB-ExbD et ExbB-ExbD ont été montrées *in vitro* par les techniques de chromatographie en utilisant des protéines ExbD fusionnées avec une étiquette poly-His (6-His), ExbD-6-His est co-éluée par TonB et ExbB (Braun *et al.*, 1996).

Dans la membrane interne, les protéines TonB, ExbB et ExbD formeraient un complexe d'environ 520 kDa constitué de 2 TonB, 4 ExbB et 14 ExbD ((Postle & Kadner, 2003) (Sauter *et al.*, 2003)). Les protéines TonB, ExbB et ExbD interagissent par leurs segments transmembranaires dans le complexe multi-protéique qu'elles forment dans la membrane interne (Karlsson *et al.*, 1993a).

II.2.4. Interaction TonB-RTBD

Des expériences de pontage chimique *in vitro* ont mis en évidence des interactions entre le domaine C-terminal de la protéine TonB et les RTBDs FepA (Skare *et al.*, 1993) et BtuB (Cadieux & Kadner, 1999). Les études RMN ont montré que ce domaine peut également interagir avec le domaine bouchon de FepA (Peacock *et al.*, 2006). La délétion des 48 derniers résidus du domaine C-terminal de la protéine TonB abolie son interaction avec FepA, révélant l'implication de ces résidus dans l'interaction physique entre la protéine TonB et FepA (Larsen *et al.*, 1997). Des expériences de mutagenèse dirigée et d'introduction de résidus Cys dans la séquence de la protéine TonB et des différents RTBDs, pour l'établissement de ponts di-sulfure *in vivo*, ont montré que le résidu Glu160 de la protéine TonB d'*E. coli* ainsi que les acides aminés environnants sont impliqués directement dans l'interaction avec les RTBDs (Ogierman & Braun, 2003). Les interactions *in vitro* entre les fragments solubles de la protéine TonB d'*E. coli* et différents RTBDs ont également été étudiées. Ces études ont permis de montrer que des sites autres que la région contenant la Glu160 de TonB sont impliqués dans l'interaction avec les RTBDs (Khursigara *et al.*, 2005).

Les fragments 33→239 et 147→239 de la protéine TonB ont été cristallisés en complexe avec FhuA (Pawelek *et al.*, 2006) et BtuB (Shultis *et al.*, 2006), respectivement. Les résultats obtenus montrent que la protéine TonB occupe environ la moitié de la surface du RTBD exposée au périplasma. Dans les deux cas, la protéine TonB interagit physiquement avec la boîte TonB du RTBD par l'intermédiaire du brin β_3 du domaine C-terminal. Lors de l'interaction, un feuillet inter-protéique mixte de 4 brins β se forme entre 3 brins β de la protéine TonB (β_1 -3 du domaine C-terminal) et un brin β de la boîte TonB du RTBD suite au dépliement local du bouchon.

II.2.5. Transduction d'énergie par le complexe TonB-ExbB-ExbD

Lors du transport des ferri-sidérophores, le complexe multi-protéique TonB-ExbB-ExbD exploite la force proton-motrice de la membrane cytoplasmique pour énergiser le RTBD. La fixation du ferri-sidérophore au niveau du site de liaison localisé dans la face extracellulaire du RTBD induit des changements de conformation au niveau des boucles extracellulaires qui se propagent tout au long du bouchon jusqu'à la boîte TonB, signalant ainsi l'occupation du récepteur au complexe TonB-ExbB-ExbD, et facilitant l'interaction entre la protéine TonB et le RTBD. Le mécanisme par lequel la force proton-motrice active le RTBD n'est pas encore élucidé, c'est le sujet de nombreuses spéculations et controverses. Deux modèles sont proposés : le modèle **navette** ((Letain & Postle, 1997) (Postle & Kadner, 2003)) et le modèle impliquant une **rotation** (Chang *et al.*, 2001). De façon intéressante, ces deux modèles sont en faveur de l'utilisation du gradient électrochimique au niveau de la membrane interne par les protéines ExbB et ExbD pour fournir un potentiel énergétique provoquant un changement conformationnel de la protéine TonB.

II.2.5.1. Le modèle navette

Le modèle navette est un modèle dynamique basé essentiellement sur les résultats des études biochimiques qui ont montré la présence de la protéine TonB dans des fractions de la membrane externe (Postle & Kadner, 2003). Selon ce modèle, la protéine TonB adopte de façon cyclique trois conformations différentes : la conformation non chargée, la conformation chargée et la conformation déchargée (**figure 17**). En conformation initiale **non chargée**, la protéine TonB est non énergisée. Elle est localisée dans la membrane interne au sein du complexe multi-protéique TonB-ExbB-ExbD. La force proton-motrice est utilisée pour l'énergiser et la faire passer en conformation **chargée**, cette étape implique les acides aminés du domaine N-terminal de la protéine TonB et les protéines ExbB-ExbD. Le segment transmembranaire de la protéine TonB est alors relargué du complexe TonB-ExbB-ExbD, produisant ainsi une protéine TonB libre qui traverse «physiquement» le périplasme. La partie C-terminale de la protéine TonB interagit avec le RTBD qui subit un changement de conformation facilitant ainsi la translocation du ligand. Lors de l'interaction entre la protéine TonB et le RTBD, l'énergie stockée par la protéine TonB sous forme d'une force mécanique est relarguée, permettant le passage de la protéine TonB en conformation **déchargée**. Enfin, la protéine TonB retourne dans la membrane interne pour finir le cycle ((Postle & Kadner, 2003) (Postle & Larsen, 2007)). C'est justement, cette dernière étape qui constitue l'objection majeure au modèle navette.

En effet, la réinsertion du segment transmembranaire de la protéine TonB dans la membrane interne est une étape thermodynamiquement défavorable. Il est donc possible que la protéine TonB ne se réinsère pas dans la bicouche lipidique, et que seules les interactions avec ExbB et ExbD subsistent *in vivo*.

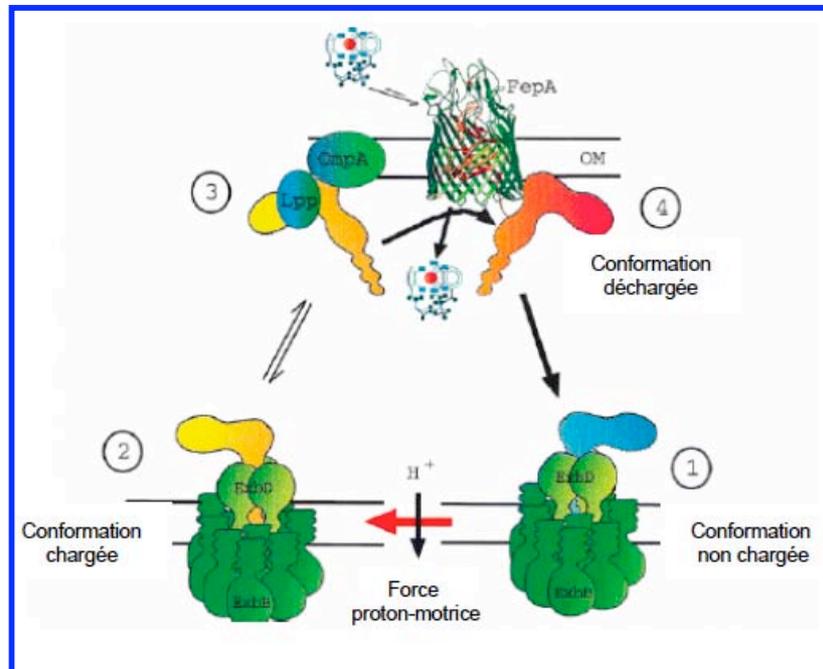


Figure 17 : Transduction d'énergie entre la protéine TonB et le RTBD FepA selon le modèle navette (Postle & Kadner, 2003)

1. TonB est sous une conformation non chargée non énergisée.
2. TonB se trouve sous une conformation chargée énergisée.
3. TonB fait la navette dans le périplasma pour interagir avec FepA.
4. TonB énergise FepA et retourne à la membrane cytoplasmique pour finir son cycle.

II.2.5.2. Le modèle impliquant une rotation

Le modèle impliquant une rotation est fondé sur les résultats des études cristallographiques du domaine C-terminal de la protéine TonB, décrivant deux monomères de la protéine TonB, assemblés en dimère dans leurs extrémités C-terminales (Chang *et al.*, 2001) et aussi sur les alignements de séquences qui montrent une homologie entre les protéines ExbB et ExbD et les protéines MotA et MotB impliquées dans le mouvement des flagelles bactériens (Cascales *et al.*, 2001). Dans ce modèle, la protéine TonB reste associée à la membrane interne au sein du complexe TonB-ExbB-ExbD et seul le domaine C-terminal de la protéine traverse physiquement le périplasma grâce à son bras poly-Pro pour interagir avec le récepteur au niveau de la membrane externe et lui transmettre l'énergie nécessaire au transport actif du ferri-sidérophore (**figure 18**).

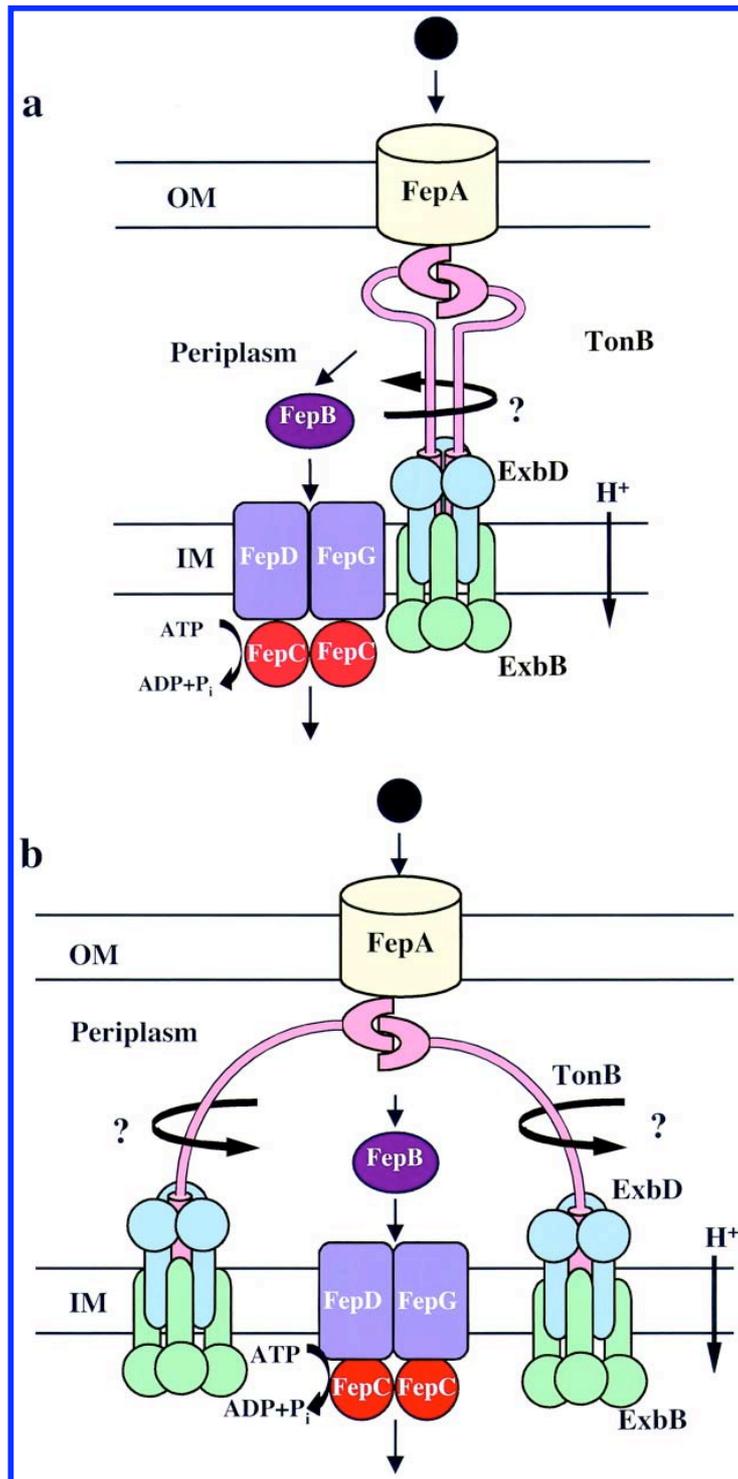


Figure 18 : Transduction d'énergie entre la protéine TonB et le RTBD FepA selon le modèle rotation (Chang *et al.*, 2001)

La partie C-terminale de la protéine TonB subit, grâce à la force proton-motrice, un mouvement de rotation initié par les protéines ExbB et ExbD. TonB interagit avec le récepteur au niveau de la membrane externe et lui transmet l'énergie nécessaire au transport. Son domaine N-terminal reste associé à la membrane interne au sein du complexe TonB-ExbB-ExbD. Ce modèle tient compte des données cristallographiques indiquant une dimérisation de la protéine TonB. Les deux molécules de TonB qui interviennent dans le processus peuvent provenir d'un même complexe (a) ExbBD-TonB ou de deux complexes différents (b).

II.3. Transport à travers la membrane externe

Le transport des ferri-sidérophores à travers la membrane externe implique la présence ou la formation d'un canal, sachant que dans les structures des RTBDs aucun pore, ni canal ne sont observés. Un mécanisme général de transport à travers les RTBDs comprenant 4 étapes est proposé, d'après les connaissances actuelles, et résumé dans la **figure 19A**.

Étape 1- Le mouvement des boucles extracellulaires rend le site de liaison sur le RTBD accessible et prêt à accueillir le ferri-sidérophore (*cf. figure 13*).

Étape 2- L'adsorption par des résidus des boucles extracellulaires du ferri-sidérophore à la surface du RTBD est suivie de sa liaison au site de liaison spécifique avec une affinité de l'ordre du nano molaire.

Étape 3- Les boucles extracellulaires subissent des changements de conformation importants et se referment sur le ferri-sidérophore pour le piéger dans son site de liaison et l'isoler du milieu extracellulaire (Yue *et al.*, 2003). Le domaine N-terminal du bouchon subit un changement de conformation permettant l'interaction avec la protéine TonB.

Étape 4- Après l'interaction physique entre la boîte TonB du RTBD et la partie C-terminale de la protéine TonB, le ferri-sidérophore translate à travers le RTBD.

Le mécanisme de translocation du ferri-sidérophore à travers le RTBD n'est pas encore élucidé, mais dans tous les cas, un canal d'au moins 10 Å de diamètre doit être formé pour permettre le passage du ferri-sidérophore. Le récepteur subirait vraisemblablement un réarrangement structural important, grâce à la force mécanique exercée par la protéine TonB (Ferguson & Deisenhofer, 2004). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme de translocation des ferri-sidérophores à travers les RTBDs :

- Le bouchon serait tiré, par la protéine TonB, hors du tonneau β et se retrouverait dans le périplasma, permettant ainsi la formation d'un canal ayant les dimensions du tonneau β (Usher *et al.*, 2001).
- Le bouchon resterait dans le tonneau β où il subirait des changements de conformation importants permettant ainsi l'agrandissement du diamètre du tonneau β et la formation d'un canal à l'interface tonneau β - bouchon ((Braun & Braun, 2002a) (Ma *et al.*, 2006)).

Il est intéressant de remarquer, que la présence d'un grand nombre de molécules d'eau autour du bouchon, à l'interface avec le tonneau β , pourrait diminuer le coût énergétique lié à la rupture des liaisons hydrogène et favoriser la sortie du bouchon ou sa dissociation du tonneau β lors d'un changement de conformation (Faraldo-Gomez *et al.*, 2003).

Des expériences de dynamique moléculaire ont suggéré qu'en exerçant une force mécanique sur le transporteur, la protéine TonB pouvait induire d'importants changements de conformation au niveau du domaine bouchon pouvant aller jusqu'au déroulement presque total de ce domaine (Gumbart *et al.*, 2007). Malheureusement, pour l'instant aucune donnée expérimentale ne permet vraiment de conclure au sujet du mécanisme impliqué.

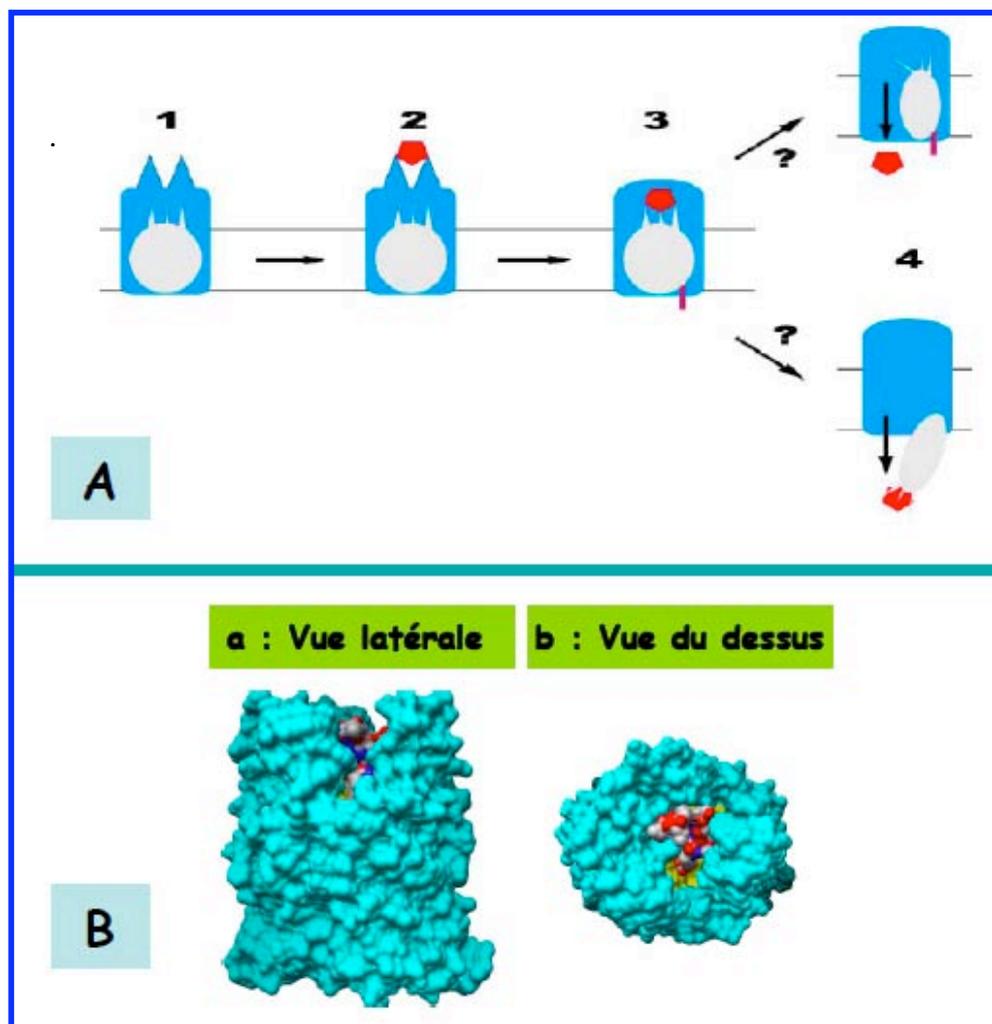


Figure 19A : Mécanisme en 4 étapes d'import des ferri-sidérophores à travers les RTBDs (Ferguson & Deisenhofer, 2004)

Étape 1 : le site de fixation du ferri-sidérophore est accessible au solvant.

Étape 2 : le ferri-sidérophore se fixe avec une forte affinité.

Étape 3 : mouvement des boucles et fermeture du site de fixation. Des changements de conformation surviennent au niveau de la boîte TonB.

Étape 4 : le domaine C-terminal de la protéine TonB et la boîte TonB du RTBD interagissent, le RTBD est énergisé ce qui induit la translocation du ferri-sidérophore. Cela entraînerait soit l'éjection totale ou partielle du bouchon dans le périplasma, soit un réarrangement important du bouchon à l'intérieur du tonneau.

Figure 19 B : Structure de FpvA-Pvd de *P. aeruginosa*

Cette figure montre l'absence d'espace à l'interface entre le bouchon et le tonneau.

II.4. Transport à travers la membrane interne

Chez *E. coli*, une fois internalisé dans le périplasma, le ferri-sidérophore traverse la membrane interne par l'intermédiaire d'un transporteur ABC (pour *ATP Binding Cassette*) (Hollenstein *et al.*, 2007). Ce dernier, assure la translocation du ferri-sidérophore et son import, contre son gradient de concentration, dans le périplasma en couplage direct avec une réaction chimique exergonique (hydrolyse de l'ATP) (Koster, 2001). Mais ceci n'est pas une généralité. De plus en plus de données montrent que le transport des ferri-sidérophores à travers la membrane interne peut également impliquer des perméases. Ceci est le cas, pour le transport de la **ferri-pyochéline** (chez *P. aeruginosa*), de la **ferri-rhizobactine 1021** (chez *Sinorhizobium meliloti* : bactérie du sol en symbiose avec les plantes de la famille des légumineuses, capable d'assimiler l'azote de l'air) qui implique des perméases appartenant à la superfamille des MFS (pour *Major Facilitator Superfamily*) et aussi du **ferrichrome** (chez *P. aeruginosa*). Le transport semble impliquer des perméases dépendantes de la force proton-motrice : FptX pour la voie pyochéline, RthX pour la voie rhizobactine (Cuiv *et al.*, 2004), FiuB (Cuiv *et al.*, 2007) et FoxB (Hannauer *et al.*, 2010) pour la voie ferrichrome. La deletion de FoxB n'abolit pas le transport du fer *via* le ferrichrome, suggérant une redondance au niveau de ce transporteur de la membrane interne.

Les transporteurs ABC sont des protéines membranaires intégrales et ubiquitaires présentant une remarquable conservation de séquence et d'organisation structurale chez les bactéries. Ils comprennent une **protéine périplasmique affine** appelée PBP (pour *Periplasmic Binding Protein*) ou SBP (pour *Solute Binding Protein*), **une perméase** constituée de deux domaines transmembranaires (*Transmembrane Domains* : TDMs- domaines β) à 12 hélices α et **une ATPase** cytoplasmique constituée de deux domaines très conservés qui lient et hydrolysent l'ATP (modules ABC- domaines α) (**figure 20**) (Koster, 2001).

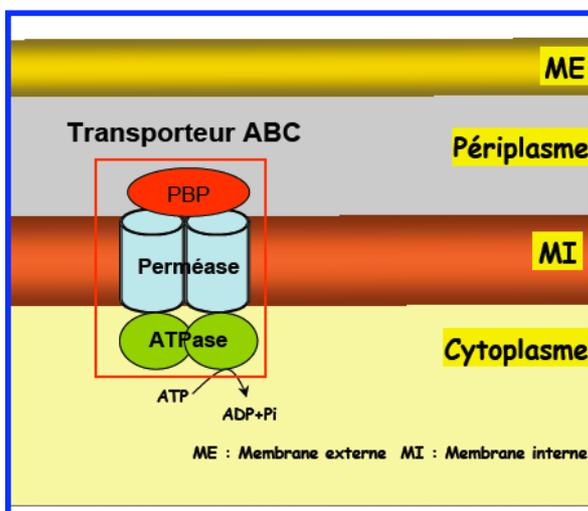


Figure 20 : Représentation schématique du transporteur ABC

Le transporteur ABC est constitué de quatre domaines : deux domaines transmembranaires formant la perméase, et deux domaines cytoplasmiques très conservés qui lient et hydrolysent l'ATP, procurant ainsi l'énergie nécessaire au passage du ligand à travers la perméase. Les systèmes d'import bactériens possèdent une protéine périplasmique «PBP» qui va livrer le substrat au transporteur.

Dans la plupart des cas, les deux domaines transmembranaires sont codés par deux gènes homologues, tandis que les modules ABC sont codés par un seul gène, on parle alors d'une structure $\alpha_2\beta\beta'$. Les gènes codant pour les différentes composantes du transporteur ABC sont organisés en opéron avec le gène qui code pour le RTBD. Les études cristallographiques ont montré que la formation du dimère de modules ABC requiert la fixation de 2 molécules d'ATP ((Ferguson & Deisenhofer, 2004) (Locher, 2009)). Contrairement au RTBD qui est spécifique d'un sidérophore donné, la PBP est le plus souvent spécifique d'un type de sidérophores, assurant de ce fait l'uni-directionnalité du transport en retenant le ferri-sidérophore dans le périplasma. La **figure 21** illustre les systèmes de transport des différents ferri-sidérophores chez *E. coli*. Il n'a pas été déterminé si la PBP récupère le ferri-sidérophore directement du RTBD, ou si elle le récupère dans le périplasma. La structure cristallographique de plusieurs PBPs a été résolue. Malgré une faible identité de séquence (environ 10%), les PBPs partagent des homologies structurales et fonctionnelles très importantes. Elles ont toutes une structure en forme d'haricot avec deux domaines globulaires (bi-lobes) reliés par une courte chaîne polypeptidique qui permet le mouvement des deux lobes par un mécanisme de charnière. Chaque lobe est constitué d'une feuille β central, entouré par plusieurs hélices α (**figure 22**) (Borths *et al.*, 2002).

Les structures des perméases et des ATPases des modules ABC impliquées dans le transport du ferri-sidérophore n'ont pas été résolues. Seule la structure du transporteur ABC impliqué dans le transport de la vitamine B12 chez *E. coli* est résolue et un mécanisme de transport est proposé. La vitamine B12 est d'abord transportée à travers la membrane externe *via* le RTBD BtuB. Dans le périplasma, elle est prise en charge par la PBP BtuE. Elle est internalisée dans le cytoplasme par la perméase BtuC grâce à l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase BtuD (**figure 21**). Au niveau de la membrane interne, BtuC et BtuD sont rassemblées pour former un hétéro-tétramère fonctionnel (BtuC₂D₂) (**figure 21**) (Locher *et al.*, 2002). La liaison de la vitamine B12, portée par la PBP BtuF, aux sous-unités BtuC déclencherait l'hydrolyse de deux molécules d'ATP au niveau des sous-unités BtuD, qui changeraient de conformation. Ce changement de conformation serait ensuite transmis à travers l'interface BtuC-BtuD, permettant l'ouverture de la voie de translocation de la vitamine B12 ((Borths *et al.*, 2002) (Hvorup *et al.*, 2007)). Malgré la résolution de cette structure, le mécanisme de transport des ferri-sidérophores ou du fer à travers la membrane interne reste complètement méconnu.

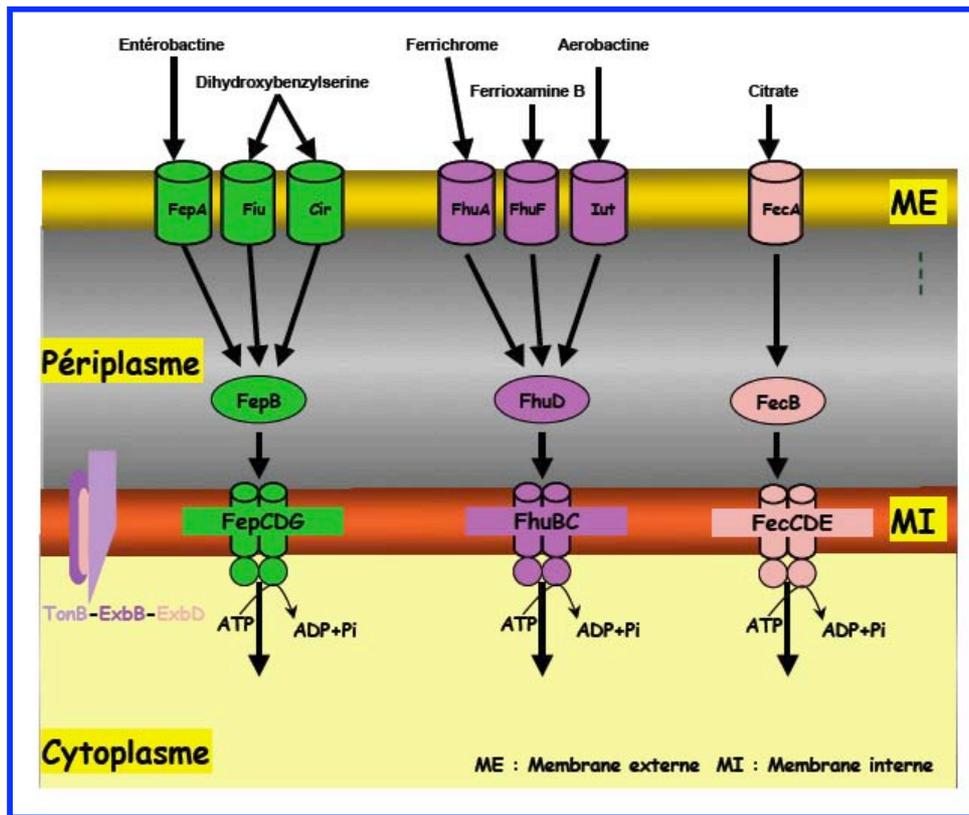


Figure 21 : Les systèmes d'acquisition du fer chez *E. coli*

Au niveau de la membrane externe, les RTBDs sont spécifiques d'un ferri-sidérophore donné. En revanche, les transporteurs ABC, responsables du passage de la membrane interne, et notamment les protéines périplasmiques affines de ces systèmes, peuvent transporter plusieurs types de complexes fer-sidérophore.

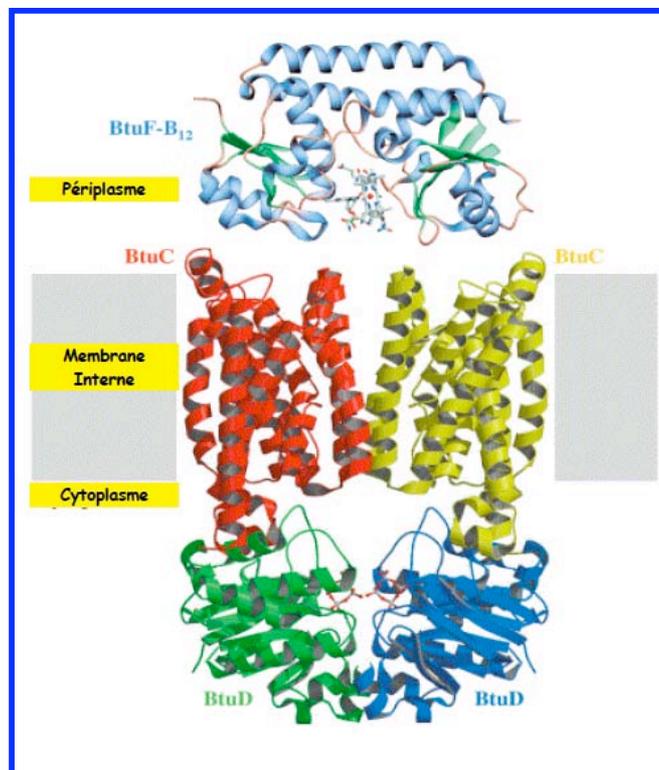


Figure 22 : Structure cristallographique du transporteur ABC de la vitamine B12 en complexe avec BtuF-vit B12 (Locher, 2009)

II.5. Dissociation des complexes ferri-sidérophores

Une fois internalisés, les ferri-sidérophores doivent être dissociés pour la libération du fer complexé et son utilisation dans le métabolisme cellulaire. La dissociation peut se dérouler dans le cytoplasme (cas d'*E. coli* (Koster, 2001)) ou dans le périplasme (cas de *P. aeruginosa* (Greenwald *et al.*, 2007)). Le mécanisme de dissociation n'est pas clairement compris, il varie selon les micro-organismes et les sidérophores considérés. D'une manière générale, elle impliquerait un des deux processus suivants :

Dissociation du ferri-sidérophore par hydrolyse totale ou partielle du sidérophore, comme dans le cas de la ferri-entérobactine chez *E. coli* où le triester cyclique est hydrolysé par une estérase Fes (pour *Ferri Enterobactin Esterase*) codée par le gène *fes* (Langman *et al.*, 1972). Une enzyme similaire à Fes d'*E. coli* est impliquée dans l'hydrolyse de la chysobactine chez *Erwinia chrysanthemi* (Rauscher *et al.*, 2002).

Dissociation spontanée du ferri-sidérophore par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} ayant une faible affinité pour les sidérophores (Fontecave *et al.*, 1994), comme dans le cas de la ferrioxamine B chez *E. coli* (Matzanke *et al.*, 2004). Le Fe^{2+} est rapidement fixé par un ligand qui a une plus grande affinité pour le Fe^{2+} que celle des sidérophores (Mies *et al.*, 2006). Comme les ferri-sidérophores sont très stables à pH neutre, l'implication d'enzymes dans le processus de réduction a été proposée (Fontecave *et al.*, 1994). Cependant, il a été montré que la réduction des ferri-sidérophores était possible *in vitro* par un simple processus chimique sans intervention d'enzymes (Coves *et al.*, 1993).

II.6. Régulation génétique de l'acquisition du fer

II.6.1. Régulation par la protéine Fur

Le contrôle de l'homéostasie du fer et-ou la résistance au stress oxydant est vitale pour les bactéries à Gram-négatif. Il est assuré par des protéines régulatrices bien déterminées appartenant à la large famille des protéines métallo-régulatrices de type FUR (pour *Ferric Uptake Regulator*). L'homéostasie du fer se traduit par une régulation fine des systèmes d'acquisition, d'utilisation et de stockage.

Chez *E. coli*, le gène *fur* code pour une protéine de 17 kDa contenant 148 acides aminés (147 acides aminés dans la protéine mature). Cette protéine est composée de deux domaines fonctionnels : **un domaine de liaison à l'ADN** (domaine N-terminal) contenant un motif de type hélice-coude-hélice ailé et **un domaine de dimérisation** (domaine C-terminal).

Le domaine de dimérisation contient de nombreux acides aminés constituant des ligands potentiels des ions métalliques (Tyr, Asp, Glu, Asn, Arg, Cys, His) (Bagg & Neilands, 1987). La protéine Fur possède un site structural par monomère pour le zinc, qui est essentiel pour l'activité de la protéine (Jacquamet *et al.*, 1998). Les expériences effectuées *in vitro* (Adrait *et al.*, 1999) et *in vivo* indiquent que la forme normalement active de la protéine Fur est une forme oligomère au moins dimérique. La protéine Fur agit comme régulateur transcriptionnel utilisant le Fe²⁺ comme co-répresseur. Chez *E. coli*, elle contrôle l'expression de plus de 100 gènes : environ 60 d'entre eux codent pour des protéines permettant l'acquisition du fer comme la machinerie de synthèse et de transport des sidérophores, les autres pour des protéines impliquées dans le métabolisme ou encore dans la réponse au stress oxydant.

Lorsque le niveau de Fe²⁺ **atteint une certaine concentration (excès de fer)** dans le cytoplasme de la bactérie, la protéine Fur s'associe aux ions Fe²⁺ avec une affinité de l'ordre de 10 µM, ce qui induit un changement de conformation de la protéine et sa dimérisation. Le dimère se fixe avec une forte affinité aux promoteurs des gènes qui régulent le statut cellulaire du fer et réprime leur expression. La liaison à l'ADN se fait au niveau d'un motif nucléotidique très conservé appelé **boîte Fur** (Bagg & Neilands, 1987). La **boîte Fur** correspond à un motif palindromique de 19 paires de bases conservé chez les différentes espèces (**GATAATGAT(A/T)ATCATTATC** chez *E. coli*) localisé entre les sites **-35** et **-10** des promoteurs des gènes impliqués dans l'acquisition, le stockage et l'utilisation du fer ((Baichoo & Helmann, 2002) (Andrews *et al.*, 2003)). Il a été suggéré que deux dimères de la protéine Fur se lient à la double hélice d'ADN, soit un dimère sur la boîte Fur de chaque hélice (Lavrrar *et al.*, 2002). Dans les **conditions de carence en fer**, la protéine Fur est sous sa forme monomérique inactive et reste libre dans le cytoplasme, l'opérateur est donc accessible à l'ARN polymérase, ce qui permet la transcription et l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer (**figure 23**). De nombreux homologues du gène *fur* ont été identifiés chez plusieurs bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif dont plusieurs pathogènes humains, ces homologues sont capables de compléter une souche d'*E. coli* déficiente en protéine Fur. Cela suggère un mécanisme d'action semblable chez différents micro-organismes (Olczak *et al.*, 2005). En plus de la régulation de l'homéostasie du fer, il a été démontré que la protéine Fur régule l'expression des gènes ayant des fonctions cellulaires vitales et aussi variées comme la respiration, la glycolyse, le chimiotactisme, la virulence et la réponse au stress oxydatif. La protéine Fur est ainsi considérée comme un **régulateur global** qui coordonne différentes réponses dans la cellule (McHugh *et al.*, 2003b).

II.6.2. Régulation par les facteurs ECF

En plus du système général de régulation de l'homéostasie du fer par la protéine Fur, les RTBDs de certaines bactéries possèdent un système d'activation de la synthèse des protéines nécessaires à l'acquisition du fer. Ce système a été décrit en détail pour les transporteurs du dicitrate ferrique (FecA) d'*E. coli* et de la ferri-pyoverdine (FpvA) de *P. aeruginosa*. Ce mécanisme de régulation dit « cascade de signalisation », fait intervenir des facteurs appartenant à la famille des facteurs σ ECF (pour *Extra Cytoplasmic Function*).

Dans le système FecA, l'opéron *fecABCDE* qui code pour le système d'internalisation du dicitrate ferrique possède une expression constitutive. En milieu carencé en fer et en présence du dicitrate ferrique, le RTBD FecA interagit dans le périplasma, par son domaine de signalisation, avec la partie C-terminale de la protéine FecR de la membrane interne : un facteur anti- σ qui possède un domaine périplasmique C-terminal, un domaine transmembranaire ancré dans la membrane cytoplasmique et un domaine cytoplasmique N-terminal. Une fois activé, le facteur anti- σ FecR interagit par son domaine cytoplasmique avec la protéine FecI, un facteur σ spécifique, qui va activer l'expression des gènes de l'opéron *fecABCDE* codant pour des protéines nécessaires à l'acquisition du fer *via* le RTBD FecA.

Dans le cas de FpvA, la liaison de la ferri-pyoverdine au récepteur génère un signal qui se transmet par le facteur anti- σ FpvR, vers deux facteurs σ cytoplasmiques, FpvI et PvdS. FpvI se lie à l'ARN polymérase pour initier la transcription du gène *fpvA*. PvdS initie la transcription des gènes intervenant dans la production de la Pvd et de certains facteurs de virulence comme l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL ((Schalk *et al.*, 2004) (Visca *et al.*, 2004)). Cette cascade de signalisation est TonB-dépendante (Shirley & Lamont, 2009), par contre aucune interaction entre la protéine TonB et les autres éléments du système de régulation ne sont pas encore mises en évidence.

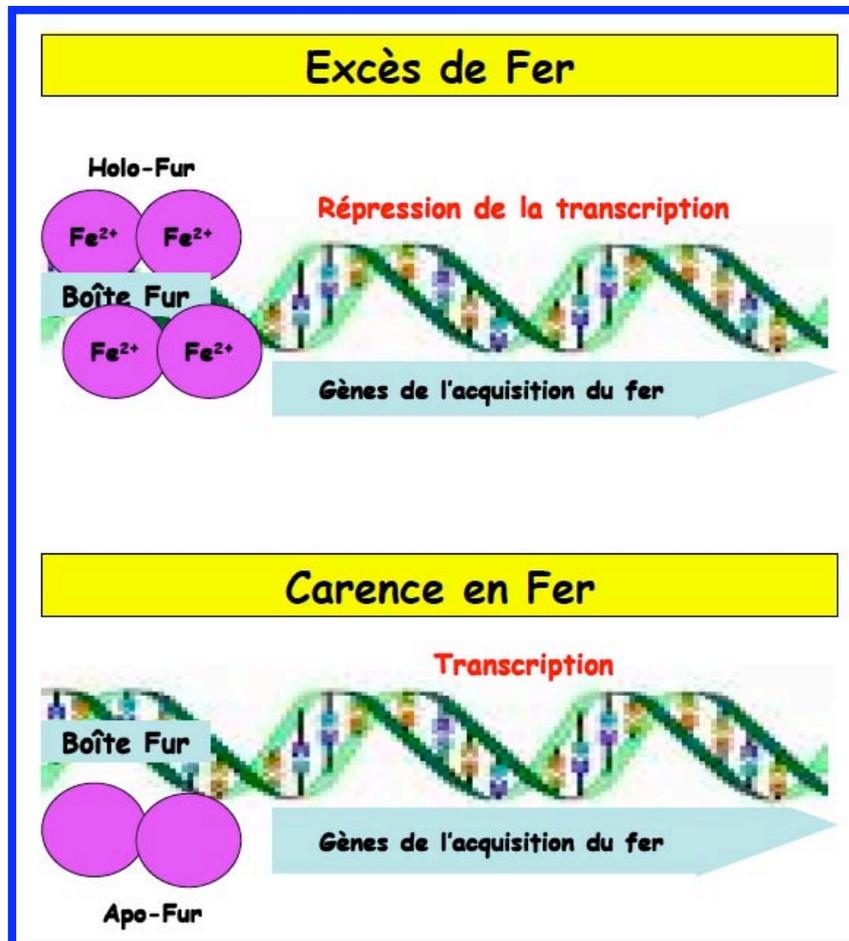


Figure 23 : Représentation schématique du mécanisme de régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par la protéine Fur

Lorsque la bactérie est en présence d'une quantité suffisante de fer, la protéine Fur est active. Elle réprime l'expression des gènes qui codent pour les protéines du système d'acquisition du fer.

À l'inverse, dans les conditions de carence en fer, la protéine Fur est inactive. Les gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer sont ainsi transcrits.

CHAPITRE III

Acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif

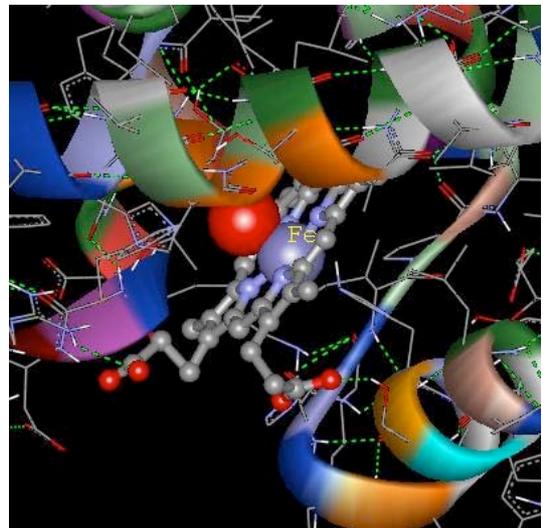
III.1. Systèmes d'acquisition de l'hème

III.2. Acquisition directe de l'hème

III.2.1. Transport de l'hème à travers la membrane externe

III.2.2. Interaction RTBD-hème

III.2.3. Devenir de l'hème



Dans ce chapitre, nous décrivons brièvement le système l'acquisition du fer par l'hème chez les bactéries à Gram-négatif.

L'hème constitue probablement le cofacteur enzymatique le plus utilisé et le plus répandu dans la nature. Il intervient dans les processus impliquant le transport d'électrons ainsi que dans diverses réactions enzymatiques du métabolisme général dont celles permettant d'éviter des dommages oxydatifs ((Wandersman & Delepelaire, 2004) (Zamocky *et al.*, 2008)). Chez l'hôte mammifère, restreindre l'accès au fer est une stratégie commune visant à limiter la croissance des pathogènes lors d'une infection bactérienne (Rouault, 2004). Plus de 99% du fer dans le corps humain se retrouve dans les cellules et est indisponible lors du processus infectieux (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002). Environ 75% du pool intracellulaire du fer est sous forme héminique, principalement dans l'hémoglobine. Des pathogènes humains comme *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae* et *S. dysenteriae* ont des gènes codant pour des RTBDs qui transportent l'hème à travers la membrane externe permettant ainsi la croissance des bactéries en utilisant l'hème comme source de fer (Murphy *et al.*, 2002). Ces RTBDs lient l'hème et-ou les hémoprotéines et transportent l'hème à travers la membrane externe. Une fois internalisé, l'hème peut être stocké, dégradé (pour servir comme source de fer et- ou de protoporphyrine) ou utilisé directement dans une large variété de processus biologiques dont la plupart sont essentiels à la survie et la croissance bactérienne mais aussi à la colonisation de l'hôte (groupement prosthétique pour les protéines bactériennes) ((Mills & Payne, 1995) (McHugh *et al.*, 2003a)). La structure du premier RTBD impliqué dans le transport de l'hème (récepteur de l'hémophore, HasA, HasR de *Serratia marcescens*) a été résolue récemment (Krieg *et al.*, 2009).

III.1. Systèmes d'acquisition de l'hème

L'hème, molécule hydrophobe de 614 Da, a tendance à s'agréger et à se dimériser à pH physiologique. *In vitro*, l'hème peut diffuser passivement à travers les bicouches lipidiques. L'hème est, par contre, trop large pour pouvoir passer librement à travers les porines bactériennes. Son internalisation nécessite des systèmes de transport spécifiques pour traverser l'enveloppe bactérienne et atteindre le cytoplasme des bactéries. Les trois principaux systèmes d'acquisition de l'hème identifiés et décrits chez les bactéries à Gram-négatif sont résumés dans la **figure 24**.

Le premier (figure 24A), et le mieux caractérisé, est celui impliquant la fixation directe de l'hème libre ou des hémoprotéines sur des RTBDs spécifiques au niveau de la

membrane externe. Ensuite, l'hème est transporté dans le périplasma par le RTBD. Le transport de l'hème dans le cytoplasme se fait par l'intermédiaire d'un transporteur ABC. Les mieux étudiés dans cette catégorie sont les systèmes *hemRSTUV* de *Yersinia enterocolitica* (Stojiljkovic & Hantke, 1992), *hmuRSTUV* de *Yersinia pestis* (Hornung *et al.*, 1996), *shuASTUV* de *S. dysenteriae* (Eakanunkul *et al.*, 2005) et le système *phuRSTUVW* de *P. aeruginosa* (Lansky *et al.*, 2006).

Le **second** système d'acquisition de l'hème implique des hémophores, un RTBD, une protéine périplasmique et un transporteur ABC (**figure 24B**). Le mieux connu est le système *hasRADEB* de *Serratia marcescens* (Cescau *et al.*, 2007). L'hémophore sécrété a pour fonctions de chélater l'hème libre ou l'extraire des hémoprotéines et le livrer aux RTBDs.

Le système bipartite de l'hémoglobine HpuAB, chez *Neisseria meningitidis*, est considéré comme un **troisième** système d'acquisition de l'hème (Vanderpool & Armstrong, 2001). Ce système comprend, en plus de la protéine périplasmique et du transporteur ABC, deux protéines de la membrane externe : un RTBD (HpuB) et une lipoprotéine membranaire (HpuA) (**figure 24C**).

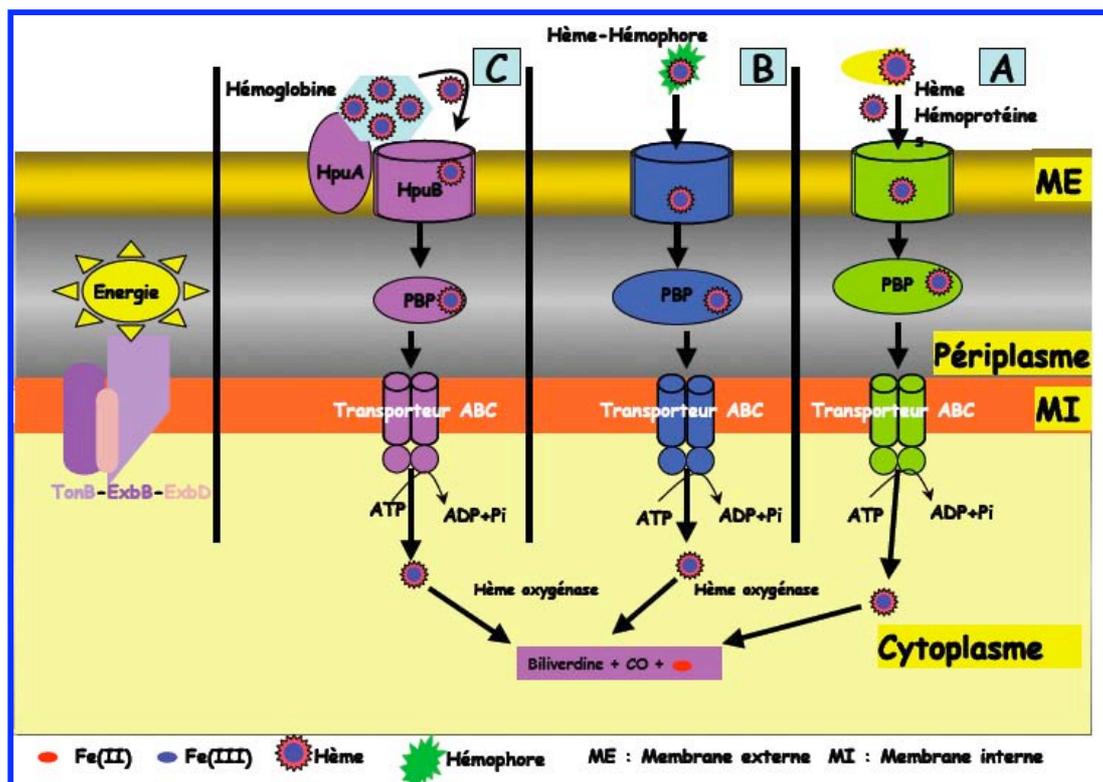


Figure 24 : Systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram-négatif

Les bactéries peuvent utiliser directement l'hème libre ou lié aux hémoprotéines comme source de fer (A). Elles peuvent aussi synthétiser et excréter dans le milieu extracellulaire des petites molécules peptidiques, les hémophores (B) qui vont chélater l'hème libre ou l'extraire des hémoprotéines et le livrer aux RTBDs. Dans le cas de *Neisseria meningitidis*, le transport de l'hème de l'hémoglobine est effectué par un système bipartite comprenant un RTBD et une lipoprotéine de la membrane externe (C). Dans tous les cas, l'hémophore et les hémoprotéines sont déchargées de leur hème au niveau de la membrane externe, seul l'hème est transporté *via* les RTBDs.

III.2. Acquisition directe de l'hème

Le système d'acquisition directe de l'hème, très similaire chez les bactéries à Gram-négatif, est en général constitué de protéines codées par un groupe de gènes régulés négativement par la protéine Fur (**figure 25A**, opéron hème de *S. dysenteriae*).

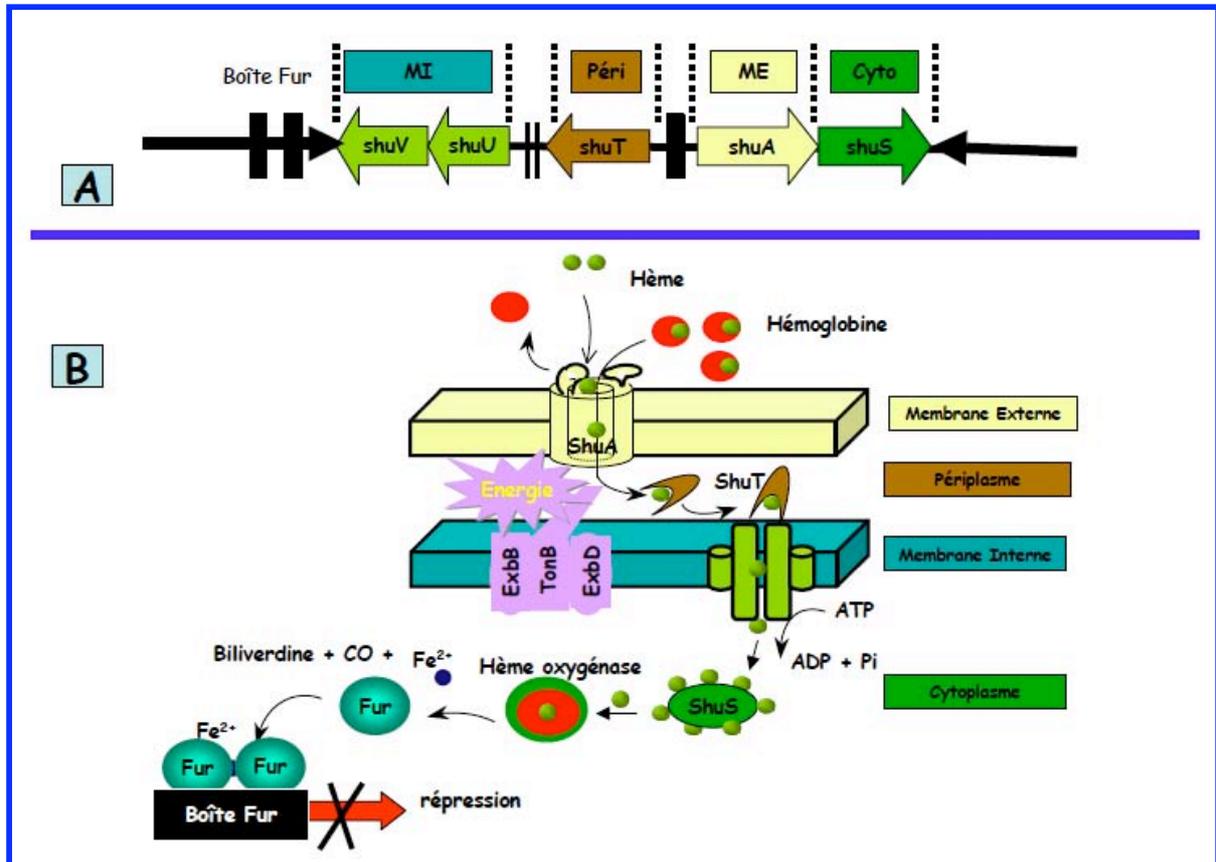


Figure 25 : Représentation schématique de l'opéron (A) et du système d'acquisition (B) de l'hème « Shu » de *Shigella dysenteriae*

Chez *S. dysenteriae*, l'hème et l'hémoglobine sont reconnus spécifiquement par le RTBD ShuA à la surface cellulaire. Suite à cette reconnaissance spécifique, l'hème est extrait de l'hémoglobine par des mécanismes non définis et transporté activement de manière TonB-dépendante à travers la membrane externe dans le périplasma. Par la suite, une protéine affine (ShuT) transmet l'hème au transporteur ABC (ShuUV) qui l'internalise dans le cytoplasme des cellules. L'hème est rapidement incorporé dans une protéine (ShuS) qui le stocke et facilite sa dégradation par l'hème oxygénase. Ce système est régulé par la protéine Fur.

Dans le cas de *S. dysenteriae* (**figures 25A & B**), ce système comporte :

- Un RTBD (ShuA) qui lie l'hème ou l'hémoglobine et transporte activement l'hème au travers de la membrane externe (Mills & Payne, 1997). Ce RTBD a fait l'objet d'une partie des travaux réalisés lors de cette thèse.
- Une protéine périplasmique (ShuT) qui prend en charge l'hème internalisé dans le périplasma par ShuA (Wyckoff *et al.*, 1998).
- Un transporteur ABC (ShuUV) qui transporte l'hème à travers la membrane interne (Wyckoff *et al.*, 1998).

- Et une protéine cytoplasmique (ShuS) qui peut séquestrer l'hème et protéger la cellule contre les effets toxiques de l'hème libre (Wilks, 2001).

Dans le cytoplasme, l'hème est transféré à l'hème oxygénase qui, en ouvrant l'anneau porphyrine, produit la biliverdine, le monoxyde de carbone et le Fe^{2+} (Wyckoff *et al.*, 1998). L'énergie nécessaire au transport actif de l'hème à travers la membrane externe, par ShuA, est fournie par le complexe multi-protéique TonB-ExbB-ExbD (Postle & Larsen, 2004). Ces protéines ne sont pas codées par des gènes de l'opéron hème (Mills & Payne, 1995).

III.2.1. Transport de l'hème à travers la membrane externe

Chez les bactéries à Gram-négatif, les RTBDs peuvent transporter de manière TonB-dépendante l'hème libre ou séquestré des différentes hémoprotéines de l'hôte et l'internaliser dans le périplasmique. Les RTBDs identifiés à ce jour comprennent les récepteurs de l'hème, de l'hémopexine, de l'hémoglobine et de l'hémoglobine-haptoglobine (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). Contrairement aux récepteurs de sidérophores, les récepteurs de l'hème ont une forte identité de séquences (90% dans certains cas) (Stojiljkovic & Perkins-Balding, 2002). Par contre, leur poids moléculaire est très variable, entre 70 kDa chez les entérobactéries et 120 kDa pour les "Méga" récepteurs de *Haemophilus* spp. Selon la nature du ligand qu'ils lient, les récepteurs de l'hème sont subdivisés en trois groupes : le premier groupe reconnaît et lie directement l'hème, le second groupe se lie aux hémoprotéines et le troisième lie les hémophores (Wandersman & Stojiljkovic, 2000).

En se basant sur leur spécificité vis-à-vis du ligand, les récepteurs de l'hème peuvent être classés en deux catégories : ceux ayant une spécificité étroite pour les ligands héminiques et ceux ne discriminant pas les différentes sources de l'hème. Par exemple, *Haemophilus* et *Neisseriae* expriment des RTBDs ne reconnaissant que l'hémoglobine et les complexes l'hémoglobine-haptoglobine. À l'inverse, les entérobactéries expriment des récepteurs relativement non spécifiques capables de lier, pratiquement, n'importe quelle source d'hème ((Hornung *et al.*, 1996) (Bracken *et al.*, 1999)).

III.2.2. Interaction RTBD-hème

Les alignements de séquences des différents récepteurs de l'hème révèlent la présence de deux motifs consensus (**FRAP** et **NPNL**) et de deux résidus (**His**) hautement conservés et spécifiques à cette classe de RTBDs et qu'on ne retrouve pas dans la séquence des autres RTBDs. Les deux motifs consensus sont généralement localisés dans le tonneau β au niveau des boucles extracellulaires. L'une des deux His conservées est localisée dans le tonneau β entre les motifs FRAP et NPNL, l'autre His est située généralement dans le bouchon sur une boucle apicale (Bracken *et al.*, 1999). Les motifs consensus et les deux His conservées sont essentiels pour la reconnaissance, la coordination de l'hème et son transfert des substrats protéiques. La mutation des motifs consensus et des deux His conservées chez HemR de *Yersinia enterocolitica*, HmuR de *Porphyromonas gingivalis* et HmbR de *Neisseria meningitidis* ((Bracken *et al.*, 1999) (Olczak *et al.*, 2005)) a montré leur importance dans l'acquisition de l'hème. Chez *S. dysenteriae*, la mutation d'une des deux His conservées (His86 ou His420) entraîne une diminution de la capacité du récepteur à extraire efficacement l'hème de l'hémoglobine. En revanche, le double mutant H86A-H420A n'est plus en mesure d'extraire l'hème de l'hémoglobine (Wilks & Burkhard, 2007).

III.2.3. Devenir de l'hème

Après avoir traversé la membrane externe *via* les RTBDs, l'hème est internalisé dans le périplasma. Il est rapidement pris en charge par une protéine périplasmique affine, appelée PHBP (pour *Periplasmic Heme Binding Protein*), faisant partie du transporteur ABC. Plusieurs PHBPs comme HemT (*Yersinia enterocolitica*), ShuT (*S. dysenteriae*), PhuT (*P. aeruginosa*), HutB (*Vibrio cholerae*) et ChuT (*Escherichia coli*) ont été identifiées et caractérisées. Elles possèdent une forte homologie de séquences avec 30 à 90% des acides aminés identiques (Tong & Guo, 2009). Les structures de PhuT et de ShuT ont été résolues par cristallographie. Elles partagent les mêmes caractéristiques structurales des protéines périplasmiques impliquées dans le transport des ferri-sidérophores (comme FhuD) et de la vitamine B12 (BtuF) (Ho *et al.*, 2007).

La translocation de l'hème par le transporteur ABC à travers la membrane interne est couplée à l'hydrolyse de l'ATP (Burkhard & Wilks, 2008). Dans le cytoplasme, l'hème est généralement catabolisé par une hème oxygénase. Cette réaction d'oxydation produit de la biliverdine, du monoxyde de carbone et du fer libre (**figure 25B**). Toutefois, avant sa dégradation par l'hème oxygénase, l'hème peut être séquestré par une protéine afin d'éviter les effets toxiques de l'hème libre pour les cellules (Tong & Guo, 2009).

Dans le cas de *S. dysenteriae*, la protéine cytoplasmique ShuS lie l'hème avec une forte affinité (Kd d'environ 13 μ M) et peut agir comme une protéine cytoplasmique de stockage de l'hème. ShuS peut aussi se lier à la double hélice d'ADN pour la protéger contre les dommages oxydatifs dus à l'hème libre (Wilks, 2001). Identifiée initialement chez les mammifère, l'hème oxygénase protège les cellules contre les effets toxiques de l'hème libre (Wilks, 2002).

Plus récemment, un mécanisme d'extraction du fer de l'hème n'impliquant pas la dégradation de la porphyrine a été mis en évidence chez *E. coli*. Il implique les protéines YfeX et EfeB. **EfeB**, périplasmique, permettrait l'extraction du fer de l'hème dans le périplasme, le fer serait transporté dans le cytoplasme par un transporteur de la membrane interne. **YfeX**, cytoplasmique, prendrait en charge le fer internalisé (Létoffé *et al.*, 2009).

L'acquisition de l'hème, dépendant généralement des niveaux de fer intracellulaires, est régulée par la protéine Fur (Hantke, 2001). En revanche, il a été montré que l'expression du récepteur de l'hème HgbA chez *Haemophilus ducreyi* est régulée par les niveaux de l'hème (Elkins *et al.*, 1995).

CHAPITRE IV

Acquisition du fer par la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*

IV.1. La bactérie *P. aeruginosa*

- IV.1.1. Présentation générale
- IV.1.2. Caractéristiques génétiques
- IV.1.3. Facteurs de virulence
- IV.1.4. Les sidérophores utilisés par *P. aeruginosa*

IV.2. Les Pvds de *P. aeruginosa*

- IV.2.1. Généralités
- IV.2.2. Pvd de *P. aeruginosa* PAO1
 - a) Structure
 - b) Caractéristiques spectrales
 - c) Biosynthèse et maturation

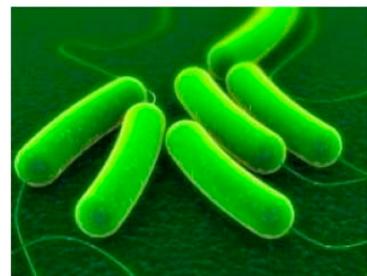
IV.3. Transport à travers la membrane externe

- IV.3.1. Structure de FpvA
- IV.3.2. Site de liaison de la ferri-pyoverdine
- IV.3.3. Changements de conformation induits par la liaison de la ferri-pyoverdine
- IV.3.4. La protéine TonB
- IV.3.5. Translocation à travers la membrane externe

IV.4. Devenir du complexe ferri-pyoverdine

- IV.4.1. Dissociation dans le périplasma
- IV.4.2. Transport à travers la membrane interne

IV.5. Régulation de l'acquisition du fer par la voie Pvd



www.sante-decouverte.com/bacteriologie/

La thématique de recherche développée au laboratoire concerne l'étude du transport du fer chez Pseudomonas. Dans ce chapitre, nous abordons en détail le système d'acquisition du fer par la voie Pvd chez P. aeruginosa.

IV.1. La bactérie *P. aeruginosa*

IV.1.1. Présentation générale

P. aeruginosa (anciennement appelé bacille pyocyanique) est l'espèce-type du genre *Pseudomonas*, genre-type de la famille des *Pseudomonadaceae* ou Pseudomonades (**figure 26**). *P. aeruginosa* est un bâtonnet à Gram-négatif droit ou légèrement incurvé, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulant, généralement mobile grâce à un flagelle polaire unique, aérobic strict, à métabolisme oxydatif et opportuniste. Cette bactérie est retrouvée normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et chez les végétaux, mais peut également vivre à l'état commensal sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux (Goldberg, 2000). Par sa versatilité, *P. aeruginosa* peut être retrouvé naturellement sous forme planctonique, mobile ou dans un biofilm attaché à un support. *P. aeruginosa* est inoffensif pour les individus en bonne santé, mais devient rapidement très dangereux pour les personnes souffrant de déficiences immunitaires ou présentant de pathologies, pouvant initier le développement d'une infection, comme les grands brûlés ou les malades atteints de la mucoviscidose. *P. aeruginosa* est le plus souvent responsable d'infections nosocomiales comme les septicémies, les infections urinaires, les pancréatites et les dermatites, ainsi que les pneumonies associées aux appareils de ventilation. En milieu hospitalier, certaines souches sont plus dangereuses par leur forte densité et leur résistance aux antibiotiques. La colonisation pulmonaire chronique survenant chez les patients atteints de mucoviscidose s'avère souvent être la cause finale de décès ((Hardalo & Edberg, 1997) (Odeh & Quinn, 2000) (Goldberg *et al.*, 2008) (Wagner & Iglewski, 2008)). Les *Pseudomonas* spp. peuvent produire deux types de pigments hydrosolubles diffusant dans le milieu de culture : les pigments phénaziniques non fluorescents et les pyoverdines fluorescentes (Stanier, 1966). La production ou non de pigments fluorescents permet ainsi de séparer les espèces du genre *Pseudomonas* en deux groupes, *Pseudomonas* non fluorescents (*P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*...) et les *Pseudomonas* fluorescents (*P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida* ...) (Stanier, 1966).

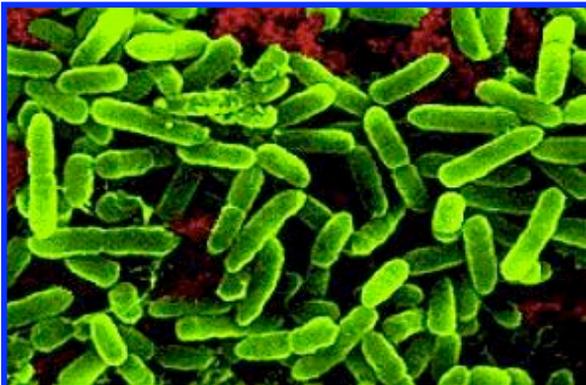


Figure 26 : Bâtonnets de *P. aeruginosa*
(Image © James A. Sullivan)
Chaque bactérie mesure 0,5 x 2 à 3 µM

IV.1.2. Caractéristiques génétiques

Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grands génomes bactériens, il comporte 6,3 millions de paires de bases contre 4,6 millions pour l'organisme bactérien modèle *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997). 5570 cadres ouverts de lecture ont été prédits, le rapprochant ainsi de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comportant environ 6200 cadres ouverts de lecture. Le génome de *P. aeruginosa* a un contenu en bases guanine et cytosine (G+C) très élevé : environ 66,6 %. En outre, le génome de *P. aeruginosa* varie en taille selon les clones étudiés entre 5 et 7 millions de paires de bases. Il est constitué d'une mosaïque de loci d'ADN spécifiques à l'espèce (70 à 90%) et d'autre part au clone (10 à 30%). Le séquençage complet du génome de la souche *P. aeruginosa* PAO1 en 2000 (Stover *et al.*, 2000) a permis de montrer qu'un nombre considérable de gènes est impliqué dans des systèmes de régulation et dans les fonctions de transport et du métabolisme des différents nutriments. La taille et la complexité du génome de *P. aeruginosa* est le reflet des adaptations évolutives lui ayant conféré sa grande capacité d'adaptation à de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments. Les protéines de la membrane externe, particulièrement importantes pour *P. aeruginosa*, interviennent dans l'import des nutriments, l'export des facteurs de virulence, l'adhésion et dans la mobilité. Selon les prédictions, environ 150 gènes coderaient pour des protéines membranaires impliquées dans le transport d'une large variété de nutriments dont les ferri-sidérophores. Trois grandes familles paralogues ont été ainsi identifiées : la famille des porines spécifiques (19 gènes), la classe des RTBDs (34 gènes) et la famille des protéines de la membrane externe impliquées dans l'efflux ou dans la sécrétion (18 gènes) (Stover *et al.*, 2000).

IV.1.3. Facteurs de virulence

P. aeruginosa possède un grand nombre de facteurs de virulence essentiels à l'établissement et au maintien des infections (**tableau 4**). Les facteurs de virulence ne sont pas synthétisés de manière constitutive, la majorité d'entre eux est produite en phase tardive de croissance ou dans des conditions de carence (carence en fer, en phosphate...) (Pitt, 1986).

IV.1.4. Sidérophores et virulence

Lors d'une infection, *P. aeruginosa* produit deux sidérophores majoritaires, la Pvd et la pyochéline, lui permettant d'entrer en compétition pour le fer avec la transferrine (Tf) et la lactoferrine (Lf) de l'hôte colonisé (Lamont *et al.*, 2009). Ils sont ensuite récupérés et transportés activement vers le périplasme de la bactérie *via* les RTBDs (Takase *et al.*, 2000b).

Des mutants de *Pseudomonas* ne produisant pas la Pvd ne sont pas virulents dans des modèles d'animaux (Takase *et al.*, 2000b). Le maintien de l'infection et la prolifération de *P. aeruginosa* se font grâce aux actions combinées de la Pvd et de la pyochéline, mais aussi grâce à des exoprotéases, en particulier l'élastase. Celle-ci effectue la coupure de la Tf en petits peptides, le fer ainsi libéré se trouve chélaté par la Pvd ou la pyochéline et devient directement assimilable par la bactérie (Abdallah *et al.*, 1991). La ferri-pyoverdine présente dans le milieu extracellulaire agit également comme régulateur positif de la transcription d'autres facteurs de virulence (exotoxine A et endoprotéases) *via* la cascade de signalisation (*cf* § IV.5). La pyochéline agit comme chélateur de fer mais elle est également responsable d'un effet pathogène secondaire. En effet, elle catalyse la production de radicaux hydroxyles cytotoxiques (le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes) et contribue ainsi à la destruction des cellules épithéliales pulmonaires (Brigitigan *et al.*, 1992). Il a été montré récemment que la Pvd constitue un facteur important pour la colonisation de la plante du tabac par le pathogène *P. syringae* pv. *tabaci* 6605 (Taguchi *et al.*, 2010).

Tableau 4 : Facteurs de virulence produits par *P. aeruginosa* (Pitt, 1986)

Facteurs de virulence	Rôles lors de l'infection
Pili de type IV	Adhésion aux épithéliums
Exoenzyme S	Fixation aux glycosphingolipides Dépolymérisation des filaments d'actine et résistance aux macrophages
Flagelle	Adhésion
Pseudocapsule d'alginate	Protection contre la phagocytose, la déshydratation et les antibiotiques
Cytotoxine	Formation de pores dans les membranes des leucocytes
Phospholipase C	Hémolyse
Protéases	Hémorragies et nécroses tissulaires
Exotoxine A	Inhibition de la synthèse protéique des cellules eucaryotes par ADP-ribosylation des facteurs d'élongation EF2
Sidérophores : Pyochéline Pyoverdine	Établissement et maintien de l'infection dans les conditions de carence en fer

IV.1.5. Les sidérophores utilisés par *P. aeruginosa*

En plus de la Pvd et de la pyochéline, *P. aeruginosa* est également capable d'utiliser un certain nombre de sidérophores hétérologues (ou exogènes) d'origine bactérienne ou fongique :

Sidérophores bactériens : l'entérobactine d'*E coli* (Poole *et al.*, 1991), la cépabactine de *Burkholderia cepacia* (Mislin *et al.*, 2006), la mycobactine et la carboxymycobactine de *Mycobacterium smegmatis* (Llamas *et al.*, 2008) et l'aerobactine de *Aerobacter aerogenes* (Cuiv *et al.*, 2006).

Sidérophores fongiques : les deferrioxamines et le ferrichrome ((Llamas *et al.*, 2006) (Hannauer *et al.*, 2010)).

La présence d'un grand nombre de gènes codant pour les RTBDs dans le génome de *P. aeruginosa* (Cornelis & Matthijs, 2002) peut expliquer sa capacité à utiliser une large variété de sidérophores. En fait, 32 gènes codant pour des RTBDs de sidérophores ont été identifiés dans le génome de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

IV.2. Les Pvds de *P. aeruginosa*

IV.2.1. Généralités

Les Pvds correspondent à un groupe de sidérophores étroitement apparentés et complexes, de par leurs taille et structure. Les Pvds, de couleur vert jaune fluorescente, sont synthétisées et secrétées dans le milieu extracellulaire par les *Pseudomonas* fluorescents dans les conditions de carence en fer. Découvertes en 1892, les Pvds ont été décrites en utilisant des noms différents comme **fluorescéines** et **pseudobactines**. Leur implication dans l'acquisition du fer a été établie de manière concluante à la fin des années 1970 grâce aux travaux fondateurs de J-M. Meyer et ses collaborateurs ((Meyer & Abdallah, 1978) (Meyer & Hornspreger, 1978)). La structure de la première Pvd a été résolue par RMN en 1981 (Teintze *et al.*, 1981). A ce jour, plus de 60 Pvds provenant de différentes souches de *Pseudomonas* ont été identifiées (Meyer *et al.*, 2008), elles sont toutes composées de trois parties caractéristiques : un chromophore, une chaîne latérale acyle et une chaîne peptidique variable (Budzikiewicz, 2004).

- Le chromophore est un dérivé de la quinoline (2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline) conservé chez toutes les Pvds. Il est responsable de la couleur et de la fluorescence typiques des Pvds (Meyer, 2000).
- La chaîne latérale acyle est constituée dans la plupart des cas d'un acide dicarboxylique (acide succinique, acide maléique ou acide α -cétoglutarique) ou d'un dérivé amide de cet acide. Elle est liée au groupe amino du chromophore en position C3.
- La chaîne peptidique variable peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique ((Abdallah & Pattus, 2000) (Budzikiewics, 2004)). Elle est liée par un groupe amide à la fonction carboxyle C1 (rarement C3) du chromophore (Visca *et al.*, 2006).

La longueur et la composition de la chaîne peptidique sont spécifiques de chaque souche, elle comporte généralement entre 6 et 12 acides aminés dont certains sont inhabituels (comme l'hydroxyornithine et l'allo-thréonine) et d'autres ont une configuration D. La diversité de composition des séquences peptidiques des PvdS, indique que de nombreuses enzymes seraient impliquées dans leur biosynthèse.

La structure des PvdS varie d'une espèce à l'autre et même entre les souches de la même espèce. Les différentes souches de *P. aeruginosa* produisent trois types de PvdS de structures différentes : PvdI (Pvd dans la suite du manuscrit), PvdII et PvdIII (**figure 27**) (Meyer *et al.*, 1999). Cette variabilité structurale constitue un outil de différenciation et de taxonomie au sein du genre *Pseudomonas* : **le sidérotypage**. Le sidérotypage est basé sur le comportement électrophorétique et sur l'incorporation croisée des différentes isoformes de Pvd par les différentes souches de *Pseudomonas* ((Fuchs *et al.*, 2001) (Meyer *et al.*, 2008)). Chacune des trois PvdS est reconnue par un RTBD spécifique appelé FpvAI (FpvA dans la suite du manuscrit), FpvAII et FpvAIII, respectivement (Cornelis *et al.*, 1989). Cependant, il a été montré que le récepteur FpvAIII était aussi capable de transporter la PvdII (Ghysels *et al.*, 2004). FpvAII peut reconnaître deux PvdS de *P. fluorescens* PL7 et PL8 (Meyer *et al.*, 2008).

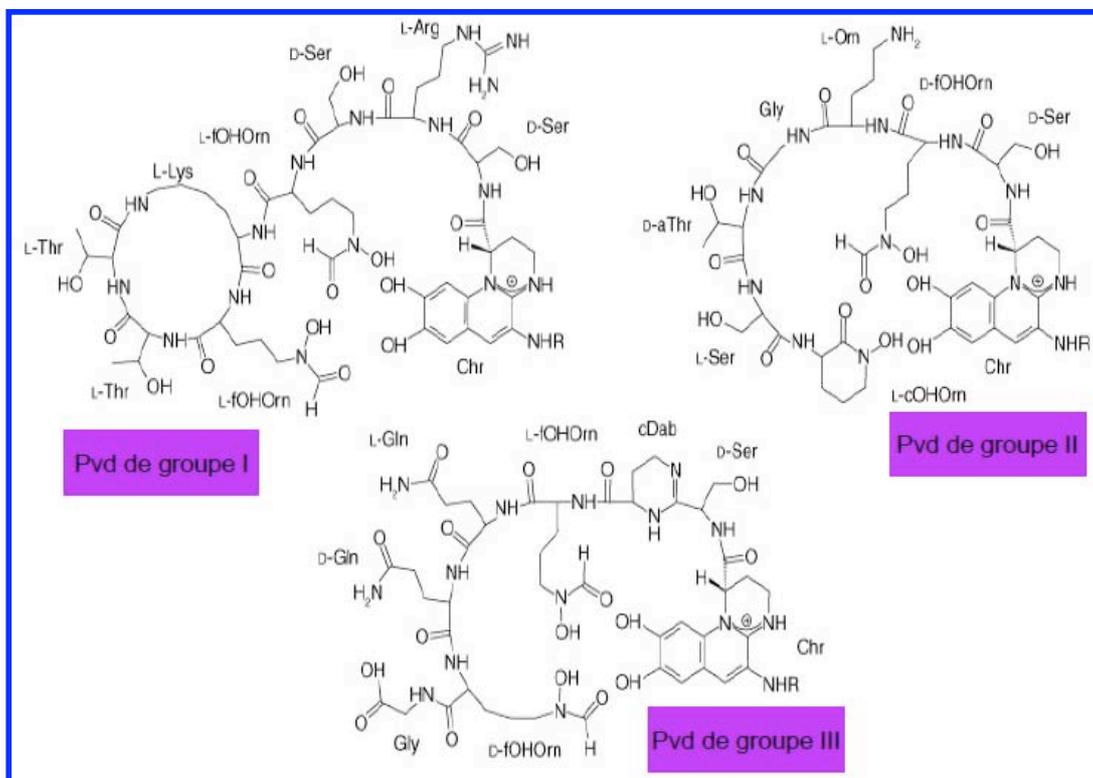


Figure 27 : Structures primaires des trois types de PvdS produites par *P. aeruginosa*

Toutes les PvdS comportent un chromophore (Chr), une chaîne peptidique liée à la fonction carboxyle C1 du Chr et un acide dicarboxylique lié au groupement amino du Chr en position C3. Elles varient au niveau de la composition en acides aminés de la chaîne peptidique. PvdI est produite par *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1), PvdII par *P. aeruginosa* ATCC 27853 et PvdIII par *P. aeruginosa* R et Pa6. AThr : allo-thréonine ; cDab : tetrahydropyrimidine ; cHOm : N5-hydroxyornithine cyclique ; Dab : 2,4-diaminobutyrate ; fHOm : N5-formyl-N5-hydroxyornithine

IV.2.2. Pvd de *P. aeruginosa* PAO1

a) Structure

La Pvd est composée d'un chromophore lié à un octa-peptide partiellement cyclique (D.Ser–L.Arg–D.Ser–L.N5-OH-Orn–L.Lys–L.N5-OH-Orn–L.Thr–L.Thr) et à un acide dicarboxylique (**figure 28**) (Abdallah *et al.*, 1991). La chélation du Fe³⁺ par la Pvd est assurée par le catéchol du groupement quinoline du chromophore et les fonctions hydroxamates des deux hydroxyornitines présentes sur le peptide, avec une stoechiométrie (Pvd/Fe) de 1:1 et une affinité d'environ 10³² M⁻¹ (Albrecht-Gary *et al.*, 1994).

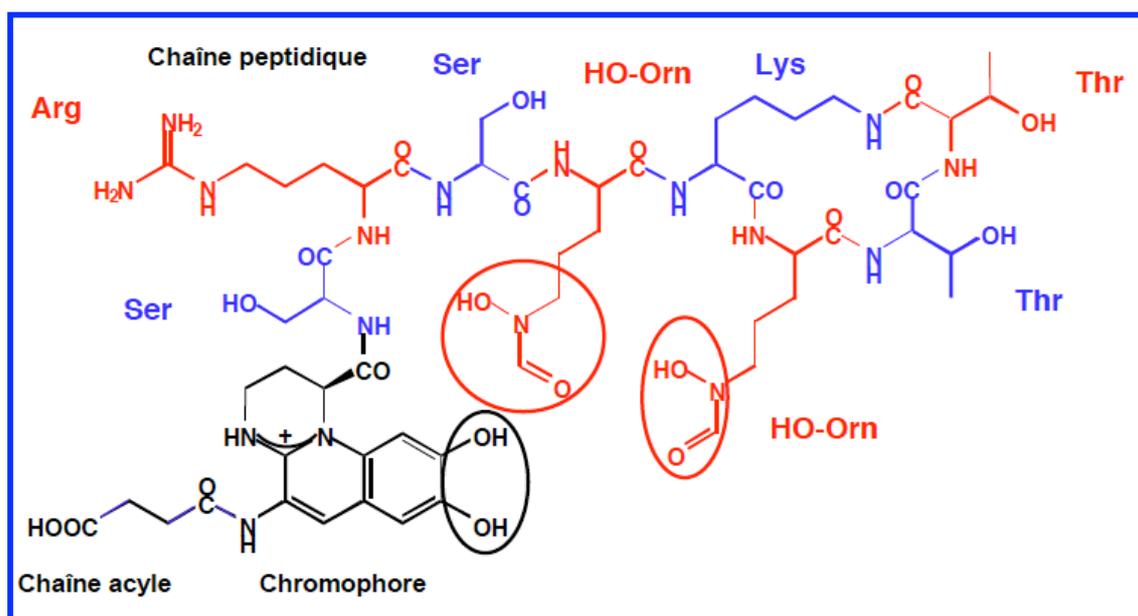


Figure 28 : Structure primaire de la Pvd de *P. aeruginosa* PAO1

La Pvd de *P. aeruginosa* PAO1 est constituée d'un chromophore lié à un diacide et à un octa-peptide. Le Fe³⁺ est complexé par le catéchol du groupement quinoline du chromophore et les fonctions hydroxamates des deux hydroxyornitines (fonctions entourées par des cercles).
HO-Orn : hydroxyornithine

b) Caractéristiques spectrales

Les caractéristiques spectrales et de fluorescence de la Pvd dues au chromophore sont les éléments clés des études réalisées ces 15 dernières années par Schalk et collaborateurs sur le transport et l'acquisition du fer par la voie Pvd chez *P. aeruginosa*. Ces études ont considérablement contribué à la compréhension des mécanismes d'interaction de la Pvd (vide et chargée en métal) avec le RTBD FpvA au niveau de la membrane externe. À pH 5, le spectre UV (Ultra-Violet) de la Pvd montre deux pics d'absorption à 360 et à 380 nm. A pH 8, le spectre montre un pic avec un maximum d'absorption à 400 nm. En excitant la Pvd à 380 nm, une émission de fluorescence est observée à 450 nm (**figure 29**).

Lorsque la Pvd chélate le fer, la fluorescence du chromophore est éteinte par ce métal. Cette propriété renseigne sur la forme vide ou complexée de la Pvd, et permet donc de distinguer les formes apo et ferrique de la Pvd ((Schalk *et al.*, 1999) (Schalk *et al.*, 2002)). La propriété de fluorescence de la Pvd permet également de suivre *in vivo* et en temps réel les cinétiques de dissociation des complexes ferri-pyoverdine (Greenwald *et al.*, 2007). Il a été montré plus récemment que la Pvd peut également complexer de nombreux autres métaux (Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} ...) mais avec des affinités moindres. Selon le métal chélaté, les propriétés spectrales et de fluorescence de la Pvd sont modulées (Braud *et al.*, 2009). Les spectres **d'émission de fluorescence** des Trp de FpvA (maximum d'émission de la fluorescence à 337 nm) et **d'absorption** de la Pvd (maximum d'absorption à 380 nm) se recouvrent, cela rend possible un transfert d'énergie de fluorescence entre ces deux entités si la distance entre elles est inférieure à 10 Å. Ainsi, un transfert d'énergie a lieu uniquement lorsque la Pvd est liée au récepteur FpvA. Il est donc possible d'observer l'émission de fluorescence de la Pvd *via* le FRET (pour *Fluorescence Resonance Energy Transfert*) en excitant les Trp de FpvA à 295 nm. Avec cet outil, il est possible de différencier le complexe FpvA-Pvd fluorescent du complexe FpvA-Ferri-pyoverdine non fluorescent (**figure 30**) et de suivre *in vivo* et en temps réel le transport du fer chez *P. aeruginosa* par la voie Pvd ((Schalk *et al.*, 1999) (Schalk *et al.*, 2002)). En effet, ce transport se traduit par un signal caractéristique représenté dans la **figure 30**. Les cellules sous excitation à 295 nm sont fluorescentes à 450 nm, cette fluorescence serait due au fait que tous les récepteurs FpvA à la surface cellulaire sont chargés en Pvd. Après ajout de la ferri-pyoverdine, il y a **diminution de la fluorescence** due à la formation du complexe FpvA-Ferri-pyoverdine non fluorescent. Sur le récepteur, la Pvd est échangée par la ferri-pyoverdine. La **remontée de la fluorescence** a été tout d'abord attribuée à un recyclage dans le milieu extracellulaire de la Pvd sur le récepteur FpvA après le transport et la dissociation dans le périplasme du complexe ferri-pyoverdine ((Schalk *et al.*, 2002) (Greenwald *et al.*, 2007)). De nouvelles données du laboratoire suggèrent que cette remontée de fluorescence serait indépendante du recyclage de la Pvd, mais liée plutôt à du FRET entre la Pvd et une protéine périplasmique contenant des résidus Trp encore non identifiée (communication interne, résultats non publiés).

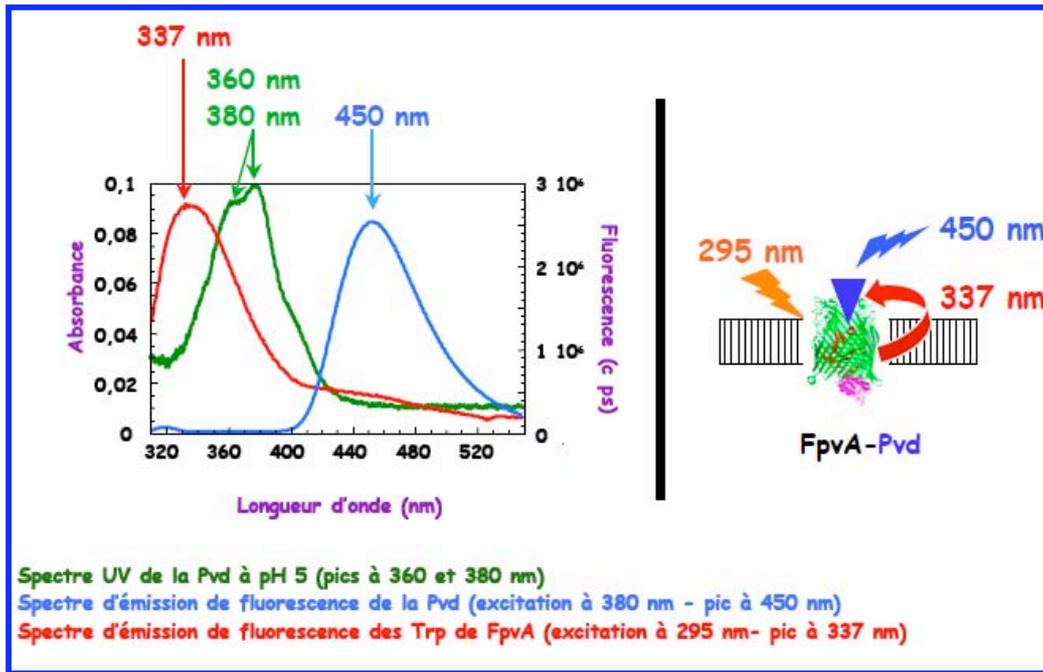


Figure 29 : Caractéristiques spectrales de la Pvd (Schalk *et al.*, 1999)

Le spectre d'absorption de la Pvd (maximum d'absorption à 380 nm) et le spectre d'émission de fluorescence des Trps de FpvA (maximum d'émission de fluorescence à 337 nm), se recouvrent. Cela permet un transfert d'énergie de fluorescence entre les deux entités.

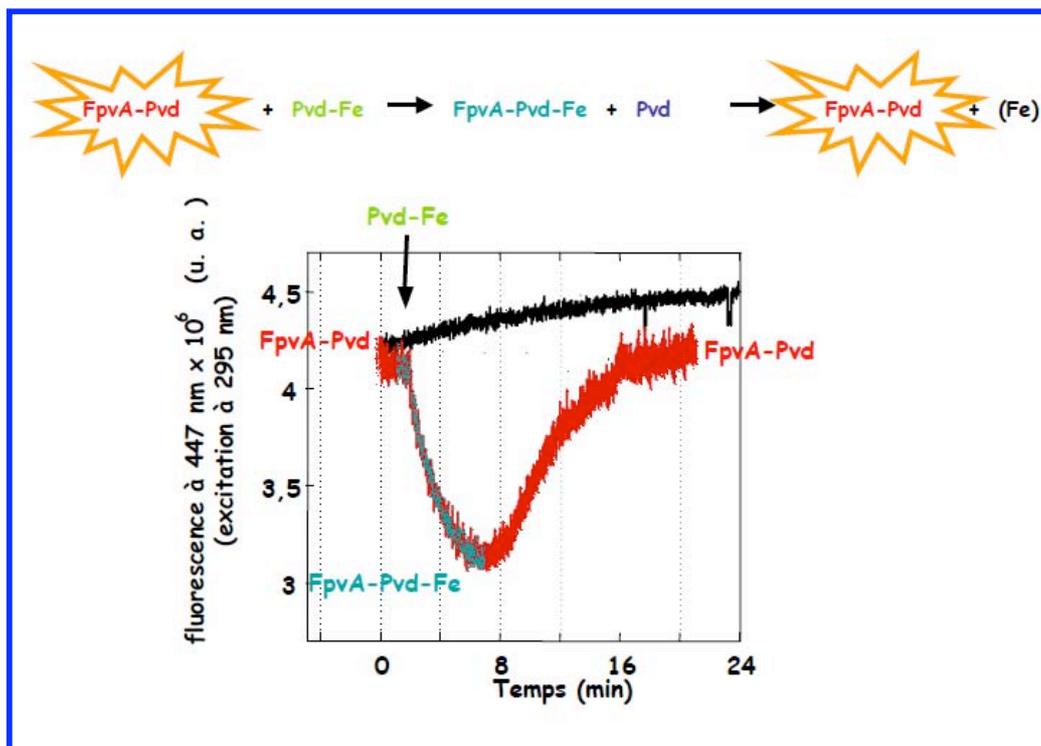


Figure 30 : Visualisation par FRET des interaction FpvA-Ferri-pyoverdine lors transport du fer *via* la Pvd (Schalk *et al.*, 2002)

c) Biosynthèse et maturation

La biosynthèse et la maturation de la Pvd de *P. aeruginosa* PAO1 ont été les plus étudiées. La combinaison des approches génomiques (identification des gènes impliqués dans la synthèse de la Pvd et attribution des fonctions aux protéines correspondant à chaque gène) et biochimiques (vérification des hypothèses émises par les approches génomiques) a permis la compréhension des différentes étapes impliquées dans la biosynthèse et la maturation de la Pvd (Visca *et al.*, 2007). Les protéines indispensables à la synthèse et à la maturation de la Pvd sont codées par plusieurs gènes localisés dans le locus *pvd* (*pvdDEHIJLNOQ*). Ces gènes codent pour des **NRPSs** (pour *Non Ribosomal Peptide Synthetases*) multimodulaires cytoplasmiques (*pvdIJDHL*) (Ravel & Cornelis, 2003), un **transporteur ABC** (*pvdE*) (McMorran *et al.*, 1996) et des **enzymes de maturation** périplasmiques (*pvdNOQ*) (**figure 31A**) (Lewenza *et al.*, 2005).

La biosynthèse de la Pvd démarre dans le cytoplasme par l'assemblage d'un précurseur non fluorescent par les NRPSs : la ferribactine (Merriman *et al.*, 1995). Les NRPSs PvdIJD assemblent séquentiellement des dérivés des précurseurs des acides aminés, les NRPSs PvdLH interviennent dans la synthèse du précurseur du chromophore (Lehoux *et al.*, 2000). Avant leur incorporation définitive dans la chaîne peptidique de la ferribactine par les NRPSs, certains acides aminés subissent des modifications chimiques par PvdHFA (Visca *et al.*, 2007). L'export du précurseur non fluorescent de la Pvd (ferribactine) à travers la membrane interne vers le périplasma est assuré par le transporteur ABC PvdE (McMorran *et al.*, 1996). Dans ce compartiment cellulaire, la ferribactine est transformée en Pvd.

La maturation périplasmique du chromophore par cyclisation est indispensable à la fluorescence de la Pvd. Ce processus commun pour toutes les Pvd implique une série de réactions d'oxydo-réduction (Dorrestein *et al.*, 2003). Mais également les enzymes PvdNOP de fonction non identifiée et l'estérase PvdQ ((Lewenza *et al.*, 2005) (Yeterian *et al.*, 2009)). Enfin, la Pvd est sécrétée du périplasma dans le milieu extracellulaire par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (**figure 31B**) (communication interne, résultats soumis).

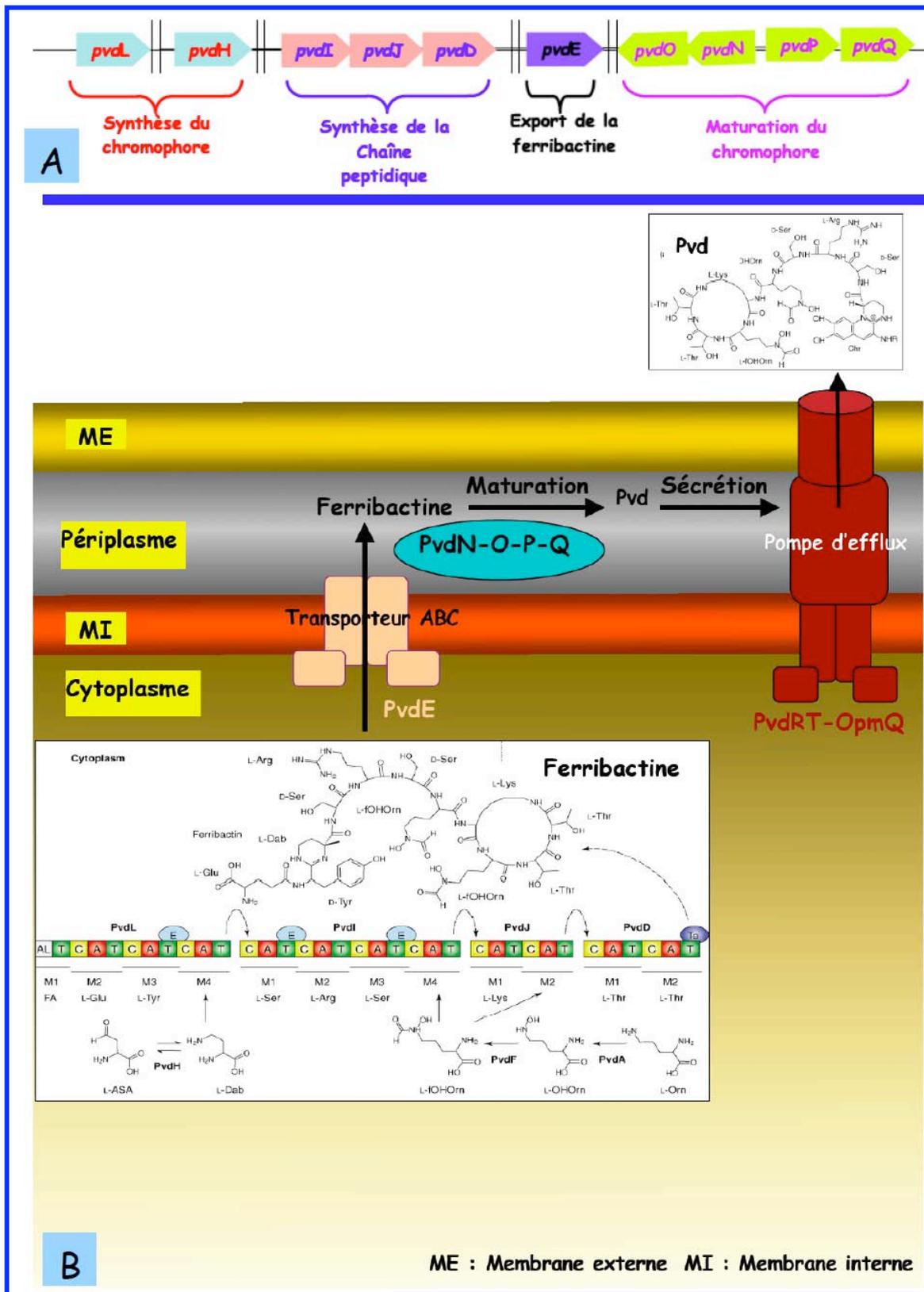


Figure 31 : Biosynthèse et maturation de la Pvd

A : Gènes codant pour des NRPSs intervenant dans la synthèse et la maturation de la Pvd

B : Biosynthèse (dans le cytoplasme), maturation (dans le périplasm) et sécrétion de la Pvd

IV.3. Transport à la membrane externe *via* FpvA

Le gène *fpvA* code pour une protéine de la membrane externe (FpvA) de 815 acides aminés (dont les 43 premiers constituent le peptide signal) appartenant à la sous-classe des RTBDs transducteurs (Poole *et al.*, 1993). FpvA reconnaît, spécifiquement le complexe ferri-pyoverdine, et le transporte du milieu extracellulaire vers le périplasma à travers la membrane externe. Les structures tridimensionnelles de FpvA (Brillet *et al.*, 2007), FpvA-Pvd (Cobessi *et al.*, 2005b) et FpvA-Ferri-pyoverdine (Wirth *et al.*, 2007) ont été résolues par cristallographie (**figure 32**).

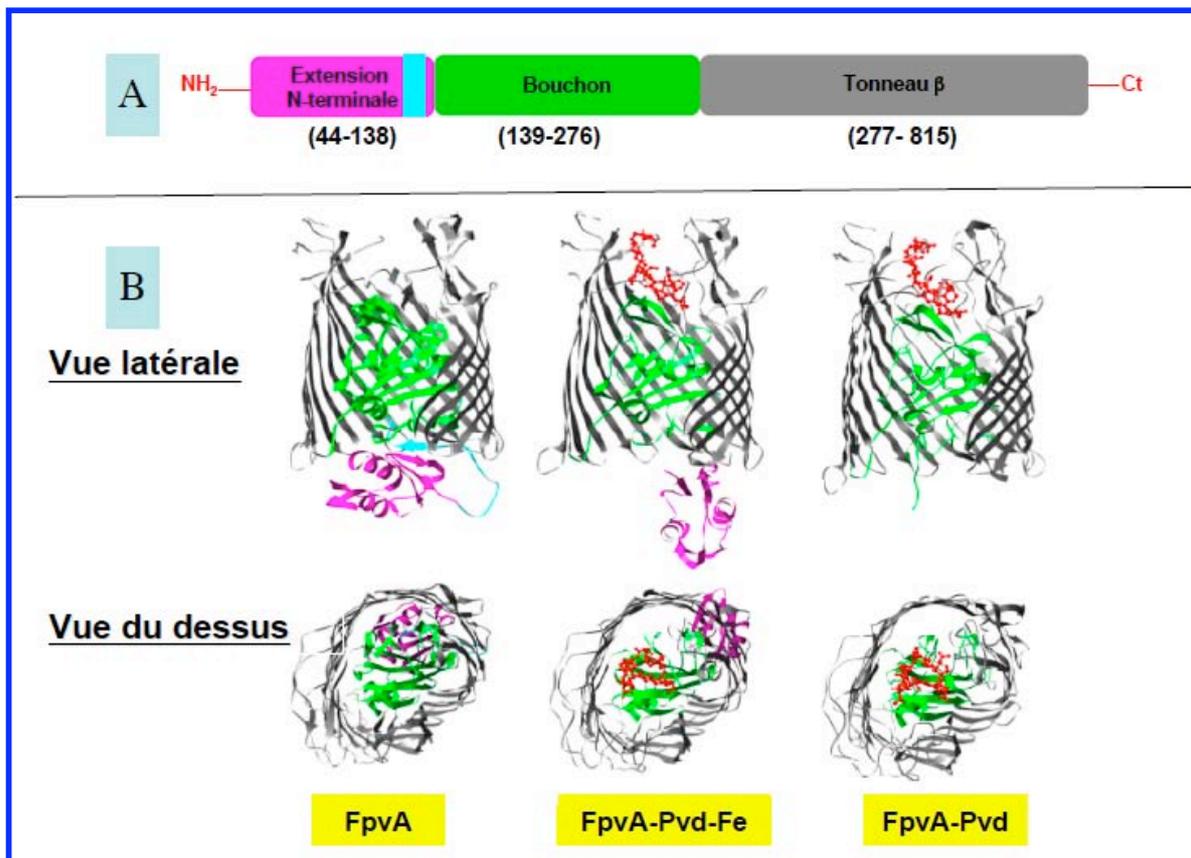


Figure 32 : (A) Structures primaires, et (B) tridimensionnelles de FpvA, FpvA-Ferri-pyoverdine et de FpvA-Pvd

Le tonneau et le bouchon sont représentés respectivement en gris et en vert, le domaine de signalisation en mauve, la boîte TonB en bleu et la Pvd en rouge. Ces trois structures présentent des différences en N-terminal. La boîte TonB est invisible dans les structures de FpvA-Pvd et FpvA-Ferri-pyoverdine. Le domaine de signalisation est invisible dans la structure de FpvA-Pvd.

IV.3.1. Structure de FpvA

Le RTBD FpvA adopte le même repliement tridimensionnel en trois domaines que les autres RTBDs transducteurs. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale on trouve une séquence signal (résidus 1-43), suivie du **domaine de signalisation** (résidus 44-138), puis le domaine **bouchon** (résidus 139-276) et enfin le **tonneau β** , grand domaine de 540 résidus (résidus 277-815). Le tonneau β est constitué de 22 brins β transmembranaires antiparallèles reliés par de longues boucles extracellulaires comprenant entre 3 résidus (boucle L1) et 30 résidus (boucle L5) et par des courts coudes périplasmiques comprenant entre 3 résidus (coude T3) et 10 résidus (coude T4). Le bouchon obture le pore du tonneau β , et est formé de 4 feuillets β comportant 6 brins β connectés par des hélices α . Le domaine de signalisation, localisé dans le périplasme, est composé du domaine de signalisation proprement dit (résidus 44-118) et de la boucle de connexion contenant la boîte TonB (résidus 129-134) ((Cobessi *et al.*, 2005a) (Wirth *et al.*, 2007)) impliqués, respectivement, dans la cascade de signalisation et dans l'interaction avec la protéine TonB et la transduction de l'énergie. Le domaine de signalisation est formé de deux hélices α prises en « *sandwich* » entre deux feuillets β (Brillet *et al.*, 2007) (**figure 32**). Le domaine de signalisation de FpvA n'est pas impliqué dans le transport, la mutation ((James *et al.*, 2005) (Nader *et al.*, 2007)) ou la délétion (Shen *et al.*, 2002) de ce domaine affecte la production de la Pvd mais pas le transport du complexe ferri-pyoverdine.

IV.3.2. Site de liaison de la ferri-pyoverdine

Le site de liaison de la ferri-pyoverdine est localisé sur la face extracellulaire du récepteur, il est constitué essentiellement d'acides aminés aromatiques (6 Tyr, 3 Trp et 3 Glu) appartenant au bouchon, aux brins et aux boucles extracellulaires du tonneau β (**figure 33A**) (Wirth *et al.*, 2007). Ce site est spécifique de la Pvd produite par *P. aeruginosa* PAO1, il a été cependant montré qu'une Pvd similaire, produite par la souche *P. fluorescens* ATCC13525, peut s'y lier avec la même affinité (Schons *et al.*, 2005). Des Pvds produites par d'autres souches de *P. aeruginosa* peuvent également se lier au site de liaison de FpvA (Greenwald *et al.*, 2009). FpvA peut aussi lier la Pvd en complexe avec de nombreux autres métaux (Al^+ , Ga^{3+} , Ag^+ , Cd^{2+} ...). Par contre, seuls les complexes Pvd-Cu, Pvd-Ga, Pvd-Mn et Pvd-Ni seraient transportés par le système FpvA/Pvd avec des efficacités nettement moindres (Braud *et al.*, 2009). Dans les structures FpvA-Ferri-pyoverdine et FpvA-Pvd, la Pvd interagit avec les résidus du bouchon *via* le chromophore, commun à toutes les Pvds.

La chaîne peptidique, spécifique à chaque Pvd, interagit quant à elle avec les résidus des brins et les boucles extracellulaires du tonneau β (**figure 33B**) (Wirth *et al.*, 2007). Parmi les résidus de la chaîne peptidique de la Pvd, la Ser1 n'est pas indispensable à l'interaction FpvA-Pvd, par contre le remplacement de l'Arg induit une diminution de l'affinité de FpvA pour la ferri-pyoverdine (Schons *et al.*, 2005). Cette Arg interagit avec l'Asp597 de la boucle extracellulaire L7, cette interaction serait importante au bon positionnement de la Pvd dans le site de liaison (Schalk *et al.*, 2009).

IV.3.3. Changements de conformation induits par la liaison de la ferri-pyoverdine

Les structures de FpvA et de FpvA-Ferri-pyoverdine montrent que la liaison du complexe ferri-pyoverdine sur son site de liaison provoque des changements de conformation dans la partie N-terminale du récepteur, essentiellement, au niveau de la boîte TonB induisant le déplacement du domaine de signalisation de FpvA dans le périplasme ((Brillet *et al.*, 2007) (Wirth *et al.*, 2007)).

Ce mouvement consiste en un changement de la position de la boucle contenant la boîte TonB permettant son interaction avec le domaine C-terminal de la protéine TonB et le transfert d'énergie nécessaire au transport par FpvA ((Postle & Kadner, 2003) (Wirth *et al.*, 2007)). Les changements de conformation dans la partie N-terminale ont été aussi observés dans le cas de FhuA-Ferrichrome-Fe (Ferguson *et al.*, 1998a) et de FecA-dicitrate-Fe (Ferguson *et al.*, 2002). Cela permet de suggérer un mécanisme de signalisation similaire à tous les RTBDs, allant de l'espace extracellulaire au périplasme. La liaison de la ferri-pyoverdine induit également le mouvement du domaine de signalisation, permettant l'interaction avec la partie C-terminale de FpvR et l'activation de la cascade de signalisation contrôlant l'expression des gènes de la voie Pvd (**figure 34**) (Wirth *et al.*, 2007).

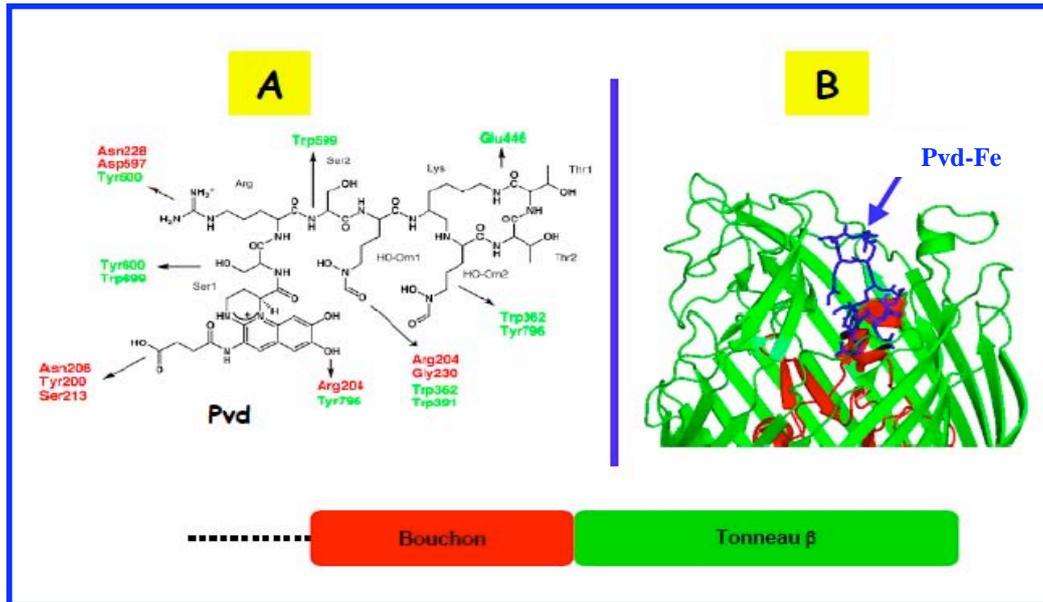


Figure 33 : **A** Interaction des différentes parties de la Pvd avec les résidus du site de liaison du récepteur FpvA **B** Ferri-pyoverdine sur le site de liaison de FpvA

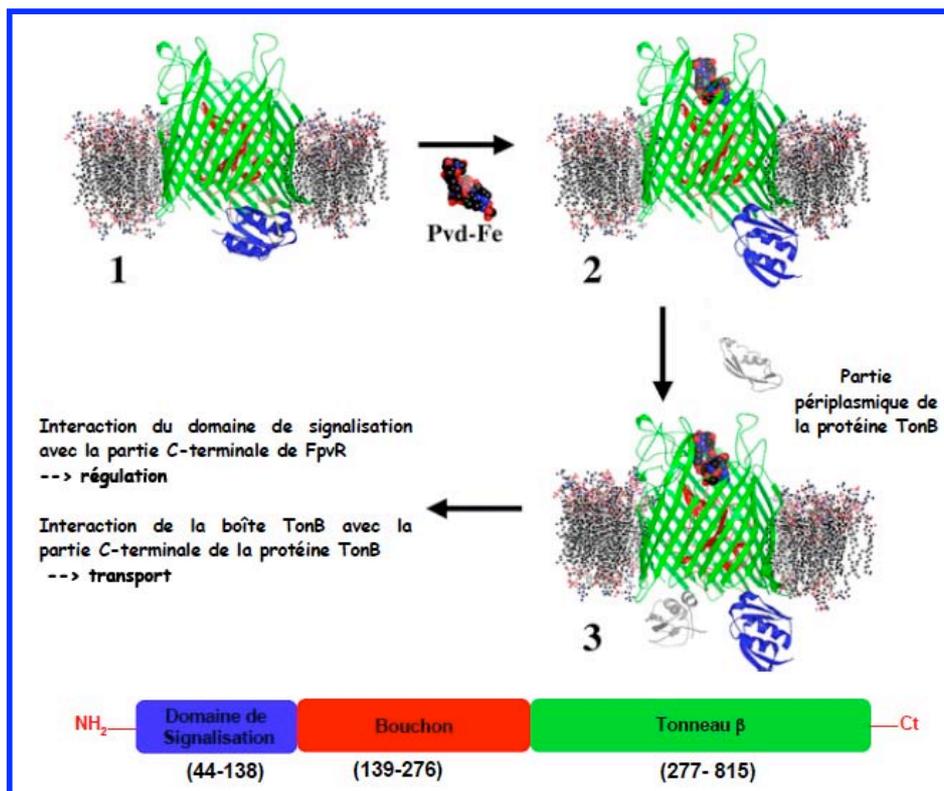


Figure 34 : Transport de la ferri-pyoverdine et transduction du signal à travers la membrane externe

- 1-Lorsque le site de liaison de la ferri-pyoverdine sur FpvA est libre, le domaine de signalisation interagit avec la boîte de TonB.
- 2-Lorsque FpvA est chargée en ferri-pyoverdine, le domaine de signalisation est déplacé dans le périplasm. Il interagit avec la partie C-terminale de FpvR.
- 3-La boîte TonB interagit avec la partie C-terminale de la protéine TonB.

IV.3.4. La protéine TonB

Le gène *tonB*, codant pour la protéine TonB, a été identifié chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif. La localisation et les fonctions de la protéine TonB ont été principalement démontrées chez *E. coli*. Trois gènes homologues du gène *tonB* d'*E. coli* ont été identifiés dans le génome de *P. aeruginosa* (*tonB1*, *tonB2* et *tonB3*), mais aucune des protéines homologues à ExbB et ExbD (Imperi *et al.*, 2008). Le gène *tonB1* est impliqué dans l'acquisition du fer *via* la pyochéline, la Pvd, l'entérobactine (Takase *et al.*, 2000a), le ferrichrome (Hannauer *et al.*, 2010) et l'hème (Zhao & Poole, 2000). *tonB1* est aussi impliqué dans la cascade de signalisation et la régulation de l'expression des gènes de la voie Pvd (Shirley & Lamont, 2009). La mutation de *tonB2* n'a pas d'effet négatif sur l'acquisition du fer ou de l'hème. Un double mutant *tonB1-tonB2* est affecté dans le transport du fer et la croissance par rapport au simple mutant *tonB1*. Cela indique que *tonB2* peut remplacer partiellement *tonB1* (Zhao & Poole, 2000). *tonB3* est impliqué dans le transport et la sécrétion des éléments nécessaires à la mobilité (pili de type IV), sa mutation n'affecte pas l'acquisition du fer (Huang *et al.*, 2004).

IV.3.5. Translocation à travers la membrane externe

Comme pour les autres RTBDs (*cf* § II.3), le mécanisme de translocation de la ferri-pyoverdine à travers FpvA n'a pas été élucidé. Des expériences de transport du ⁵⁵Fe réalisées avec des PvdS modifiées, portant soit un groupement photoactivable sur le peptide ou le chromophore ou des antibiotiques (prodrogues) indiquent que le canal formé pour le passage du ferri-sidérophore n'est pas très sélectif (Hennard *et al.*, 2001).

IV.4. Devenir du complexe ferri-pyoverdine

IV.4.1. Dissociation dans le périplasma

Les données expérimentales obtenues par Schalk et collaborateurs indiquent que la dissociation du complexe ferri-pyoverdine chez *P. aeruginosa* se fait dans le périplasma, elle implique probablement un mécanisme de réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et un échange de ligand (Greenwald *et al.*, 2007). Après dissociation, l'ion Fe^{2+} serait pris en charge par une protéine périplasmique affine pour éviter les dommages dus à son accumulation. Ensuite, la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ ((Imperi *et al.*, 2009) (Yeterian *et al.*, in press)). Dans le milieu extracellulaire, la Pvd recyclée est de nouveau capable de lier le fer et de le transporter dans le périplasma (Schalk *et al.*, 2002). L'étape de dissociation de la ferri-pyoverdine n'implique donc aucune dégradation enzymatique ou modification chimique de la Pvd qui pourraient diminuer son affinité pour l'ion Fe^{3+} . La localisation cellulaire dans le périplasma de la dissociation du complexe ferri-pyoverdine par réduction constitue une des particularités de la voie Pvd chez *P. aeruginosa* qu'on ne retrouve pas chez *E. coli* (Schalk, 2008).

IV.4.2. Transport à travers la membrane interne

Le transport du ferri-sidérophore à travers la membrane interne chez les bactéries à Gram-négatif, fait intervenir généralement des transporteurs ABC (Locher, 2009). Chez *P. aeruginosa*, un transporteur ABC impliqué dans le transport de l'hème, codé par l'opéron *phuSTUVW*, a été identifié et caractérisé ((Ochsner *et al.*, 2000) (Tong & Guo, 2007)). L'analyse du génome révèle la présence d'un transporteur ABC potentiel, homologue au transporteur ABC de la voie entérobactine d'*E. coli*. Ce transporteur serait impliqué dans le transport de l'entérobactine à travers la membrane interne, après son internalisation par les récepteurs PirA ou PfeA.

À ce jour, aucun transporteur n'est identifié comme étant directement impliqué dans l'acquisition du fer par la voie Pvd chez *P. aeruginosa*.

IV.5. Régulation de l'acquisition du fer par la voie Pvd

La voie Pvd chez *P. aeruginosa* est soumise à une régulation stricte par un double système de contrôle :

Lorsque la quantité de fer dans la cellule est suffisante, un rétrocontrôle par le répresseur Fur va réguler négativement le système Pvd en empêchant l'expression des gènes codant pour des enzymes de production et d'acquisition de la Pvd. En effet, le répresseur Fur et son co-répresseur (Fe^{2+}) répriment l'expression des gènes *pvdS*, *fpvR* et *fpvI* (Cornelis & Matthijs, 2002). Les gènes dont l'expression est contrôlée par la protéine PvdS possèdent des boîtes IS (pour *Iron Starvation*) permettant la fixation de la protéine PvdS qui engendre l'activation de leur transcription (Wilson & Lamont, 2000).

Dans le cas de carence en fer, une cascade de signalisation va réguler positivement le système Pvd en activant l'expression des gènes codant pour les enzymes de production et d'acquisition de la Pvd ((Lamont *et al.*, 2002) (Shen *et al.*, 2002) (Visca *et al.*, 2002) (Mettrick & Lamont, 2009)). Chez *P. aeruginosa*, la cascade de signalisation est TonB-dépendante et nécessite la présence de la boîte TonB du récepteur FpvA(**figure 35**).

La délétion de *tonB* ou de la boîte TonB de FpvA abolit l'expression des gènes de synthèse et de transport de la Pvd et empêche l'activation de la cascade de signalisation (Shirley & Lamont, 2009). Plusieurs autres protéines interviennent dans cette cascade de signalisation :

- Un facteur anti- σ de la membrane interne : FpvR (Redly & Poole, 2005).
- Deux facteurs σ cytoplasmiques, FpvI et PvdS, appartenant à la famille des facteurs σ à fonction extracytoplasmique essentiels pour l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse et l'assimilation de la Pvd ((Visca *et al.*, 2002) (Redly & Poole, 2003)). L'activité de ces facteurs est contrôlée par FpvR.

La cascade de signalisation, qui conduira à l'activation de l'expression des gènes d'assimilation du fer, est initiée par la liaison du complexe ferri-pyoverdine sur le récepteur FpvA. Cela va induire un changement de conformation en N-terminal qui engendre le positionnement du domaine de signalisation dans le périplasme, permettant son interaction avec la partie C-terminale de la protéine FpvR (facteur anti- σ) ((Shen *et al.*, 2002) (James *et al.*, 2005)). La protéine FpvR transmet ce signal à travers la membrane interne en se dissociant des facteurs σ cytoplasmiques, FpvI et PvdS, qui peuvent alors se lier à l'ARN polymérase :

Le complexe FpvI-ARN polymérase va se lier sur la région promotrice du gène *fpvA* permettant ainsi sa transcription et l'expression du RTBD FpvA (Redly & Poole, 2003).

Le complexe PvdS-ARN polymérase va se lier sur la région promotrice du gène *pvdS* permettant la transcription des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de la Pvd ainsi que de deux facteurs de virulence extracellulaires de *P. aeruginosa*, l'endoprotéase PrpL et l'exotoxine A ((Ochsner *et al.*, 1995) (Wilderman *et al.*, 2001)). Des données très récentes du laboratoire indiquent que les complexes Pvd-Ni et Pvd-Cu peuvent également activer cette cascade de signalisation. En présence de ces complexes, une augmentation de la production de la Pvd a été observée (Braud *et al.*, in press).

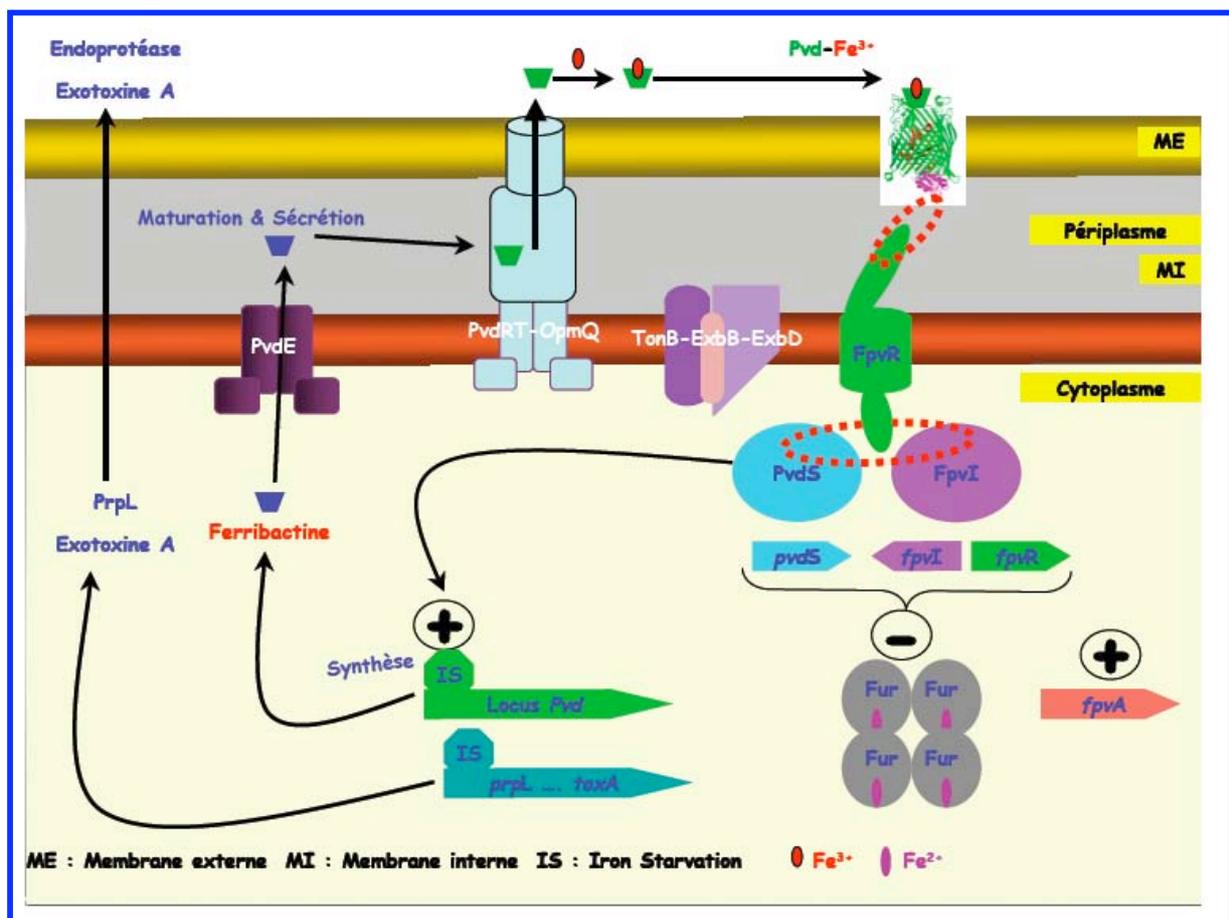


Figure 35 : Cascade de signalisation et régulation de la voie Pvd

La liaison du complexe ferri-pyoverdine sur FpvA induit le changement de conformation du domaine N-terminal. Dans le périplasme, le domaine de signalisation interagit alors avec le facteur anti- σ (FpvR). Les deux facteurs σ (FpvI et PvdS) sont libérés. FpvI va induire l'expression du gène *fpvA*. PvdS induit celle des gènes du locus *pvd* et de deux facteurs de virulence : PrpL et *toxA*. La protéine Fur régule négativement l'expression des gènes *pvdS*, *fpvR* et *fpvI*.

Les travaux effectués au laboratoire par Schalk et collaborateurs ont considérablement contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires d'interaction de la ferripyoverdine avec le RTBD FpvA et de son transport au travers de la membrane externe chez *P. aeruginosa*. Un schéma résumant l'essentiel de ces résultats est présenté dans la **figure 36**.

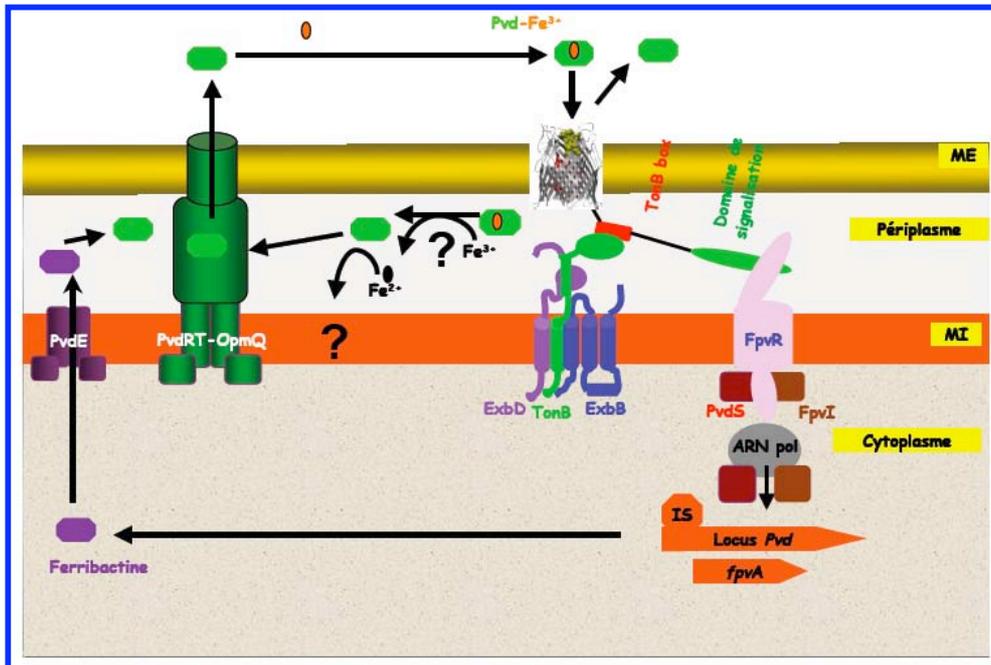


Figure 36 : Acquisition du fer par la voie Pvd chez *P. aeruginosa*

PARTIE II

Résultats & discussion

Chapitre V : Études structurales des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif

Chapitre VI : Caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans le transport de la ferri-pyoverdine à travers la membrane interne chez *P. aeruginosa*

CHAPITRE V

Études structurales des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif

Introduction

V.1. Mise en place d'un protocole pour l'étude structurale des RTBDs

Article I

Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimmann, C. & Cobessi, D. (2009). Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **65(Pt 4)** 326-31.

V.2. Structure de ShuA, récepteur de l'hème/hémoglobine de *Shigella dysenteriae*

Article II

Brillet, K., Meksem, A., Thompson, A. & Cobessi, D. (2009). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65 (Pt 4)** 402-5.

Article III

Cobessi, D., Meksem, A. & Brillet, K. (2010). Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism. *Proteins.* **78(2)** 286-94.

Pour cette partie de la thèse, j'ai fait de la purification de protéines, de la cristallogénèse et j'ai également participé à la collecte des données de diffraction.

Les données collectées ont été traitées par le Dr D. Cobessi qui a aussi résolue les différentes structures dont celle qui a été discutée dans cette thèse, en l'occurrence celle de ShuA.

INTRODUCTION

Cristallographie des protéines

La génomique décrypte des séquences nucléotidiques en quantité exponentielle, plus de 9 millions de séquences sont connues actuellement. En revanche, ces séquences ne renseignent pas plus sur la biologie des systèmes considérés qu'un annuaire téléphonique de Paris sur l'organisation et les merveilles de cette ville. En effet, une bonne compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction des macromolécules biologiques nécessite généralement la détermination de leur structure tridimensionnelle à résolution atomique. Connaître une structure ne consiste pas uniquement à décrire son repliement, mais surtout essayer de répondre à certaines questions de manière à pouvoir comprendre son fonctionnement, les mécanismes par lesquels elle interagit avec d'autres partenaires et les rapports entre sa structure et ses fonctions biologiques, et aussi prédire son affinité pour une molécule ou les effets possibles des mutations de la séquence. Comme la structure tridimensionnelle ne peut être prédite correctement d'après la séquence, elle doit être résolue expérimentalement, avec trois principales méthodes expérimentales possibles : la microscopie électronique, la RMN et la cristallographie.

La microscopie électronique a une résolution de l'ordre de 20 Å. La RMN est surtout plus efficace et plus adaptée pour des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 50 kDa. La cristallographie est, quant à elle, la seule méthode qui permette la détermination de la structure tridimensionnelle à résolution atomique (1 à 2 Å) et l'étude des macromolécules sans limitation de la taille. Longtemps considérées comme des soeurs rivales de la biologie structurale, ces trois techniques sont de plus en plus utilisées de manière conjointe pour élucider, dans les meilleures conditions d'efficacité et de rapidité, la structure à l'échelle atomique des macromolécules biologiques isolées ou en complexes. Ces synergies, s'appuyant sur les forces respectives des trois techniques, sont maintenant mises à profit par la quasi-totalité des instituts modernes de biologie structurale. L'étape limitante d'une étude cristallographique est l'obtention des cristaux de la macromolécule à étudier : **la cristallogenèse**. La formation des cristaux consiste en l'assemblage d'une quantité énorme de molécules (10^{15}) au sein de ce qui deviendra un cristal, tout en conservant leur intégrité structurale et fonctionnelle. La connaissance de la physico-chimie des macromolécules n'est pas suffisante pour établir une méthode rationnelle de cristallogenèse.

Evolution de la cristallographie des protéines

Sous la pression croissante de la demande pour plus de structures tridimensionnelles, les techniques de cristallisation ont fait des progrès énormes au cours des quarante dernières années. La miniaturisation des échantillons (typiquement 1 µL pour les essais d'optimisation) et l'utilisation des méthodes de balayage des conditions optimales de cristallisation, sont deux avancées significatives accomplies. Il faut néanmoins souligner que tous ces progrès ne seraient rien sans ceux qui sont réalisés dans les méthodes de production et de purification du matériel biologique. La cristallogenèse reste, tout de même, pour une grande part très fastidieuse et surtout très empirique. Les premiers cristaux de protéines ont été obtenus par Summer en 1926 (uréase) et en 1934, la pepsine fut cristallisée par Bernal et Crowfoot. Les premiers succès de la cristallographie des protéines datent des années 60 avec la résolution de la première structure tridimensionnelle d'une protéine monomérique en 1960 : la myoglobine (Kendrew *et al.*, 1960), d'une protéine oligomérique : l'hémoglobine en 1962 (Perutz, 1962) et d'une enzyme en 1965 : le lysozyme (Blake *et al.*, 1965). Les changements fondamentaux intervenus dans les techniques propres à la cristallographie, à la biologie et à l'informatique ont entraîné une véritable explosion de la cristallographie. Le nombre de structures résolues ne cesse d'augmenter, actuellement plus de 55000 structures sont disponibles dans la PDB (pour *Protein Data Bank*) contre 6000 en Mars 2000 (**tableau 5**). Avec près de 100 structures déposées dans la PDB chaque semaine, les protéines représentent plus de 90% du total des structures résolues par cristallographie. Cet aspect quantitatif est doublé d'un aspect qualitatif. Des structures de plus en plus complexes et importantes sont résolues : ribosome 70S bactérien (52 protéines, 3 ARNs : au total 2500 kDa) (Cate *et al.*, 1999).

Tableau 5 : Structures tridimensionnelles résolues par les différentes techniques analytiques déposées dans la PDB (statistiques Mars 2010)

Méthode expérimentale	Protéines (P)	Acides Nucléiques (AN)	Complexes P-AN	Autres	Total
Cristallographie	51873	1202	2390	17	55482
RMN	7248	896	154	7	8305
Microscopie électronique	190	17	73	0	280
Combinaison de plusieurs méthodes*	18	1	1	1	21
Autres méthodes	120	4	4	13	141
Total	59449	2120	2622	38	64229

* Combinaisons : Cristallographie – RMN – Microscopie électronique

Cristallographie des protéines membranaires

Parmi les structures protéiques résolues et déposées dans la PDB, la majorité concerne les protéines solubles, alors que les structures des protéines membranaires représentent moins de 1%. Les raisons de ce retard important tiennent à de multiples facteurs, certains historico-culturels et d'autres beaucoup plus fondamentaux liés essentiellement aux obstacles rencontrés lors de la surexpression, la solubilisation, la purification et la cristallisation des protéines membranaires, mais aussi au faible pouvoir diffractant des cristaux de protéines membranaires par rapport à ceux des protéines solubles. Ainsi, il a fallu attendre 1985 pour que la structure d'une protéine membranaire (centre photoréactionnel de *Rhodospseudomonas viridis*) soit disponible dans la PDB ((Deisenhofer *et al.*, 1985) - prix Nobel de Chimie en 1988). Depuis, environ 600 structures de protéines membranaires ont été résolues.

Rôles des protéines membranaires

Environ 30% des gènes du génome humain code pour des protéines membranaires (Boyd *et al.*, 1998). Ces estimations sont basées sur la présence dans les séquences de régions codant pour des segments d'une vingtaine de résidus d'acides aminés, majoritairement hydrophobes, susceptibles de former des hélices α transmembranaires. Ces estimations ignorent donc les protéines membranaires repliées en tonneaux β et les protéines monotopiques, dont la prédiction est beaucoup moins évidente. En incluant les protéines repliées en tonneau β , on estime à près de la moitié les séquences codantes présentes dans le génome humain codant pour des protéines membranaires intégrales (Wallin & von Heijne, 1998). Cette abondance s'explique par le rôle-clef que jouent les protéines membranaires dans l'approvisionnement des cellules en métabolites et en énergie, dans leur morphologie, leurs mouvements et organisation en tissus, et dans les innombrables processus de communication avec le milieu extracellulaire : analyse de l'environnement, sécrétion et détection de messages chimiques, et, chez les métazoaires, organisation des cellules en réseaux susceptibles d'analyser des jeux de *stimuli* complexes et de coordonner une réponse appropriée (Tsukihara & Lee, 1999). Une illustration frappante de l'importance des protéines membranaires dans les relations des organismes avec leur environnement et de la diversification qui peut en résulter est l'existence dans le seul épithélium olfactif de la souris de plusieurs milliers de récepteurs couplés aux protéines G.

Les protéines membranaires constituent la cible directe ou indirecte de près de 50% des médicaments prescrits sur le marché dans le cadre des pathologies humaines les plus courantes comme l'obésité, le cancer, les maladies cardiovasculaires, etc (Müller, 2000). Les études structurales des systèmes de transport membranaire sont donc nécessaires et précieuses. À terme, elles permettront d'entreprendre la recherche d'alternatives thérapeutiques à retombées sanitaires aux traitements des cancers et des hypertensionns.

Étapes de l'étude structurale des protéines par cristallographie

La première étape de l'étude structurale d'une protéine par cristallographie, consiste à la surproduire en grande quantité à partir de sa source naturelle (production homologue) ou en utilisant un système recombinant (production hétérologue). La protéine doit être fraîche et/ou stable, très pure (pureté > 98 %), mono-disperse et concentrée (environ 10 mg/mL). Par la suite, des tests de cristallisation à haut débit (avec un robot de cristallisation) permettront de déterminer les conditions de cristallisation « prometteuses » qui seront optimisées et affinées manuellement afin d'obtenir des cristaux de bonne qualité qui diffractent suffisamment et correctement les rayons x. Le traitement des données de diffraction permettra de résoudre sa structure tridimensionnelle détaillée (**figure 37**). Pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique avec un système optique, il faut disposer d'une source de rayonnement compatible avec la résolution à atteindre. Pour pouvoir résoudre des atomes, le rayonnement doit donc avoir une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les distances inter atomiques, c'est-à-dire de l'ordre de 1,5 Å. Différents rayonnements ayant cette gamme de longueur d'onde peuvent être obtenus avec des électrons, des neutrons ou des photons x. Ainsi, les méthodes de diffraction électronique, de diffraction des neutrons et de diffraction des rayons x peuvent apporter des informations structurales à l'échelle atomique. Pour un cristallographe, résoudre la structure tridimensionnelle d'une protéine par diffraction des rayons x consiste à obtenir une image de sa densité électronique, dans laquelle il pourra construire un modèle et donc avoir la structure de la molécule. Expérimentalement, plusieurs problèmes se posent :

D'une part, la diffusion d'une molécule isolée est trop faible pour avoir suffisamment de signal, ce qui oblige à faire diffuser un grand nombre de molécules simultanément afin d'ajouter leurs contributions. Pour avoir une diffusion cohérente de toutes les molécules, celles-ci doivent être ordonnées dans l'espace. Cet état est atteint dans le cristal, correspondant à un agencement périodique et régulier dans les trois dimensions de l'espace des molécules et pouvant être représenté comme le produit de convolution d'une molécule par un réseau

caractérisé par la maille et le groupe d'espace. Dans un cristal, la molécule est répétée à chaque nœud du réseau suivant les symétries du groupe d'espace.

D'autre part, l'optique des rayons x ne dispose pas de lentilles permettant d'obtenir une image du cristal, la seule information disponible est la diffusion des rayons x par le cristal qui se traduit par la diffraction des rayons x.

Détergents et cristallisation des protéines membranaires

In vivo les protéines membranaires sont enfouies dans les membranes biologiques. Au cours de leur manipulation (extraction, purification...), les membranes sont déstabilisées et les lipides membranaires sont remplacés par un solvant amphiphile aux mêmes caractéristiques physico-chimiques que les phospholipides : le détergent (le Maire *et al.*, 2000). Le détergent, assurant le maintien de la stabilité et des intégrités structurales et fonctionnelles des protéines membranaires, comporte une tête hydrophile et une queue hydrophobe représentée par une chaîne carbonée. La longueur de la tête et de la queue varie selon le détergent. Chaque détergent est caractérisé par sa CMC (Concentration Micellaire Critique), mais aussi par la taille et la forme des micelles qu'il forme en solution. La CMC traduit la concentration au-delà de laquelle les molécules amphiphiles de détergent s'organisent en micelles qui coexistent avec des monomères en solution. La CMC d'un détergent est tributaire de la nature et de la taille de la tête et de la queue mais aussi de la température et de la force ionique. Le détergent mime la membrane et maintient les protéines membranaires solubles en solution évitant ainsi leur agrégation et leur précipitation. Dans un mélange protéine membranaire-détergent on trouve deux catégories de micelles, les micelles de détergent et les micelles mixtes protéine membranaire-détergent. Cette organisation moléculaire est dirigée par des interactions hydrophobes. Ainsi, les queues hydrophobes se regroupent en formant des micelles pour limiter les contacts avec le solvant (Seddon *et al.*, 2004). Les qualités recherchées pour un détergent sont un faible coût, une pureté raisonnable en fonction des études envisagées, sa CMC et une meilleure solubilisation de la protéine membranaire.

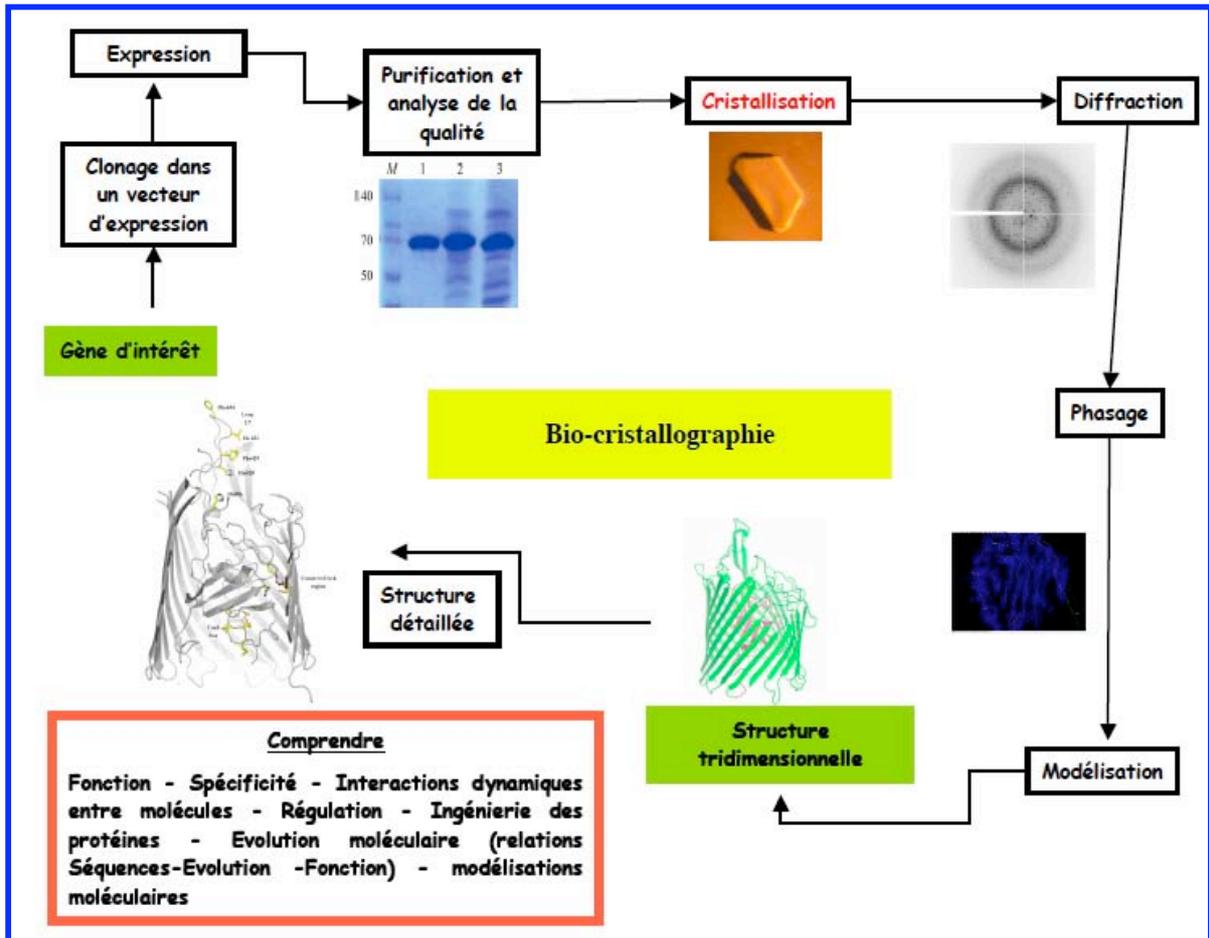


Figure 37 : Du gène à la structure tridimensionnelle détaillée des protéines

Toute étude structurale d'une protéine par cristallographie débute généralement par le clonage, la surproduction et la purification de la protéine d'intérêt. Elle se poursuit par la préparation des cristaux, leur analyse sous les rayons x et l'exploitation des clichés de diffraction pour obtenir la structure tridimensionnelle. Malgré les progrès considérables réalisés aux différents niveaux de la cristallographie, l'écueil principal reste la cristallogénèse.

V.1.1. Contexte et objectifs

Depuis plusieurs années, Schalk et collaborateurs s'intéressent au transport membranaire au travers les membranes internes et externes des bactéries à Gram-négatif par les RTBDs de la membrane externe et par les perméases et transporteurs ABC de la membrane interne. Les structures des RTBDs FpvA (Cobessi *et al.*, 2005a) (Wirth *et al.*, 2007) (Brillet *et al.*, 2007) (Greenwald *et al.*, 2009)) et FptA (Cobessi *et al.*, 2005b) ont été résolues dans le laboratoire sous leurs différentes formes (vides ou en complexe avec les ferri-sidérophores). Le but de cette partie de la thèse a été de définir et d'optimiser un protocole expérimental pour surexprimer, purifier et cristalliser des protéines membranaires appartenant à la classe des RTBDs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à 4 récepteurs :

- FauA : récepteur du ferri-alcaligine de *Bordetella pertussis*
- ShuA : récepteur de l'hème/hémoglobine de *S. dysenteriae*
- FetA : récepteur de la ferri-énantio-pyochéline de *P. fluorescens*
- SuxA : récepteur du saccharose de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

La résolution de la structure tridimensionnelle de ces RTBDs avec et sans ligand pourrait permettre de mieux comprendre les bases structurales et moléculaires de la reconnaissance des ligands, le mécanisme de transport et la transduction du signal au travers de la membrane externe par les RTBDs.

V.1.2. Surexpression

Les RTBDs FauA et ShuA ont été surexprimés dans un système hétérologue (*E. coli* BL21 (DE3)). En revanche, SuxA et FetA ont été surexprimés dans leurs propres systèmes (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *P. fluorescens* Pf-5, respectivement) de manière homologue. La surexpression des protéines membranaires bactériennes dans *E. coli* demeure la méthode de choix ayant donné des résultats très satisfaisants dans de nombreux cas. La composition en lipides et la surface de la membrane disponible pour l'insertion des protéines, sans détérioration des cellules, sont favorables à l'adressage des protéines dans la membrane externe. Les essais de surexpression de SuxA et FetA dans *E. coli* n'ont pas aboutit. Les récepteurs ont été produits et purifiés à partir d'une culture bactérienne en milieu riche.

La purification et la caractérisation de ces protéines recombinantes ont été facilitées par l'insertion d'une étiquette poly-Histidine (poly-His). Les premières constructions testées comportaient une étiquette poly-His à l'extrémité N-terminale.

Dans ce cas, les protéines exprimées s'accumulaient dans la membrane interne. L'insertion de l'étiquette poly-His à l'extrémité N-terminale des RTBDs semble donc empêcher leur adressage dans la membrane externe par accumulation au niveau de la membrane interne. Cette accumulation résulte probablement de l'absence de la reconnaissance du peptide signal du RTBD par le système de sécrétion de la membrane interne due à la position de l'étiquette poly-His juste avant le peptide signal ((Blobel & Dobberstein, 1975) (Bosch *et al.*, 1988)). A l'extrémité C-terminale, en plus du dernier acide aminé aromatique conservé qui serait essentiel au repliement « correct » des RTBDs au niveau de la membrane externe, les 12 derniers résidus forment un brin β probablement impliqué dans l'adressage et le repliement de la protéine dans la membrane externe ((Struyvé *et al.*, 1991) (de Cock *et al.*, 1997)). Des études récentes ont montré que ce motif, constitué de résidus hydrophobes, n'est pas absolument essentiel pour l'insertion des protéines dans la membrane externe (Robert *et al.*, 2006). Sa délétion montre une insertion dans la membrane externe, mais avec une cinétique moindre (Robert *et al.*, 2006). Comme pour FhuA d'*E. coli* (Ferguson *et al.*, 1998b) les constructions utilisées, dans cette étude, comprennent une étiquette poly-His de 5 ou 6 résidus His dans une boucle extracellulaire, en l'occurrence la boucles L5 de ShuA, FauA et FetA et la boucle L4 de SuxA. Avec ces constructions, nous avons montré par immuno-blot que les protéines étaient adressées au niveau des membranes externes.

V.1.3. Solubilisation et purification

Les protéines membranaires doivent être extraites des membranes et solubilisées avant d'être purifiées et cristallisées. Après la lyse des cellules par sonication, les protéines de la membrane interne ont été solubilisées spécifiquement par le sarkozyl (sodium *N-lauroyl*-sarcosine) et éliminées en une seule étape. Les études antérieures menées dans le laboratoire ont montré que l'Octyl-POE (*n-Octyl-PolyOxyEthylène*) solubilise efficacement les RTBDs. L'Octyl-POE est un mélange de détergents possédant une chaîne hydrophile pouvant aller du tétra-oxyéthylène au déca-oxyéthylène. Dans cette étude, nous avons utilisé ce détergent pour solubiliser les récepteurs tout au long de l'extraction des protéines de la membrane externe, mais aussi lors de la purification. Étant sélective, la solubilisation par l'Octyl-POE constitue à ce titre, à elle seule, une étape de purification.

Après extraction et solubilisation des RTBDs, et afin de limiter le nombre d'étapes de purification, nous avons opté pour une purification en deux étapes en utilisant la technique de chromatographie et un système Äkta FPLC (pour *Fast Protein Liquid Chromatography*). Nous avons ainsi effectué : une chromatographie d'affinité sur une colonne d'affinité HisTrap grâce à l'étiquette poly-His et une chromatographie d'échange d'anions sur une colonne HiTrap Q.

Le contenu des fractions recueillies au niveau des pics du chromatogramme a été déposé sur un gel SDS-PAGE à 12% et caractérisé par immuno-blot à l'aide d'anti-corps dirigés contre l'étiquette poly-His. L'analyse du gel a révélé qu'une seule espèce moléculaire est présente dans les fractions recueillies après la chromatographie d'échange d'anions. Cette observation indique que l'Octyl-POE solubilise efficacement les différents RTBDs et que les protéines seraient mono-disperses. À l'issue de la purification, le taux de pureté (estimé sur la base de l'analyse des gels SDS-PAGE) était dans la plupart des cas supérieur à 95%.

V.1.4. Rendement des cultures bactériennes

À la fin de la purification, entre 0,2 mg (FauA) et 3 mg (ShuA) de protéine pure ont été obtenus pour 1 L de culture bactérienne. Ces rendements sont relativement plus élevés par rapport à ceux obtenus avec plus de 20 récepteurs membranaires (en moyenne 1 mg de protéine pour 1 L de culture bactérienne) (Wang *et al.*, 2003). Néanmoins, il reste beaucoup plus faible et loin de ce qui est obtenu en général dans le cas des protéines solubles : jusqu'à 100 mg de protéine pour 1 L de culture bactérienne. Cela s'explique par la surface de la membrane externe limitée pour l'intégration des récepteurs en son sein. En fait, les protéines membranaires sont généralement présentes en faibles quantités dans les membranes biologiques, ainsi il est rare qu'une seule protéine soit majoritaire dans la membrane. Les protéines membranaires ne peuvent donc pas être obtenues en quantités suffisantes depuis leurs sources naturelles et doivent impérativement être surexprimées dans un système recombinant (Drew, 2003). Afin de pouvoir effectuer les essais de cristallogenèse avec le même lot de protéines, nous avons essayé d'améliorer le rendement en protéines. Nous avons effectué des cultures bactériennes avec des temps d'induction longs (16 h en présence de l'inducteur au lieu de 3 h habituellement), cela nous a permis d'améliorer légèrement le rendement : 1 vs 0,7 mg/L pour FetA, et 3,6 vs 3 mg/L pour ShuA.

V.1.5. Choix du détergent

Lors de la cristallisation des protéines membranaires, les détergents ne facilitent pas les expériences de cristallogénèse. Leur présence dans les gouttes de cristallisation provoque des changements de comportement qui perturbent largement les expériences, autant du point de vue de la cristallisation que de la manipulation des cristaux. Le détergent abaisse la tension de surface de la goutte qui change de forme et s'aplatit. Deux gênes sont ainsi provoquées par la faible hauteur de la solution dans la goutte :

D'une part, les cristaux sont limités dans leur croissance sur cette dimension.

D'autre part, ils deviennent beaucoup plus difficiles à prélever et à monter sur les boucles, limitant de ce fait le nombre de cristaux exploitables par goutte.

Le choix du détergent adéquat afin de contrebalancer, en partie, cet effet n'est pas toujours couronné de succès. L'analyse des conditions de cristallisation montre que la plupart des protéines membranaires repliées en tonneaux β cristallisent principalement en utilisant les détergents à chaîne hydrocarbonée comme le C_8E_4 (*n*-octyl-tétraoxyéthylène) et le C_8E_5 (*n*-octyl-pentaoxyéthylène). La plupart des protéines membranaires repliées en hélices α cristallisent en utilisant des détergents à base de sucre comme le *n*-octyl- β -maltoside et le nonyl-glucoside. Par conséquent, en prévoyant le repliement d'une protéine membranaire, par les outils de bio-informatique de prédiction des structures tridimensionnelles, il est possible de choisir les détergents les plus appropriés pour la cristallisation et de réduire ainsi les champs d'investigations. Pour cristalliser les différents RTBDs, nous avons testé trois détergents : le C_8E_4 (CMC \approx 8,5 mM), le C_8E_5 (CMC \approx 9,2 mM) et le *n*-octyl β D-glucoside (OG - CMC \approx 20 mM).

Après purification, les protéines étaient en présence d'Octyl-POE, ce détergent n'est pas adapté aux exigences de la cristallogénèse de point de vue pureté. Pour l'échanger contre ceux qui sont cités ci-dessus, des centrifugations successives ont été effectuées dans un concentrateur *Centricon*. La membrane des concentrateurs ne permet que le passage de particules dont le poids moléculaire est inférieur à 50 kDa. Ainsi, les micelles de détergent d'environ 20 kDa passent au travers de la membrane et seules les micelles mixtes RTBD-détergent d'environ 90 kDa étaient retenues et concentrées.

V.1.6. Cristallisation

La recherche des conditions de cristallisation initiales a été effectuée en utilisant quatre matrices d'échantillonnage (*MbClass suite*, *MbClassII suite*, *The Classic suite* et *The Classic lite* de Qiagen) et trois détergents à différentes concentrations (OG à 1,4% (p/v), C₈E₄ et C₈E₅ à 0,75% (v/v)). Nous avons utilisé la technique de la goutte assise (*sitting drop*) sur des boîtes Greiner (Qiagen) contenant 96 réservoirs et trois puits pour chaque réservoir. Chaque matrice d'échantillonnage comprend 96 conditions différentes (précipitants, additifs et tampons...) correspondant aux conditions le plus fréquemment testées avec succès.

Bien qu'empirique, cette approche de criblage initial permet d'échantillonner systématiquement et rapidement un grand nombre de conditions de cristallisation. En combinant 4 matrices et 3 détergents et en utilisant un robot de cristallisation à nano gouttes « *Cartesian Honeybee* », nous avons testé, pour chaque RTBD, 1152 conditions différentes avec seulement 120 µL de protéine à 10 mg/mL. 80 µL de solution de cristallisation ont été déposés dans les réservoirs, 100 nL de solution de cristallisation et 100 nL de solution protéique dans différents détergents sont déposés dans les puits. Pour les 4 récepteurs, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les matrices *MbClass suite* et *MbClass II suite*. Au terme des essais au robot, les cristaux étaient de petite taille (entre 10 et 50 µM³) et donc très difficiles à « pêcher » et à monter sur les boucles lors de la congélation et/ou de la collecte des données de diffraction. La reproduction des conditions initiales et l'amélioration de la qualité des cristaux, avec des solutions préparées au laboratoire, étaient donc nécessaires. Le but de cette étape était d'ajuster finement les conditions afin de diminuer la germination, d'augmenter la taille des cristaux, d'améliorer leur aspect, d'éliminer les problèmes de macle ou de cristaux collés et surtout d'augmenter l'ordre cristallin afin d'atteindre la plus haute résolution possible lors de la collecte des données. Nous avons utilisé la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise sur des boîtes Linbro (Qiagen) : 24 réservoirs - un puits par réservoir. Cette méthode est la plus utilisée pour la cristallisation des protéines membranaires, et s'avère particulièrement adaptée pour les petits volumes (0,5 à 2 mL). Les optimisations ont été effectuées en faisant varier plusieurs paramètres comme :

- La concentration en protéines, la nature et la concentration du sel et de l'agent précipitant dans la goutte
- Le pH et/ou la nature de la solution tampon

- La température pour certaines conditions lorsque l'apparition des cristaux est rapide, nous avons essayé de faire cristalliser la protéine à 4°C, souhaitant ainsi ralentir la croissance des cristaux et obtenir des cristaux plus gros et de meilleure qualité
- La nature et la concentration des additifs

V.1.7. Collecte des données de diffraction

Tous les jeux de données de diffraction ont été collectées en utilisant le rayonnement synchrotron à l'ESRF ((*European Synchrotron Radiation Facility*) (Grenoble)) sur les lignes BM30A, ID14-1 et ID29, à SOLEIL (Paris) sur la ligne PROXIMA-1 et à BESSY (Berlin) sur la ligne BL14. Les données ont été collectées sur un seul cristal, intégrées et indexées en utilisant XDS (pour *X-ray Detector Software*). Les données de diffraction ont été traitées par le Dr D. Cobessi (Institut de Biologie Structurale, Grenoble).

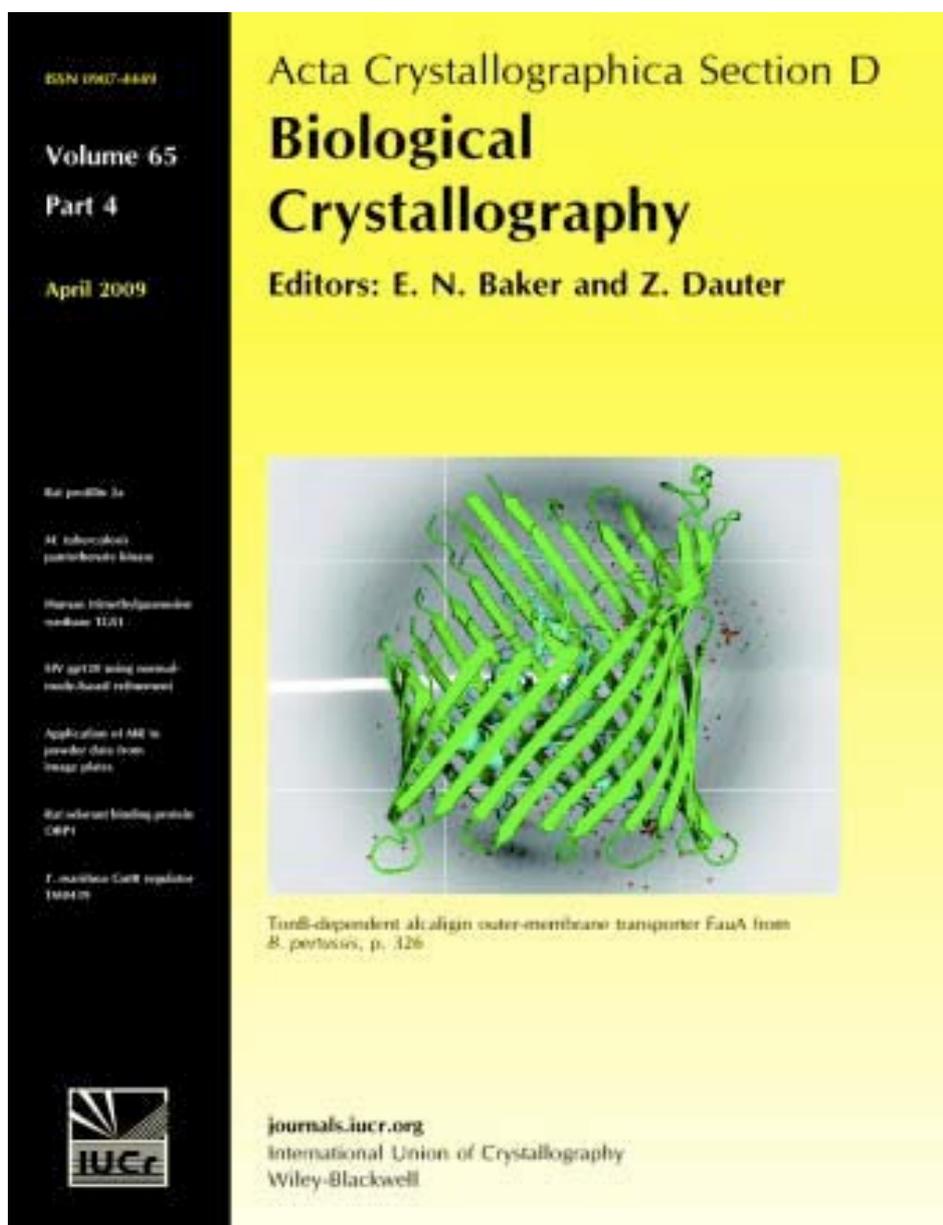
V.1.8. Conclusion et perspectives

En conclusion, un protocole rapide et efficace a été mis en place et optimisé pour la surexpression et la purification en deux étapes des 4 RTBDs. Ce protocole répond aux impératifs de la biologie structurale, il est reproductible et permet d'obtenir une quantité importante de protéines pures, mono-disperses et capables d'interagir avec le ligand bien qu'une étiquette poly-His soit insérée dans une boucle extracellulaire. Des cristaux ont été obtenus avec les quatre protéines dans plusieurs conditions de cristallisation et avec plusieurs détergents. Les différents lots de protéine cristallisent de façon reproductible dans des conditions très similaires. À part SuxA, pour lequel un problème de phasage reste à résoudre, les structures tridimensionnelles des 3 autres RTBDs ont été déterminées sous leurs formes apo. La structure de FauA a été ainsi résolue à 2,3 Å, celle de ShuA à 2,6 Å. Celle de FetA est actuellement en cours d'affinement.

Malgré les efforts importants réalisés ces dernières années, la résolution de la structure des protéines membranaires reste encore un défi. Une méthode universelle et efficace permettant leur production, purification et cristallisation n'existe pas. Cette étude nous a permis, certes, de résoudre la structure de plusieurs RTBDs, il est par contre nécessaire d'augmenter l'efficacité de l'approche utilisée. Pour cela il est impératif de l'étendre à d'autres protéines membranaires et de tester d'autres systèmes d'expression.

Article I

Cet article a été publié en 2009 dans le Journal *Acta Crystallographica section D Biological Crystallography*. Il traite de l'optimisation d'une approche de surexpression, de purification et de cristallisation pour étudier la structure tridimensionnelle des protéines membranaires et la description de la structure de FauA, RTBD de l'alcaligine de *Bordetella pertussis* résolue en suivant cette approche.



Karl Brillet,^a Ahmed Meksem,^{a,b}
Emmanuelle Lauber,^c Cornelia
Reimann^d and David
Cobessi^{a,b*}

^aInstitut Gilbert-Laustriat, UMR7175 CNRS/
Université Louis Pasteur, Strasbourg I,
Département Récepteurs et Protéines
Membranaires, Ecole Supérieure de
Biotechnologie de Strasbourg, BP 10413,
F-67412 Illkirch, France, ^bInstitut de Biologie
Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA–CNRS–
Université Joseph Fourier, 38027 Grenoble,
France, ^cLaboratoire des Interactions Plantes
Micro-organismes (LIPM), UMR CNRS–INRA
2594/441, F-31320 Castanet-Tolosan, France,
and ^dDépartement de Microbiologie
Fondamentale, Université de Lausanne,
Bâtiment Biophore, Quartier UNIL-Sorge,
CH-1015 Lausanne, Switzerland

Correspondence e-mail: david.cobessi@ibs.fr

Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis is the bacterial agent of whooping cough in humans. Under iron-limiting conditions, it produces the siderophore alcaligin. Released to the extracellular environment, alcaligin chelates iron, which is then taken up as a ferric alcaligin complex *via* the FauA outer membrane transporter. FauA belongs to a family of TonB-dependent outer membrane transporters that function using energy derived from the proton motive force. Using an in-house protocol for membrane-protein expression, purification and crystallization, FauA was crystallized in its apo form together with three other TonB-dependent transporters from different organisms. Here, the protocol used to study FauA is described and its three-dimensional structure determined at 2.3 Å resolution is discussed.

Received 14 October 2008

Accepted 16 January 2009

PDB Reference: FauA, 3efm,
r3efmsf.

1. Introduction

The first crystal structure of a membrane protein, the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis*, was solved at 3 Å resolution more than 20 years ago (Deisenhofer *et al.*, 1985). Since then, no more than 400 crystal structures of membrane proteins have been determined (see http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html), while the Protein Data Bank contains more than 50 000 structures of macromolecules (soluble proteins, DNA, RNA, large macromolecular complexes *etc.*). This large difference mainly results from difficulties in obtaining large quantities of pure membrane proteins suitable for crystallization (Loll, 2003). Moreover, crystals of membrane proteins often diffract X-rays poorly.

Gram-negative bacteria are surrounded by two lipid bilayers that reinforce cell impermeability. While small molecules such as ions or sucrose can cross the outer membrane (OM) by passive diffusion through porins, the transport of molecules larger than 600 Da or molecules that are present at low concentrations such as iron, haem, maltose, sucrose, vitamin B₁₂ or nickel (Schauer *et al.*, 2008) takes place *via* TonB-dependent transporters (TBDTs) using energy derived from the proton motive force of the inner membrane. This is achieved through an interaction between the TonB periplasmic part of the inner membrane energy-transducing complex TonB–ExbB–ExbD and the so-called TonB box of the TBDT, a conserved sequence located at its N-terminus (Wiener, 2005). The molecular mechanisms of transport and the signal transduction necessary for energy transfer are still unknown. A genome survey revealed that more than 70% of all Gram-negative bacteria have genes for TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007) and many species can express several TBDTs (Blanvillain *et al.*, 2007). In order to better understand the molecular mechanisms of these transporters, we undertook

crystallographic studies of FpvA and FptA, which are required for siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa* (Cobessi, Celia, Folschweiller *et al.*, 2004, 2005; Cobessi, Celia & Pattus, 2004, 2005). Their structure consists of a C-terminal domain that folds into a 22-stranded transmembrane β -barrel which is filled by a so-called plug domain. The structures of the *P. aeruginosa* TBDTs thus resemble those of all other crystallized TBDTs involved in siderophore uptake (Ferguson, Hofmann *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2002; Locher *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999, 2007) and vitamin B₁₂ uptake (Chimento *et al.*, 2003).

As part of our efforts towards understanding the crystallization of membrane proteins and membrane transport across the outer membrane of Gram-negative bacteria, we developed a strategy from cloning to crystallization in order to facilitate the production, purification and crystallization of TBDTs. This easy handling protocol developed for TBDTs could probably be applied to other membrane proteins from Gram-negative and Gram-positive bacteria. Our strategy overcomes the bottlenecks of structural studies on membrane proteins, allowing us to collect X-ray data for all the selected targets: the alcaligin TBDT from *Bordetella pertussis*, the sucrose TBDT from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the enantio-pyochelin TBDT from *P. fluorescens* and the haem TBDT from *Shigella dysenteriae*. These four TBDTs share between 14.4% (SuxA/ShuA) and 24.9% (FauA/FetA) sequence identity. Here, we mainly detail the protocol used to study the alcaligin outer membrane transporter FauA from *B. pertussis*, for which we solved the three-dimensional structure at 2.3 Å resolution. *B. pertussis* is a Gram-negative human pathogen that inhabits the respiratory mucosa and produces the macrocyclic dihydroxamate siderophore alcaligin to acquire iron (Brickman & Armstrong, 1999). After binding to iron(III), the ferric alcaligin is translocated across the outer membrane by FauA.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

DNA manipulations were carried out in *Escherichia coli* Top10 [*F*⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG*] and FauA was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) [*F*⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻m_B⁻)* *gal* *dcm* (DE3)].

2.2. Expression vector

The DNA encoding FauA from *B. pertussis* (without the 35-residue signal sequence) was amplified by PCR. The forward primer of the first fragment F1 (5'-GTCAGATATCCAGG-AAGCGCGAACG-3') contained the complementary part for an *EcoRV* site (underlined) and codons for residues 36–40 of the mature FauA protein (bold). The reverse primer (5'-GCTAGGATCCGCGCGCGCCAGTC-3') for F1 contained a *Bam*HI site (underlined) and anticodons for residues 423–427 of mature FauA (bold). The forward primer of the second fragment F2 (5'-GATCGGATCCCATCACCATCATCACC-

ATCACATCCAAGAGCCCAGC-3') contained a *Bam*HI site (underlined) that introduces two residues GS, a DNA sequence encoding a His₆ tag (italicized) and codons for residues 428–433 of the mature FauA protein. The reverse primer F2 (5'-GTCAAAGCTTTCAATACTGCGCCCGCA-A-3') contained a *Hind*III site (underlined), a stop anticodon (italicized) and anticodons for residues 730–734 of the mature FauA. The PCR products were cloned in pET20b (Novagen). *E. coli* Top10 cells were transformed with the resulting expression plasmids pET20b-FauAF1 and pET20b-FauAF2. All cloning steps were verified by DNA sequencing at the IGBMC facility, Illkirch, France.

The FauAF2 fragment was removed from plasmid pET20b-FauAF2 and introduced into pET20b-FauAF1 using *Bam*HI and *Hind*III restriction sites. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the resulting construct. Thus, this construct encodes a protein in which the native *B. pertussis* signal peptide is replaced by the native N-terminal *pelB* signal sequence of *E. coli* to target FauA into the outer membrane. The His₆ tag in loop L5 allowed rapid purification of the FauAH6L5 protein.

2.3. Expression and purification

E. coli BL21 (DE3) expressing FauAH6L5 was isolated on Luria Bertani–ampicillin (LB–ampicillin; 100 μ g ml⁻¹ ampicillin) plates and a 35 ml LB–ampicillin preculture was grown overnight at 310 K and 220 rev min⁻¹. The subculture was then used to inoculate a 1 l LB–ampicillin culture, which was incubated for another 2 h until the optical density (OD₆₀₀) reached 0.6. Expression of the recombinant protein was induced by adding 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 310 K. After 3 h, the cells were harvested by centrifugation for 20 min at 10 000g.

The bacterial pellets were resuspended in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and disrupted by two sonication steps. The membrane pellet was deposited on a four-step sucrose gradient and centrifuged overnight at 188 000g (Beckman SW41 rotor) to observe the location of the TBDTs in the membranes. The different parts of the gradient were deposited on an SDS gel to separate the proteins before Western blotting. FauAH6L5 was purified after incubation of the membranes with 1% (w/v) sodium *N*-lauroylsarcosine, which led to solubilization of the cytoplasmic membranes. Intact outer membranes containing FauAH6L5 were pelleted by centrifugation at 125 000g for 40 min in a Beckman Ti45 rotor. To extract FauAH6L5, the pellet of outer membranes was solubilized at room temperature with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 7% (v/v) octylpolyoxyethylene (octyl-POE; Bachem) and subsequently centrifuged at 117 000g for 20 min in a Beckman Ti70 rotor. The supernatant was applied onto a HisTrap column (Amersham) equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole and 1% octyl-POE. The protein was eluted with a linear gradient of 20–500 mM imidazole in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 1% octyl-POE. The fractions containing FauAH6L5, as determined by SDS–PAGE, were pooled, concentrated and dialyzed against 50 mM Tris–HCl

pH 8.0 and 1% octyl-POE by ultrafiltration and loaded onto a HiTrapQ column (Amersham) equilibrated in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE. FauAH6L5 was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE.

2.4. Crystallization experiments

The pure fractions containing FauAH6L5 were pooled and dialyzed against 10 mM Tris–HCl pH 8.0 and either 0.75% C₈E₄, 0.75% C₈E₅ (Bachem) or 1.4% β-octylglucoside (Anatrace). The initial crystallization experiments were performed using a Cartesian Honeybee system at SBGP (Illkirch, France) by mixing 100 nl protein solution at a protein concentration of 10 mg ml⁻¹ with 100 nl crystallization solution. The MbClass Suite, MbClass II Suite, Classics Suite and Classics Lite Suite from Qiagen were tested with the three detergents. Optimizations of the crystallization conditions were performed in Linbro plates using the sitting-drop vapour-diffusion method at 293 K.

2.5. Data collection

Diffraction data were initially collected using synchrotron radiation on BM30A at the ESRF (Roth *et al.*, 2002) at 3 Å resolution using an ADSC Q315r CCD detector ($\lambda = 0.9797$ Å). The resolution was extended to 2.3 Å on PROXIMA-1 at SOLEIL using a MAR flat panel ($\lambda = 0.9789$ Å). In both cases the data were collected using one crystal at 100 K and were integrated and scaled using *XDS* (Kabsch, 1993).

2.6. Structure resolution

The phase problem was solved by molecular replacement using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 1997) from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) with FpvA (Brillet *et al.*, 2007) as a molecular model after replacing the nonconserved residues by alanine residues and after removing non-aligned parts of the sequences. The first model was refined using the data collected on BM30A at 3 Å resolution and the model was then rebuilt at 2.3 Å resolution using *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004) and refined by energy minimization and molecular dynamics using *CNS_SOLVE* 1.2 (Brünger *et al.*, 1998) and by restrained maximum-likelihood

least-squares techniques in *REFMAC* 5.2 (Murshudov *et al.*, 1997) from the *CCP4* suite (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). At the end of the refinement, water molecules and sulfate ions were added and a simulated-annealed composite $3F_o - 2F_c$ electron-density map was calculated using *CNS_SOLVE* to check the model. The model was also checked using *PROCHECK* and *WHATCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993; Hoofst *et al.*, 1996).

3. Results and discussion

3.1. Construction and analysis of the expression plasmid

To overexpress FauA in *E. coli*, we used pET20b, which codes for the *E. coli* signal peptide PelB required for targeting heterologous proteins to the outer membrane. As we were working on several TBDTs, we first inserted the His₆ tag into the N-terminal part of one particular TBDT. However, Western blot analysis of inner and outer membrane fractions obtained by ultracentrifugation on a sucrose gradient revealed that the overexpressed TBDT had accumulated in the inner membrane (data not shown). This accumulation probably resulted from nonrecognition of the signal peptide by the inner membrane secretion system owing to the presence of the His₆ tag inserted immediately downstream. We thus decided to insert the His₆ tag into one of the extracellular loops, *i.e.* loop L5, following the cloning protocol described for the FauA receptor in §2. FhuA was also cloned with a His tag inserted in an extracellular loop (Ferguson, Breed *et al.*, 1998). After 3 h of overexpression at 310 K, most of the protein was found in the *E. coli* outer membrane (Fig. 1). The other TBDT expression plasmids, which will be described elsewhere, were therefore constructed in a similar way, *e.g.* by inserting the His₆ tag into one of the extracellular loops.

3.2. Obtaining large quantities of membrane proteins

In order to limit the number of purification steps, we purified the TBDTs by a two-step procedure only, *i.e.* affinity and anion-exchange chromatography; an additional gel-filtration step did not improve the crystallization conditions. Using this two-step approach, we obtained pure TBDTs with a yield of 0.2–3.6 mg per litre of bacterial culture. Although the yield of FauA was only 0.2 mg per litre of culture, this amount was sufficient to test hundreds of crystallization conditions by mixing small volumes of the protein with identical volumes of crystallization solutions.

3.3. Crystallization and data collection

A survey of crystallization conditions for membrane proteins (<http://site.voila.fr/d.cobessi/MPR.html>) showed that most of the membrane proteins that fold in β-barrels crystallize using C₈E₄, C₈E₅ or β-octylglucoside as detergents, whereas most of the membrane proteins with a transmembrane domain that folds in α-helices crystallize using sugar-based detergents. Therefore, by predicting the fold of the transmembrane domain, we can probably select the most suitable detergent for crystallization. We used three different

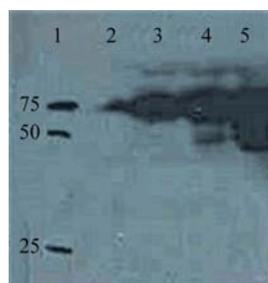


Figure 1 Induced expression of one selected TBDT in *E. coli*. Membrane fractions from induced cells were prepared as described in §2 and identified by Western blot analysis using a monoclonal antipolyhistidine antibody (Sigma): lane 1, ladder (kDa); lane 2, supernatant; lane 3, inner membrane; lane 4, intermediate fraction; lane 5, outer membrane.

Table 1

Number of crystallization conditions of FauA obtained using three detergents and four sparse matrices.

	Classes Suite	Classes Lite Suite	MbClass Suite	MbClass II Suite
0.75% C ₈ E ₄	1	5	6	8
0.75% C ₈ E ₅	1	5	5	5
1.4% β -OG	0	0	0	0

detergents with different critical micelle concentrations. By combining two to four sparse matrices with three detergents, we tested 576–1152 crystallization conditions using only 30–60 μ l purified protein at a concentration of 10 mg ml⁻¹. The best results for FauA were obtained using the MbClass Suite and MbClass II Suite sparse matrices (Table 1) and 0.75% C₈E₄ or C₈E₅. No crystals were obtained with β -octylglucoside, whereas more than ten successful crystallization conditions were obtained using the MbClass Suite or MbClass II Suite sparse matrices with C₈E₄ or C₈E₅. After optimizing the crystallization conditions for FauA, we obtained crystals that were suitable for X-ray studies using 10 mg ml⁻¹ FauA in 0.75% C₈E₄ mixed with an equal volume of 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.3–0.5 M ammonium sulfate and 13–17% MPD. The crystals grew slowly, reaching their maximal size in one week. The FauA crystals were frozen in a solution containing a higher MPD concentration or in the same solution with 20% glycerol. Data were first collected on BM30A at the ESRF and subsequently on PROXIMA-I at SOLEIL at 2.3 Å resolution. The high brightness of this beamline allowed us to collect data to a higher resolution than on BM30A using small crystals of membrane protein, typically 0.1 \times 0.05 \times 0.05 mm in size (Fig. 2 and Table 2). Systematic absences ($2n + 1$) were observed for the 00*l* reflections, resulting from the presence of a 2₁ axis. The crystals belonged to space group C222₁, with unit-cell parameters $a = 165.89$, $b = 188.85$, $c = 62.44$ Å.

3.4. The FauA structure and structure quality

FauA is a 77.6 kDa TBDT (699 residues in the mature protein) and 572 residues were rebuilt in the 3*F*_o – 2*F*_c electron-density map. Several extracellular loops (loops L2, L3, L4, L5, L10 and L11) as well as residues of the TonB box and the N-terminal part were not observed in the electron-density map (see below). Similar to the structure of other TBDTs (Krewulak & Vogel, 2008), FauA can be divided into two domains: a 22-stranded antiparallel transmembrane β -barrel (Phe161–Tyr652) which is filled by an N-terminal plug domain (Glu21–Glu160) (Fig. 3). The r.m.s. deviations calculated using *MSDFold* (Krissinel & Henrick, 2004) range from 1.40 Å (FauA/FptA) to 2.47 Å (FauA/FepA). The main differences are in the length and orientation of the extracellular loops and in the N-terminal part of the plug domain containing the TonB box. 136 water molecules and two sulfate ions from the crystallization conditions were unambiguously identified in the electron-density map. A strong positive peak of electron density was observed close to His288 and Asp290 just up to the girdle of aromatic residues delineating the outer

Table 2

X-ray data statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

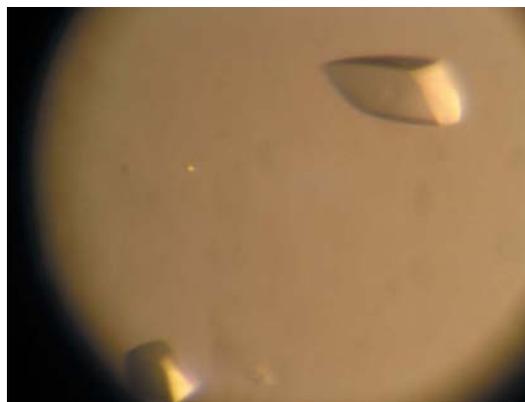
	BM30A	PROXIMA-1
Wavelength (Å)	0.9797	0.9789
Resolution (Å)	43.9–3.00 (3.05–3.00)	29.42–2.33 (2.40–2.33)
Space group	C222 ₁	C222 ₁
Unit-cell parameters (Å)	$a = 163.195$, $b = 190.051$, $c = 62.254$	$a = 165.893$, $b = 188.847$, $c = 62.437$
Total reflections	103798 (2995)	308340 (25960)
Unique reflections	19495 (871)	42320 (3521)
Completeness (%)	98.0 (93.5)	99.8 (100)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.71 (2.11)	19.88 (2.92)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	12.0 (62.5)	6.6 (72.4)

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of the measured reflection and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean intensity of this reflection.

leaflet of the outer membrane. Its position suggests that it could be a phosphate group from a lipid. One molecule is present in the asymmetric unit and symmetry-related FauA molecules interact *via* their hydrophilic parts. The crystals are type II membrane-protein crystals (Michel, 1983) and contain 60.5% solvent. A high solvent content is one of the characteristics of type II membrane-protein crystals. At the end of the refinement, the R and R_{free} values (Brünger, 1992) were 21.9% and 25.8%, respectively. The B -factor average was 45.4 Å² for the main chain and 45.9 Å² for the overall structure (Table 3).

3.5. Flexibility in FauA and other TBDTs

Only five extracellular loops were observed in the 3*F*_o – 2*F*_c electron-density map. The β -strands of the barrel are connected by long extracellular loops in TBDTs. The length of these loops and their amino-acid content could probably result in flexibility of the loops, as observed in CirA (Buchanan *et al.*, 2007), FepA (Buchanan *et al.*, 1999) and apo BtuB (Chimento *et al.*, 2003). Moreover, the absence of ferric alcaligin or apo alcaligin bound in the binding pocket at the extracellular face of FauA could increase the flexibility of the binding site and extracellular loops, whereas in apo FhuA, FecA or FpvA the loops are observed in the electron density (Locher *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 2003; Cobessi, Celia, Folschweiller *et al.*, 2005). In

**Figure 2**

FauA crystals. Their size is 0.1 \times 0.05 \times 0.05 mm.

apo FauA, no electron density corresponding to the TonB box is observed. In the crystal structures of apo TBDTs (BtuB, FecA, FpvA, FhuA and CirA) or those bound to their cognate empty siderophore (FecA and FpvA), residues of the TonB box are observed in the electron density. In all the TBDT structures, iron–siderophore binding leads to a conformational change in the N-terminus and flexibility of the TonB box. This flexibility is probably important for interactions with the inner membrane protein TonB. Indeed, the number of TBDTs in the outer membrane is higher than the number of TonB proteins in the inner membrane. The flexibility of the TonB box could thus increase the probability of interactions between the two proteins. The flexibility of the TonB box is an inherent characteristic of TBDTs, including FauA, and does not depend on the ligand-binding status of the transporter. If interactions were to occur between TonB and empty TBDTs, they could lead to energy loss since no membrane transport would occur. Therefore, combined with the increase in flexibility of the

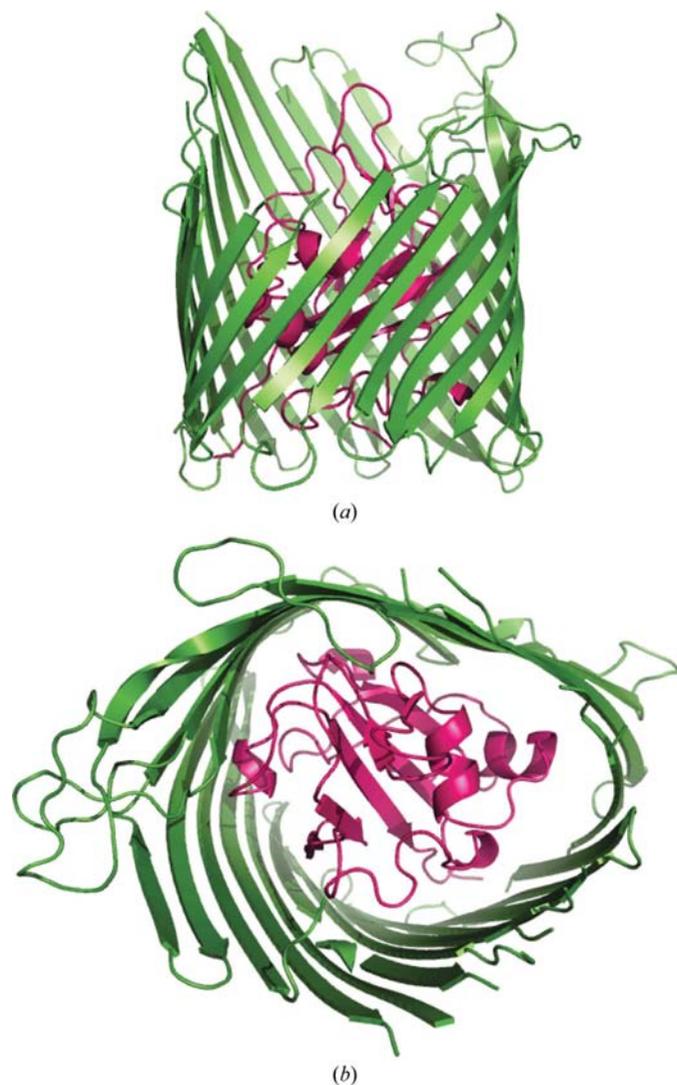


Figure 3
Overall structure of FauA. The plug and the barrel are coloured pink and green, respectively. (a) FauA viewed as in the outer membrane, with the extracellular loops at the top and the region exposed to the periplasm at the bottom of the figure. (b) View along the β -barrel.

Table 3
Refinement and model statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.	
Resolution range (\AA)	29.35–2.33 (2.39–2.33)
No. of reflections used for R_{cryst} calculation	40176 (2897)
No. of reflections used for R_{free} calculation	2141 (144)
Data cutoff $F/\sigma(F)$	0.0
$R_{\text{cryst}}^{\dagger}$ (%)	21.89 (26.90)
$R_{\text{free}}^{\dagger}$ (%)	25.84 (36.30)
No. of non-H protein atoms	4384
No. of sulfate ions	2
Mean B factor, protein main-chain atoms (\AA^2)	45.28
Mean B factor, protein side-chain atoms (\AA^2)	46.42
Ramachandran plot	
Residues in most favoured regions (%)	90.4
Residues in additionally allowed regions (%)	8.2
Residues in generously allowed regions (%)	0.4
Residues in disallowed regions (%)	1.0
R.m.s. deviations from ideal geometry	
Bond lengths (\AA)	0.015
Bond angles ($^{\circ}$)	1.565

$\dagger R_{\text{cryst}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} (Brünger, 1992) is the same as R_{cryst} but calculated for $n\%$ of data omitted from the refinement; n was 5.1% for FauA.

TonB box after ligand binding at the extracellular face, other parts of the TBDTs are probably important for the signal transduction necessary to obtain the energy required for transport. These could include the extracellular loops and the apex of the plug, which undergo conformational changes upon iron–siderophore binding as observed in FpvA, FhuA or FecA. Together, these conformational changes could favour the energy transfer for transport across the outer membrane. Energy transfer may result in partial or total dislocation of the plug to create sufficient space in the lumen of the β -barrel for the passage of large molecules such as the iron–alcaligin complex.

Our customized cloning-to-crystallization protocol for TonB-dependent outer membrane transporters was used to successfully crystallize FauA, the ferric alcaligin receptor of *B. pertussis*, and to solve its three-dimensional structure at high resolution. This approach could be applied to other membrane proteins since the insertion of the His₆ tag in an extracellular hydrophilic loop should not interfere with the secretion process required for protein insertion into the membrane lipid bilayer. A rational design of crystallization experiments using small amounts of membrane proteins purified by a simplified two-step procedure allowed us to find conditions under which crystals suitable for X-ray diffraction could be obtained. Following this expression, purification and crystallization protocol, we also obtained crystals and X-ray diffraction data for three other selected TBDTs (ShuA, SuxA and FetA). Phasing and optimization of the crystallization conditions to reach the highest resolution limits are in progress. Together, these studies will lead to a better understanding of transport and signal transduction across the outer membrane by TBDTs and improve the crystallization methodology of membrane proteins in general.

We thank Sandra Armstrong from the Department of Microbiology, University of Minnesota, Minnesota, USA for

V.2. Structure de ShuA, récepteur de l'hème/hémoglobine de *Shigella dysenteriae*

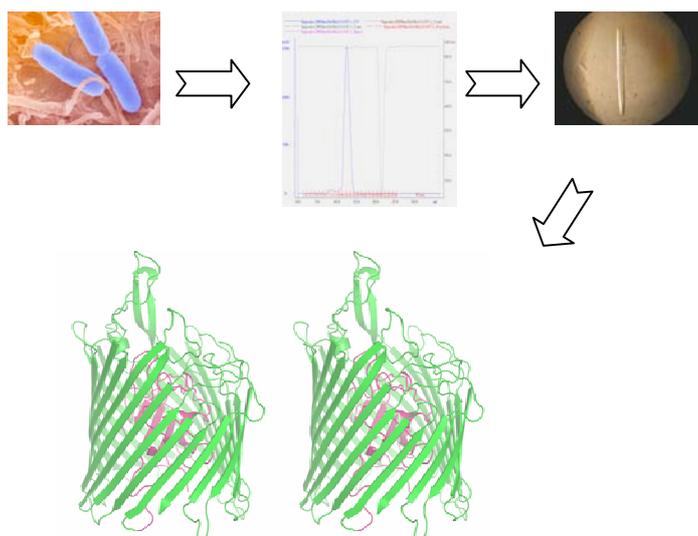
- V.2.1. Contexte et objectifs
- V.2.2. Surexpression et purification
- V.2.3. Cristallogénèse
- V.2.4. Collecte des données de diffraction
- V.2.5. Traitement des données de diffraction et phasage
- V.2.6. Analyse de la structure
- V.2.7. Fixation et transport de l'hème
- V.2.8. Conclusion et perspectives

Article II

Brillet, K., **Meksem, A.**, Thompson, A. & Cobessi, D. (2009). **Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*.** *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65 (Pt 4)** 402-5.

Article III

Cobessi, D., **Meksem, A.** & Brillet, K. (2010). **Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism.** *Proteins*. **78(2)** 286-94.



V.2.1. Contexte et objectifs

Les *Shigella* sont des bactéries pathogènes pour l'homme et les autres primates. *Shigella* est responsable de la dysenterie bacillaire appelée aussi « shigellose » (Sansone, 2006). Cette pathologie est répandue dans le monde entier, mais elle sévit essentiellement dans les régions aux conditions d'hygiène précaires où elle est endémique toute l'année avec des poussées épidémiques à certaines saisons ou lors de désastres humanitaires. Dans les pays tropicaux en voie de développement, la shigellose associée à la malnutrition est responsable d'une forte morbidité et mortalité. La shigellose n'est pas la plus fréquente des maladies diarrhéiques, mais, dans sa forme typique dysentérique, est sans aucun doute la plus sévère. On estime chaque année à 140 millions le nombre de cas de shigellose, parmi lesquels 60 % surviennent chez les enfants de moins de 5 ans. Les shigelloses tuent chaque année entre 600 000 et 1 million de personnes dans le monde (Bennish & Wojtyniak, 1991). Lors de l'infection, les shigelles envahissent les cellules épithéliales intestinales puis le tissu constituant la muqueuse recto-colique. Ce processus aboutit très rapidement à une intense inflammation avec une sévère destruction tissulaire, provoquant des évacuations sanguinolentes et de pus accompagnées de coliques violentes (Sansone, 2001). Les bactéries du genre *Shigella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, elles sont toujours immobiles, auxotrophes et non-gazogènes. Classiquement, le genre *Shigella* est divisé en 4 espèces sur la base des caractères biochimiques et antigéniques : *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. dysenteriae* (Ewing, 1986). Les espèces les plus importantes sont *S. flexneri*, responsable des formes endémiques et *S. dysenteriae*, responsable des épidémies brutales et graves (Niyogi, 2005). *S. dysenteriae* possède plusieurs systèmes de transport du fer, incluant la synthèse et le transport de l'entérobactine (système Ent) et de la salmochéline (système Iro), le transport du ferrichrome (système Fhu), du fer ferreux (systèmes Feo et Sit (Runyen-Janecky *et al.*, 2003)) et le système d'acquisition de l'hème (Shu) (Payne *et al.*, 2006). Le système Shu permet à *S. dysenteriae* de se développer dans des environnements où l'hème est la seule source de fer, notamment chez l'hôte mammifère (Mills & Payne, 1995). Le système Shu (pour *Shigella heme uptake*) comprend :

- Un récepteur de la membrane externe appartenant à la classe des RTBDs qui lie l'hème ou hémoglobine et transporte activement de manière TonB-dépendante l'hème : ShuA (Mills & Payne, 1997).
- Une protéine périplasmique affine qui prend en charge l'hème dans le périplasme : ShuT (Wyckoff *et al.*, 1998).

- Une perméase-ATPase de la membrane interne assurant le transport de l'hème dans le cytoplasme à travers la membrane interne : ShuUV (Wyckoff *et al.*, 1998).
- Une protéine cytoplasmique liant l'hème et intervenant dans sa dégradation cytoplasmique par l'hème oxygénase : ShuS (Wilks, 2001).

Les bases moléculaires de la reconnaissance de l'hème par ce type de récepteur sont inconnues. Cette partie du travail de thèse traite de la résolution de la structure tridimensionnelle du RTBD ShuA.

V.2.2. Surexpression et purification

La protéine ShuA native a été surexprimée dans *E. coli* BL21 (DE3). La protéine ShuA[SeMet] a été produite dans la souche *E. coli* B834 auxotrophe pour la Met cultivée dans un milieu succinique complétement avec de la L-SeMet. Ainsi, il a été possible de substituer les 14 Met de ShuA par des SeMet et de pouvoir résoudre la structure en utilisant la méthode de la diffusion anormale à plusieurs longueurs d'ondes. La protéine a été purifiée en deux étapes en suivant le protocole décrit précédemment. De façon remarquable, la présence de l'étiquette poly-His sur la boucle L5 n'a pas empêché la formation d'un complexe ShuA-hème *in vitro*.

V.2.3. Cristallogénèse

La forme apo de ShuA a été cristallisée dans plusieurs conditions de cristallisation avec différents détergents. En dépit des nombreuses tentatives, les essais de cristallisation de ShuA avec l'hème ou l'hémoglobine n'ont jamais abouti. Les cristaux présentant la meilleure qualité de diffraction sont obtenus à 20 °C, en utilisant la méthode de diffusion de vapeur en goutte assise en mélangeant 0,5 µL de protéine concentrée à 10 mg/mL avec 0,5 µL de la solution de cristallisation comprenant : **un précipitant** (PEG de différents poids moléculaires : PEG 400, 1000, 2000, 2000MME, 3350 ou 4000), **un sel** (NaCl ou LiCl) et **un tampon** (HEPES, MES ou MOPS à pH 6,5-7,5). Le volume de la solution de cristallisation dans le réservoir était de 500 µL. ShuA[SeMet] avait cristallisé dans les mêmes conditions que ShuA, mais uniquement en présence d'un agent réducteur (DTT, acide ascorbique ou acide citrique) et d'un chélateur de métaux (EDTA) qui empêcheraient probablement l'oxydation des séléniums de la protéine. Afin de rendre les conditions de cristallisation cryogéniques, des essais de cristallogénèse en présence d'agents cryogéniques ont été réalisés en utilisant du glycérol, de l'éthylène glycol, du saccharose et du MPD (2-Methyl-2,4-Pentane

Diol). L'introduction d'atomes lourds a été réalisée par co-cristallisation. Les sels d'atomes lourds ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, EuCl_3 , TbCl_3 , KBr ou I_2) ont été ajoutés à la solution de protéines avant sa cristallisation en quantité suffisante (5 à 10 équivalents d'atomes lourds pour un équivalent de protéine) afin que toutes les molécules protéiques soient chargées en atomes lourds. En se mettant entre les molécules protéiques dans le cristal, les atomes lourds ont amélioré la qualité des cristaux de ShuA et ShuA[SeMet] et ils ont augmenté le pouvoir diffractant des cristaux de ShuA. En fait, les atomes lourds renforcent les contacts cristallins, stabilisent les protéines dans le cristal et diminuent ainsi le désordre cristallin à l'origine de la qualité médiocre des cristaux et de leur faible pouvoir diffractant.

V.2.4. Collecte des données de diffraction

Tous les jeux de données de diffraction utilisés pour résoudre la structure de ShuA ont été collectés, en utilisant le rayonnement synchrotron, à l'ESRF (Grenoble) sur les lignes BM30A et ID29 et à SOLEIL (Paris) sur la ligne PROXIMA-1. Les données ont été collectées sur un seul cristal, intégrées et indexées en utilisant XDS.

V.2.5. Traitement des données de diffraction et phasage

Les premiers cristaux de ShuA ont diffracté les rayons x à 3,4 Å de résolution sur la ligne BM30A de l'ESRF. La carte de densité électronique calculée en utilisant ces données et la méthode du remplacement moléculaire était ininterprétable. Le problème de phases a été résolu dans un premier temps par la méthode SAD (pour *Single-wavelength Anomalous Dispersion*) en utilisant les données collectées à 2,6 Å avec un cristal « dérivé » ShuA-Pb (ligne PROXIMA-1 de SOLEIL, Paris). Le modèle construit n'était pas complet et la plupart des chaînes latérales des acides aminés de la protéine n'ont pas été placées dans la densité électronique. Il a été alors nécessaire de recourir à la méthode de phasage par MAD (pour *Multi-wavelength Anomalous Dispersion*) en utilisant des cristaux « substitués » ShuA[SeMet]. Les phases ont donc été calculées en utilisant des données collectées à 3,2 Å avec un cristal ShuA[SeMet] (ligne ID29 de l'ESRF, Grenoble). Elles étaient de bonne qualité et la carte de densité électronique était exploitable. Le modèle a donc été construit à 3,2 Å avec les données collectées en utilisant un cristal ShuA[SeMet], puis affiné avec les données collectées à 2,6 Å en utilisant un cristal ShuA-Pb.

V.2.6. Analyse de la structure

La structure de la forme apo de ShuA a été résolue à 2,6 Å en utilisant plusieurs jeux de données de diffraction. Une molécule était présente dans l'unité asymétrique. Les cristaux de ShuA contiennent environ 65% de solvant, ce sont des cristaux de protéine membranaire de type II (Ostermeier & Michel, 1997). Les cristaux de type II sont fréquemment obtenus lors de l'étude structurale des protéines membranaires (Ostermeier, 2003). Dans ce type de cristal, les protéines interagissent par leurs régions hydrophiles. Dans le cas de ShuA, ses interactions impliquent principalement les boucles extracellulaires et à un degré moindre les coudes périplasmiques. Les régions hydrophobes faisant partie des micelles de détergent, aucune interaction hydrophobe ne peut avoir lieu entre les protéines. Le gène *shuA* encode pour un pré-récepteur de 660 acides aminés tandis que sous sa forme mature, ShuA, de poids moléculaire 69.5 kDa est composé de 632 acides aminés. ShuA adopte le même repliement tridimensionnel que les autres RTBDs en deux domaines distincts (Krewelak & Vogel, 2007). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, on trouve le bouchon (**Thr1-Gln135**) suivi du tonneau β (**Ser136-Trp632**) comportant 22 brins β transmembranaires antiparallèles. Au début de la séquence du domaine bouchon, se retrouve la boîte TonB (Met4-TVTAT-Gly10) (**figure 38**). La densité électronique correspondant à la boîte TonB étant clairement identifiable, les chaînes latérales des acides aminés constitutifs ont pu être attribuées. La boîte TonB était enfouie à l'intérieur du tonneau β, cela suggère qu'elle ne peut pas interagir avec la protéine TonB de la membrane interne sans qu'elle subisse des changements de conformation et indique que la fixation de l'hème à la face extracellulaire du récepteur s'accompagne d'un changement de conformation de la partie N-terminale. Cela a été observé notamment chez *E. coli*. Lorsque FhuA lie le ferrichrome, la partie N-terminale de la protéine subit d'importants changements de conformation ((Ferguson *et al.*, 1998a) (Locher *et al.*, 1998)). Ces observations ne sont pas compatibles avec les résultats obtenus dans des essais biochimiques *in vitro*, qui montrent une interaction entre la protéine TonB et ShuA sous sa forme apo (Burkhard & Wilks, 2008). Les interactions observées seraient ainsi non spécifiques. Bien que les pourcentages d'identité de séquence entre les RTBDs soient faibles, leurs structures sont superposables (Krewelak & Vogel, 2007).

Les valeurs de déviations standard calculées entre les positions des atomes de carbone α varient de 1,75 Å (ShuA comparée avec BtuB) à 2,2 Å (ShuA comparée à FpvA). Les principales différences résident dans la longueur et l'orientation des boucles extracellulaires et

au niveau de la boîte TonB. Cela suggère que le repliement des RTBDs est identique quels que soient le ligand transporté et la bactérie. 621 des 632 résidus de ShuA ont été observés dans la densité électronique, 602 chaînes latérales ont été attribuées pour 621 d'entre eux.

Aucune densité électronique correspondant aux boucles extracellulaires L4, L5 et L10 n'a été observée dans la carte de densité électronique à cause de leur flexibilité et-ou de l'absence du ligand. Cette flexibilité a été observée dans les structures cristallines de plusieurs RTBDs tels que BtuB (Chimento *et al.*, 2003), CirA (Buchanan *et al.*, 2007), FepA (Buchanan *et al.*, 1999), FauA (Brillet *et al.*, 2009) et FptA (Cobessi *et al.*, 2005a).

Le site de reconnaissance et d'interaction avec l'hème n'a pas été observé dans la structure de ShuA. Par contre, l'analyse de l'interface bouchon-tonneau révèle la présence de plusieurs cavités, deux d'entre elles (les cavités périplasmique et extracellulaire) ne sont séparées que par une boucle intracellulaire, en l'occurrence, la boucle constituée des résidus Arg43-His44-Val45-Pro46-Gly47. La cavité extracellulaire est isolée du milieu extérieur par la boucle extracellulaire L11.

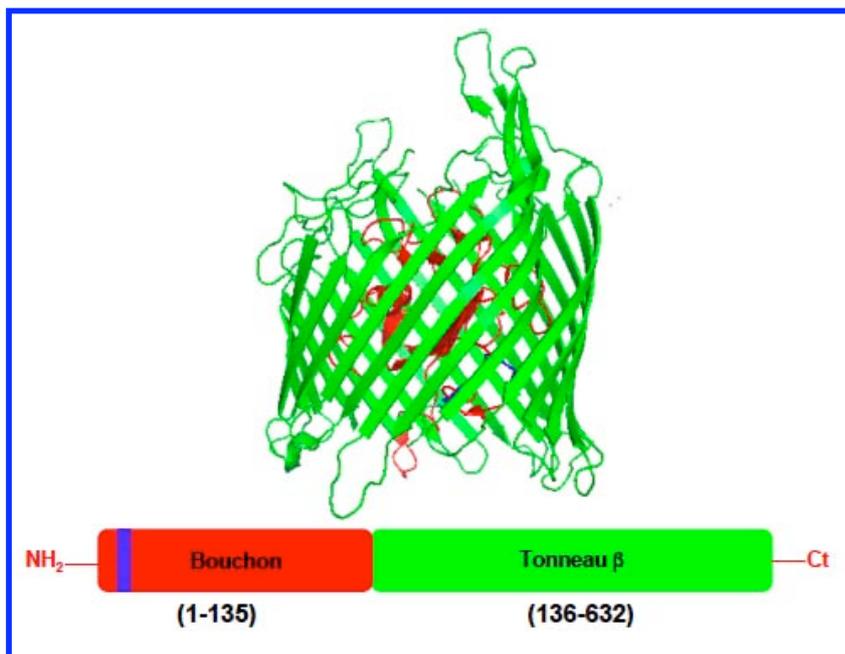


Figure 38 : Structure de ShuA à 2,6 Å

ShuA comporte un domaine C-terminal de 22 brins β antiparallèles liés par des boucles extracellulaires et des coudes périplasmiques, et un domaine N-terminal (bouchon) inséré dans le tonneau. Aucun site de liaison préformé n'a été observé dans la structure de ShuA.

V.2.7. Fixation et transport de l'hème

L'analyse de la structure apo de ShuA et sa comparaison avec la structure de HasR en complexe avec HasA-hème (Krieg *et al.*, 2009), suggèrent l'implication de la boucle extracellulaire L7 de ShuA dans la fixation et le transport de l'hème. En fait, cette boucle comporte les motifs consensus conservés chez les transporteurs de l'hème (Braken *et al.*, 1999) : **FRAP** (Phe406-Pro409) et **NPNL** (Asn434-Leu437). Elle contient également trois résidus hydrophobes exposés au solvant, probablement impliqués dans le transfert de hème à partir de l'hémoglobine (Phe421, Ile423 et Phe426) et l'His420, correspondant au premier résidu impliqué dans la liaison de l'hème et dans son transfert de l'hémoglobine (Burkhard & Wilks, 2007). Le deuxième résidu impliqué dans la fixation de l'hème (His86) (Burkhard & Wilks, 2007) est situé sur une boucle apicale du bouchon à 9,86 Å de l'His420 et est exposé au solvant (**figure 39**). La coordination de hème par les deux His conservés avant son transport, *via* ShuA, nécessite des changements de conformation importants et probablement un mécanisme d'ajustement induit. Deux Arg conservées, Arg242 (brin β6) et Arg288 (brin β8), sont situées à proximité de l'His86 juste avant les boucles L4 et L5 non définies dans la carte de densité électronique. La distance entre les groupements guanidine des deux Arg est semblable à la distance entre les groupements propionates de l'hème (6,9 Å).

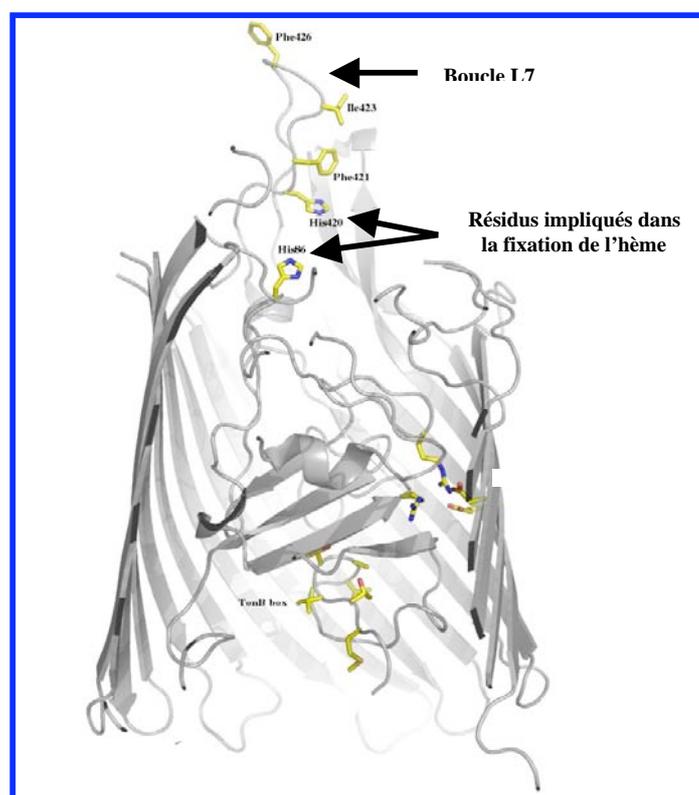


Figure 39 : His420, His86 et résidus de la boucle L7 de ShuA

Par conséquent, elles pourraient être impliquées dans la stabilisation de l'hème avant son transport à travers ShuA. Cela expliquerait aussi la flexibilité des boucles L4 et L5 à l'origine de leur invisibilité dans la carte de densité électronique. L'His86, conservée et impliquée dans la fixation de l'hème, est impliquée dans deux réseaux de liaisons hydrogène :

- **Le premier** inclut l'His86, la Gln228, la Gly58, la Gln59, l'Arg43, des résidus de la boucle intracellulaire contenant l'Arg43 (qui sépare les cavités extracellulaires et périplasmiques de ShuA), les résidus conservés du bouchon (Arg64 et Arg104) et du tonneau β (Glu446 (brin β 14) et Asp503 (brin β 16)) (Yue *et al.*, 2003) et des résidus de la boîte TonB.
- **Le second** fait intervenir l'His86, la Gln228, l'Asp51, la Leu50 et la Gln615 située au sommet de la boucle L11.

La fixation et la coordination de l'hème par les His420 et 86 perturberaient les deux réseaux de liaisons hydrogène, déclenchant ainsi des changements de conformation induisant le déplacement de la boucle intracellulaire séparant les deux régions (périplasmique et extracellulaire) de ShuA et de la boucle extracellulaire L11. Ces changements seraient suivis du changement de conformation de la boîte TonB nécessaire à l'interaction avec la protéine TonB de la membrane interne et pour le transfert d'énergie nécessaire au transport de l'hème par ShuA.

V.2.8. Conclusion et perspectives

S. dysenteriae est capable d'utiliser l'hème et l'hémoglobine humaines comme sources de fer pour sa croissance et sa survie lors d'une infection. ShuA est un RTBD de l'hème/hémoglobine de la membrane externe permettant le transport membranaire de l'hème. Cette étude nous a permis de résoudre la structure de ShuA sous sa forme apo à 2,6 Å de résolution et de proposer un mécanisme de fixation de l'hème par ajustement induit, en se basant sur l'analyse de la structure de ShuA et sa comparaison avec celle de HasR-HasA-hème. L'analyse de cette structure suggère l'existence de plusieurs mécanismes de transport et de transduction de signal chez les RTBDs. Il sera nécessaire de résoudre la structure de ShuA en complexe avec l'hème et-ou l'hémoglobine afin de déterminer de façon précise les changements de conformation du récepteur intervenant lors de la fixation de l'hème ou de l'hémoglobine dans la région extracellulaire et conduisant à un changement de conformation au niveau de la boîte TonB.

Article II

Cet article, publié en 2009 dans le Journal *Acta Crystallographica section F Struct Biol Cryst Commun.*, présente les résultats de la surexpression, de la purification et l'analyse des données de diffraction des cristaux de ShuA.

Article II

Cet article, publié en 2009 dans le Journal *Acta Crystallographica section F Struct Biol Cryst Commun.*, présente les résultats de la surexpression, de la purification et l'analyse des données de diffraction des cristaux de ShuA.

Karl Brillet,^a Ahmed Meksem,^b
Andrew Thompson^c and David
Cobessi^{b*}

^aInstitut de Recherche de l'École de
Biotechnologie de Strasbourg, FRE 3211,
CNRS–Université de Strasbourg, École
Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg,
BP 10413, F-67412 Illkirch, France, ^bInstitut de
Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel,
CEA–CNRS–Université Joseph Fourier,
38027 Grenoble, France, and ^cSynchrotron
SOLEIL, L'Orme de Merisiers, Saint Aubin
BP 48, 91192 Gif sur Yvette, France

Correspondence e-mail: david.cobessi@ibs.fr

Received 3 February 2009
Accepted 5 March 2009

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*

As part of efforts towards understanding the crystallization of membrane proteins and membrane transport across the outer membrane of Gram-negative bacteria, the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA of *Shigella dysenteriae* bound to heavy atoms was crystallized in several crystallization conditions using detergents. The insertion of a His₆ tag into an extracellular loop of ShuA, instead of downstream of the *Escherichia coli* peptide signal, allowed efficient targeting to the outer membrane and the rapid preparation of crystallizable protein. Crystals diffracting X-rays beyond 3.5 Å resolution were obtained by co-crystallizing ShuA with useful heavy atoms for phasing (Eu, Tb, Pb) by the MAD method at the synchrotron, and the SAD or SIRAS method at the Cu wavelength. The authors collected X-ray diffraction data at 2.3 Å resolution using one crystal of ShuA-Pb, and at 3.2 Å resolution at an energy remote from the Pb *M* absorption edges for phasing on PROXIMA-1 at SOLEIL.

1. Introduction

The capability to scavenge essential nutrients, including iron, is essential for the multiplication and virulence of pathogenic Gram-negative bacteria. Although iron is a major component of the Earth's crust, its bioavailability is very low (Neilands, 1995); under aerobic conditions or at physiological pH it precipitates to form insoluble ferric oxyhydroxide complexes. Its free concentration in biological fluids is very low (10^{-18} M) and is less than that required for bacterial growth (10^{-7} – 10^{-8} M; Stintzi *et al.*, 2000). In humans, iron is bound to proteins such as lactoferrin, ferritin or haemoglobin. In these environments, most pathogenic Gram-negative bacteria are able to use iron after the synthesis and release into the external medium of iron chelators called siderophores. These bind iron(III) with high affinity and are specifically transported across the outer membrane by TonB-dependent transporters (TBDTs; Krewulak & Vogel, 2008). Many bacterial species such as *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, pathogenic *Escherichia coli* (for example, strain O157:H7) and *Shigella dysenteriae* express haem TBDTs and are therefore able to use free haem or haem from haemoglobin as an iron source (Paulley *et al.*, 2007). Other organisms such as *Serratia marcescens* secrete proteins called haemophores which bind to haem and are recognized by their respective TBDT for haem transport (Cescau *et al.*, 2007).

Shigella dysenteriae is a human pathogenic bacterium belonging to the Enterobacteriaceae and is mainly responsible for dysentery. As with other human pathogenic bacteria, it is able to acquire the iron necessary for growth from haem by using its TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA, which binds to human haemoglobin to transfer haem across the outer membrane (Mills & Payne, 1997; Burkhard & Wilks, 2007). ShuA can either bind to haem or to haemoglobin for haem import. The energy required for the transport is derived from the proton motive force and is transferred to the TBDT by the energy-transducing complex TonB–ExbB–ExbD of the inner membrane. Energy is delivered after interactions between the TonB protein and a conserved N-terminal sequence called the TonB-box of the TBDT (Ferguson & Deisenhofer, 2002).



His₆-tagged ShuA was overexpressed in *E. coli* and purified using a two-step purification. Crystals were obtained in several crystallization conditions. The insertion of the His₆ tag in an extracellular loop (Ferguson *et al.*, 1998; Brillet *et al.*, 2009), instead of after the signal peptide, is a valuable strategy for overexpression and purification and does not prevent crystallization. Our spectroscopic studies showed that ShuA was able to bind haem in detergent micelles, even with the insertion of the His₆ tag in an extracellular loop. By cocrystallizing ShuA with positively charged heavy ions such as Pb²⁺, Eu³⁺ and Tb³⁺, which have a strong anomalous signal at the Cu wavelength for SAD phasing, the size and quality of the ShuA crystals were improved. Crystals of ShuA-Pb that diffracted X-rays to 2.3 Å resolution were obtained and a complete data set was collected at 2.6 Å resolution. X-ray data were also collected to 3.2 Å resolution at an energy remote from the Pb *M* absorption edges for phasing.

2. Material and methods

2.1. Cloning

The DNA encoding ShuA (without the 28-residue signal sequence) was amplified by PCR. The forward primer of the first fragment F1 (5'-GTCAGATATCACTGAAACCATG-3') contained an *EcoRV* site (underlined) and codons for residues 29–32 (bold). The reverse primer (5'-GCTAGGATCCTTGTTCCTGACGATAA-3') for F1 contained a *Bam*HI site (underlined) and anticodons for residues 348–352 (bold). The forward primer of the second fragment F2 (5'-GATCGGATCCCATCACCATCATCACCATCATCCGGGCGGC-3') contained a *Bam*HI site (underlined) that introduces two residues GS, a DNA sequence encoding a His₆ tag (italicized) and codons for residues 353–356. The reverse primer of F2 (5'-GATCAAGCTT-TTACCATTGATAACTCAC-3') contained a *Hind*III site (underlined), a stop anticodon (italicized) and anticodons for residues 656–660. The PCR products were cloned in pET20b (Novagen). *E. coli* Top10 cells were transformed with vectors pET20b-ShuAF1 and pET20b-ShuAF2. The ShuAF2 fragment was removed from the plasmid and introduced into pET20b-ShuAF1 using the *Bam*HI and *Hind*III restriction sites. *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the resulting construct, which encodes a protein in which the native *S. dysenteriae* signal peptide is replaced by the native N-terminal pelB signal sequence of *E. coli* in order to target the outer membrane. The His₆ tag in loop L5 allowed the rapid purification of ShuA.

2.2. Expression and purification

Expression was induced with 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 310 K for 3 h. The yield of purified protein was increased by overnight induction. The cells were harvested by centrifugation for 20 min at 10 000g. ShuA was purified

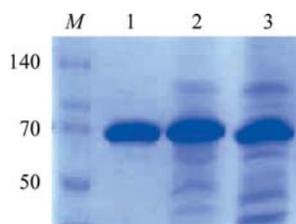


Figure 1
SDS-PAGE of ShuA. Lane M, molecular-weight markers (kDa); lane 1, purified ShuA after anion-exchange chromatography; lane 2, pool after affinity chromatography; lane 3, pool from solubilization of outer membranes.

after incubation of the membranes with 1% (w/v) sodium *N*-lauroylsarcosine, leading to solubilization of the cytoplasmic membranes. Intact outer membranes containing ShuA were pelleted by centrifugation at 125 000g for 40 min. The outer membranes were solubilized with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl and 7% (v/v) octyl-polyoxyethylene (octyl-POE; critical micelle concentration 0.23%; Bachem) and subsequently centrifuged at 117 000g for 20 min. The supernatant was applied onto a HisTrap column (Amersham) equilibrated with 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole and 1% octyl-POE. The protein was eluted with a linear gradient of 20–500 mM imidazole in 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl and 1% octyl-POE. The fractions containing ShuA were pooled, dialyzed with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE and loaded on a HiTrap Q column (Amersham) equilibrated with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE. ShuA was eluted with a linear gradient of 0–1 M NaCl in 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 1% octyl-POE.

2.3. Haem-binding measurements

The ability of ShuA to bind haem was tested by difference spectroscopy absorbance using a Cary UV–visible spectrophotometer (Varian). Reactions were carried out in 450 μl reaction volumes containing 20 μM ShuA in 10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1.4% octyl β-D-glucopyranoside and 20 μM haemin dissolved in 1 mM NaOH. UV–visible absorbance spectra were collected between 300 and 700 nm at room temperature. The step size was 15 nm and the averaging time was 1 s per point.

2.4. Crystallization experiments

The pure fractions containing ShuA were pooled and dialyzed with 10 mM Tris–HCl pH 8.0 and 0.75% octyl-tetraethylene glycol ether (C₈E₄), 0.75% octyl-pentaethylene glycol ether (C₈E₅) or 1.4% octyl-β-D-glucopyranoside (β-OG). Initial crystallization experiments were performed using a Cartesian Honeybee system at SBGP (Illkirch, France) and the sitting-drop vapour-diffusion method by mixing 100 nl protein solution at a concentration of 10 mg ml⁻¹ with 100 nl crystallization solution. The MbClass Suite, MbClassII Suite, The Classics Suite and The Classics Lite matrices from Qiagen were tested with the three detergents at 293 K. The reservoir volume was 80 μl. Improvements of the conditions were performed in Linbro plates using the sitting-drop vapour-diffusion method at 293 K by mixing 0.5 μl protein solution (10 mg ml⁻¹) with 0.5 μl crystallization solution. The reservoir volume was 500 μl.

2.5. Cocrystallization with heavy atoms

Solutions of heavy atoms [I₂, Pb(NO₃)₂, EuCl₃, TbCl₃ and KBr] at 2.8 mM were prepared in 10 mM Tris–HCl pH 8.0 with 1.4% octyl-β-D-glucopyranoside. Pure fractions of ShuA at 10 mg ml⁻¹ were incubated with five or ten molar equivalents of heavy atom at room temperature for 1 h before crystallization.

2.6. Data collection and processing

Diffraction data for ShuA-Pb were collected to 2.3 Å resolution on PROXIMA-1 at SOLEIL using X-rays of wavelength 0.9788 Å and to 3.2 Å resolution (λ = 1.9997 Å) at a high remote energy compared with the *M* absorption edges of Pb using one crystal at 100 K. Diffraction data for ShuA cocrystallized with TbCl₃ and EuCl₃ were collected on BM30A (Roth *et al.*, 2002) at ESRF (λ = 0.9798 Å) and on PROXIMA-1 (λ = 1.7657 Å) at SOLEIL, respectively. All data were processed and scaled using XDS (Kabsch, 1993).

3. Results and discussion

3.1. High yields of pure and monodisperse apo ShuA

By using an in-house approach from cloning to crystallization of membrane proteins belonging to the TBDT family (Brillet *et al.*, 2009), we successfully overexpressed and crystallized the haem outer

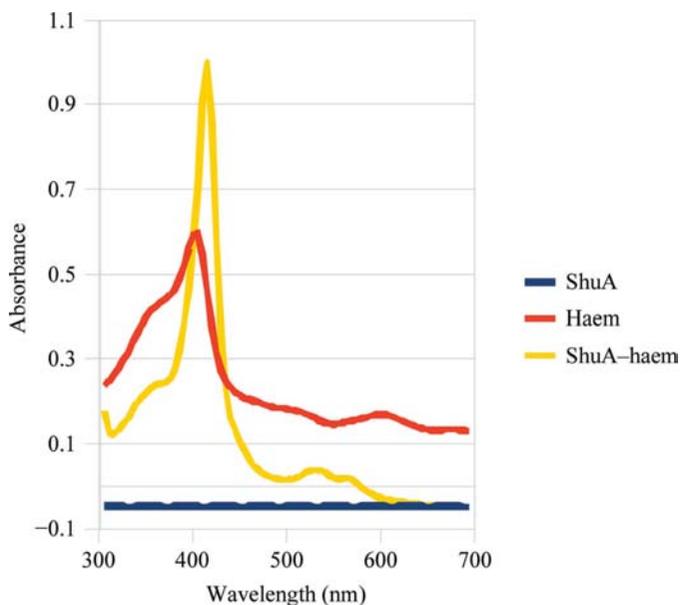


Figure 2 Spectroscopy experiments with ShuA and ShuA-haem after purification. Experiments were carried out with ShuA before purification and similar results were obtained (data not shown).

membrane transporter ShuA from *S. dysenteriae*. As previously observed with other TBDTs (Ferguson *et al.*, 1998; Brillet *et al.*, 2009), the insertion of a His₆ tag in an extracellular loop of the transporter instead of downstream of the *E. coli* peptide signal in the pET20b plasmid allowed efficient targeting to the outer membrane. An increase of the overexpression time from 3 to 16 h with 0.5 mM IPTG induction provided the highest yield of ShuA using only a two-step purification (3.6 *versus* 3 mg l⁻¹). After purification, only one band at approximately 70 kDa (ShuA molecular weight 69.5 kDa) was observed on SDS-PAGE (Fig. 1). By using gel chromatography, only one peak corresponding to monomeric ShuA was observed. The His₆-tagged ShuA was therefore in a monodisperse state before crystallization.

The ShuA-haem complex was characterized by adding haemin to ShuA. The spectral characteristics of haemoproteins were observed, including a Soret peak (maximum at 409 nm) and well resolved α and β bands at approximately 565 and 529 nm (Fig. 2). These peaks were not observed with ShuA. Similar results were obtained before purification. Contrary to published results (Burkhard & Wilks, 2007), ShuA does not bind residual haem in *E. coli*. This difference could result from the expression of ShuA in *E. coli* as well as membrane isolation and protein purification. Indeed, we quickly solubilized the inner membranes by adding 1% lauroylsarcosine after cell lysis and the solution was centrifuged at 119 000g to pellet the outer membranes. The outer membranes were then subjected to solubilization with 7% octyl-POE. These results showed that ShuA is in its apo form in detergent micelles after purification and binds to haem.

3.2. Crystallization and cocrystallization with heavy atoms

By combining three detergents and four sparse matrices for crystallization, 1152 conditions were tested using only 60 μ l protein

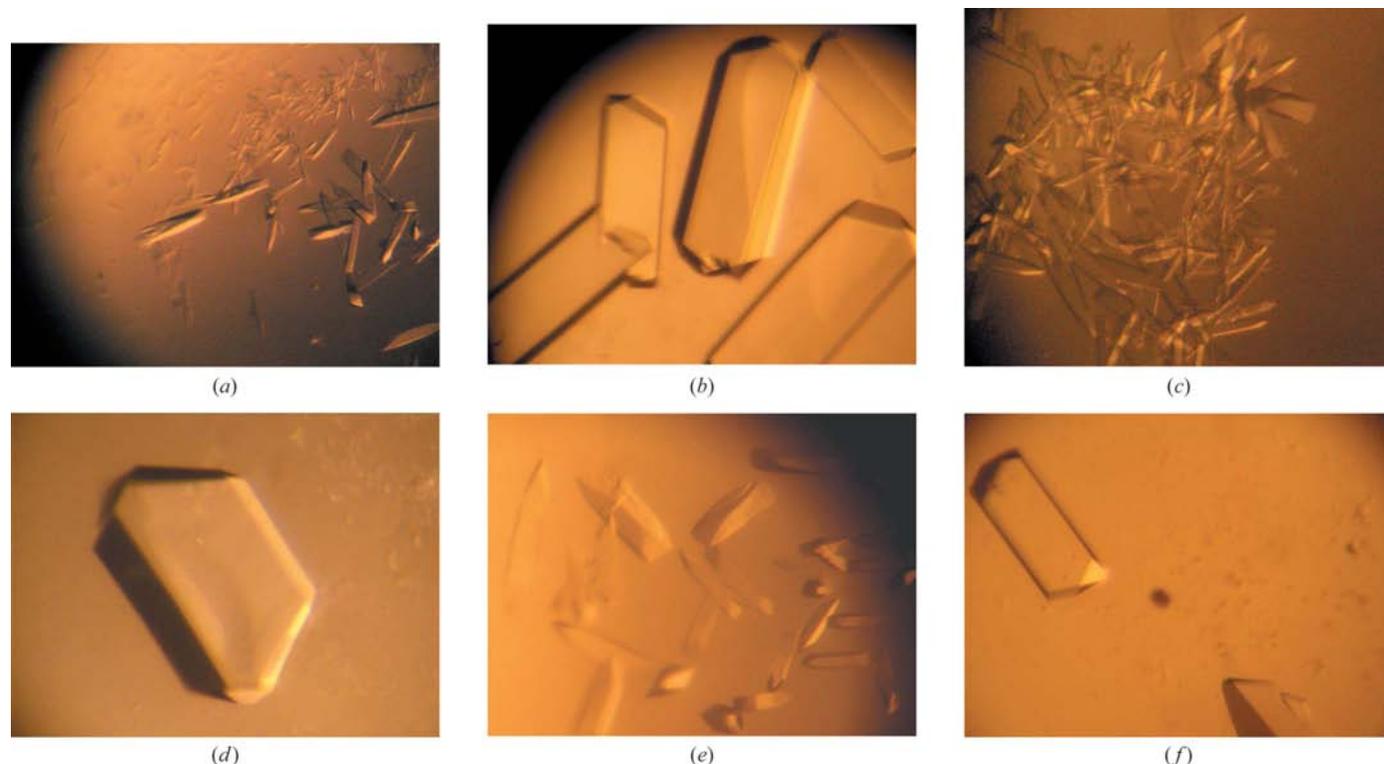


Figure 3 Crystals of ShuA (a, c, e), ShuA-Pb (b), ShuA-Tb (d) and ShuA-Eu (f). All crystals were obtained using either 13–15% PEG 1K (a, b), 11–14% PEG 1.5K (c, d) or 8–12% PEG 3350 (e, f) with 0.1 M MES pH 6.5 and 0.1 M NaCl. The protein concentration was 10 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 with 1.4% octyl- β -D-glucopyranoside. The heavy-atom concentration in the protein solution was 1.4 mM.

Article III

Cet article a été publié en 2010 dans le Journal *Proteins*. Il présente la structure tridimensionnelle de ShuA.

Article III

Cet article a été publié en 2010 dans le Journal *Proteins*. Il présente la structure tridimensionnelle de ShuA.

Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: Heme binding by an induced fit mechanism

David Cobessi,^{1*} Ahmed Meksem,² and Karl Brillet²

¹Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France

²Institut de recherche de l'École de Biotechnologie de Strasbourg, CNRS-Université de Strasbourg, École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch F-67412, France

ABSTRACT

Shigella dysenteriae and other Gram-negative human pathogens are able to use iron from heme bound to hemoglobin for growing. We solved at 2.6 Å resolution the 3D structure of the TonB-dependent heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *S. dysenteriae*. ShuA binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane. The structure consists of a C-terminal domain that folds into a 22-stranded transmembrane β-barrel, which is filled by the N-terminal plug domain. One distal histidine ligand of heme is located at the apex of the plug, exposed to the solvent. His86 is situated 9.86 Å apart from His420, the second histidine involved in the heme binding. His420 is in the extracellular loop L7. The heme coordination by His86 and His420 involves conformational changes. The comparisons with the hemophore receptor HasR of *Serratia marcescens* bound to HasA-Heme suggest an extracellular induced fit mechanism for the heme binding. The loop L7 contains hydrophobic residues which could interact with the hydrophobic porphyring ring of heme. The energy required for the transport by ShuA is derived from the proton motive force after interactions between the periplasmic N-terminal TonB-box of ShuA and the inner membrane protein, TonB. In ShuA, the TonB-box is buried and cannot interact with TonB. The structural comparisons with HasR suggest its conformational change upon the heme binding for interacting with TonB. The signaling of the heme binding could involve a hydrogen bond network going from His86 to the TonB-box.

Proteins 2010; 78:286–294.
© 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: membrane protein; membrane transport; signal transduction; TonB-dependent transporter; X-ray crystallography; crystal structure.

INTRODUCTION

Iron is an essential element to most of living organisms¹ and is an important determinant of bacterial virulence. In humans, iron is bound to iron storage proteins such as lactoferrin, ferritin, or transferrin, and its free concentration in biological fluids is very low (10^{-18} M), and less than that required for bacterial growth (10^{-7} to 10^{-8} M).² Under iron-limiting conditions, most of the Gram-negative bacteria are able to scavenge iron by producing iron-chelators called siderophores,³ which have high affinity for iron(III). They chelate iron either from proteins or nonsoluble oxyhydroxyde complexes and the ferric complexes are transported into the periplasm by TonB-dependent transporters (TBDT).⁴ Gram-negative bacteria can also reduce ferric iron into ferrous iron which is transported into the cell.⁵ Moreover, transferrin and lactoferrin TBDTs recognize and bind to transferrin and lactoferrin respectively for iron uptake.⁶

In humans, iron is mainly bound to heme in hemoglobin.⁷ Heme is therefore a valuable source of iron for the bacterial growth. Several Gram-negative human pathogens, such as *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and *Shigella dysenteriae* for example, have a gene encoding an outer membrane hemoglobin/heme TBDT, which allows for the bacteria growth by using heme as iron source.⁸ This TBDT binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane into the periplasm. Heme is transferred into the cytoplasm by an ABC transporter. Other bacteria such as *Serratia marcescens* secrete hemophores, which bind to heme and are recognized by their respective outer membrane TBDT to deliver heme to the cell.⁹ The first crystal structure of an hemophore TBDT, HasR, has been recently solved.¹⁰

Grant sponsor: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and Centre National de la Recherche Scientifique.

Ahmed Meksem and Karl Brillet contributed equally to this work for the purification and crystallization of ShuA.

*Correspondence to: David Cobessi, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble 38027, France. E-mail: david.cobessi@ibs.fr

Received 30 April 2009; Revised 17 June 2009; Accepted 30 June 2009

Published online 20 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/prot.22539

Shigella dysenteriae is a Gram-negative human pathogen that colonizes the intestine and mainly causes bloody diarrhea. The high incidence of dysentery occurs in regions of malnutrition, inadequate drinking supplies, and poor hygiene conditions. In developed countries, incidence of the disease results from food contamination by the well known *E. coli* O157:H7 strain,^{11,12} for example, *S. dysenteriae* and *E. coli* H157:O7 secrete the Shiga or Shiga related-toxin that causes damages to the bowel mucosa leading to bleeding into the bowel.¹³ This toxin action allows for iron supply to bacteria able to use iron from heme.¹⁴

The TonB-dependent outer membrane transporter ShuA from *S. dysenteriae* binds to hemoglobin and transports heme across the outer membrane.^{14,15} In contrast to the well characterized siderophore TBDTs, little is known about the heme and hemoglobin TBDTs. The energy-transducing complex TonB-ExbB-ExbD of the inner membrane interacts with the TonB-box of ShuA to deliver energy for the membrane transport.¹⁵ No 3D structure of an hemoglobin TBDT has been solved, and the heme transport has never been investigated: the residues involved in the heme binding during transport, the uptake mechanism and pathway for transport are unknown. Two histidine residues (His86 and His420) participate to the heme binding and transfer from hemoglobin whereas the heme recognition probably involves hydrophobicity of the extracellular loops.¹⁴

Due to the absence of structural data about the heme transport by the TBDTs, we determined the ShuA crystal structure at 2.6 Å resolution. The heme binding by His86 and His420 involves extracellular conformational changes and probably an induced fit mechanism. The TonB-box involved in interactions with TonB for the energy transfer is buried in ShuA and no transmembrane pore was observed to allow for a passive transfer of heme through ShuA. Structural comparisons with HasR bound to HasA-Heme highlighted also the conformational changes required for the heme binding and energy transfer.

MATERIALS AND METHODS

Purification and crystallization

ShuA was cloned, expressed, and purified following the same procedure described for FauA, the alcaligin TBDT from *Bordetella pertussis*.¹⁶ The crystallization experiments were carried out using three detergents and four sparse matrices from QIAGEN.¹⁷ Improvement of the crystallization conditions were achieved by adding heavy atoms ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, TbCl_3 , or EuCl_3) to the protein before crystallization.¹⁷

[SeMet]-ShuA was overexpressed in *E. coli* B834 and purified following the procedure used for FauA¹⁶ and for ShuA,¹⁷ by affinity chromatography and anion exchange. Trials to crystallize [SeMet]-ShuA in the same

Table I

X-Ray Data Statistics for ShuA-Pb. The Cell Parameters Are $a = 78.10$, $b = 114.21$, $c = 117.09$ Å and the Space Group Is $\text{P}2_12_12_1$

Wavelength (Å)	0.9788	1.9997
Resolution limits (Å)	19.8–2.6 (2.7–2.6)	33.2–3.2 (3.3–3.2)
Total reflections	232,991 (25,051)	135,194
Unique reflections	32,798 (3433)	32,661
Completeness (%)	99.7 (99.9)	99.5 (98.5)
Rsym (%)	9.0 (44.8)	6.1 (27.3)
I/σ_I	16.27 (4.68)	16.65 (5.18)

$R_{\text{sym}} = \sum \sum |I_i - \text{Im}| / \sum \sum I_i$, where I_i is the intensity of the measured reflection and Im is the mean intensity of this reflection. Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell.

conditions than ShuA failed and [SeMet]-ShuA was only crystallized using EDTA (5–20 mM) and reducing agents: DTT (2.5 mM), ascorbic acid, and citric acid (7.5 mM). Finally, X-ray diffracting crystals of [SeMet]-ShuA (10 mg/mL) were obtained with 10–14% PEG 2K MME, 18–20% glycerol, 0.1 M HEPES pH 6.5, 0.1 M NaCl or LiCl, 5 mM EDTA, and 7.5 mM ascorbic acid.

Data collection and phasing

A complete dataset was collected at 3.2 Å resolution using one crystal of ShuA-Pb at an energy remote from the Pb M absorption edges on PROXIMA-1 at SOLEIL (Table I). The phase problem was solved by the SAD method but only a partial model was rebuilt, due to the poor quality of the electron density map. Another dataset for ShuA-Pb was collected at 2.3 Å resolution using X-ray with a wavelength of 0.9788 Å, and the data were processed at 2.6 Å resolution¹⁷ (Table I) using XDS.¹⁸ Diffraction data for ShuA cocrystallized with TbCl_3 and EuCl_3 were collected on BM30A at ESRF ($\lambda = 0.9798$ Å) and on PROXIMA-1 ($\lambda = 1.7657$ Å) at SOLEIL, respectively.¹⁷

A three wavelength MAD dataset was collected on ID29 at ESRF at 100 K using 1 crystal of [SeMet]-ShuA at the absorption, inflection peak and high remote energy of the Se absorption edge (Table II), and the data were processed using XDS.¹⁸ Analyses of the statistics (increase of the Rsym and decrease of I/σ_I) during the data collection clearly showed that radiation damages occurred. The cell parameters were $a = 78.83$, $b = 114.63$, $c = 120.11$ Å, and the space group was $\text{P}2_12_12_1$. A total of 17 selenium atoms were found using SHELX¹⁹ and the graphical interface HKL2MAP.²⁰ They were input to the SHARP program²¹ to refine the phases (Table III). The resulting phases were further improved by SOLOMON²² allowing for the chain tracing.

Model building and refinement

A polyaniline model was constructed at 3.2 Å resolution, and several side chains were added using COOT.²³ The model was further rebuilt and refined at 2.6 Å reso-

Table II

X-Ray Data Statistics of [SeMet]-ShuA. The Cell Parameters Are $a = 78.83$, $b = 114.63$, $c = 120.11$ Å and the Space Group Is $P2_12_12_1$

	Absorption peak	Inflection point	High energy remote
Wavelength (Å)	0.9791	0.9793	0.9752
Resolution limits (Å)	47.8–3.3 (3.51–3.31)	37.9–3.3 (3.51–3.31)	37.8–3.3 (3.5–3.3)
Total reflections	130,187	131,720	131,237
Unique reflections	30,964	31,303	31,207
Completeness (%)	98.5 (96.5)	98.6 (97.2)	98.5 (96.8)
Rsym (%)	9.3 (66.4)	11.4 (114.3)	10.0 (91.0)
I/σ_I	12.02 (1.87)	10.44 (0.87)	11.64 (1.37)

$R_{sym} = \frac{\sum \sum |I_i - \bar{I}|}{\sum \sum I_i}$, where I_i is the intensity of the measured reflection and \bar{I} is the mean intensity of this reflection. Values indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell.

lution by energy minimization and molecular dynamic using CNS_SOLVE 1.2²⁴ and by restrained maximum-likelihood least-square techniques in REFMAC5 5.2²⁵ from CCP4²⁶ with the data collected using ShuA-Pb.¹⁷ The refinement statistics are given in Table III. At the end of the refinement, water and one detergent molecules were added. Simulated-annealing 3Fo2Fc and 2FoFc omit electron density maps were calculated using CNS_SOLVE²⁴ to check the model. The model was also checked using PROCHECK.²⁷ All the figures were prepared using Pymol.²⁸ The ShuA atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with the accession code number 3FHH.

RESULTS

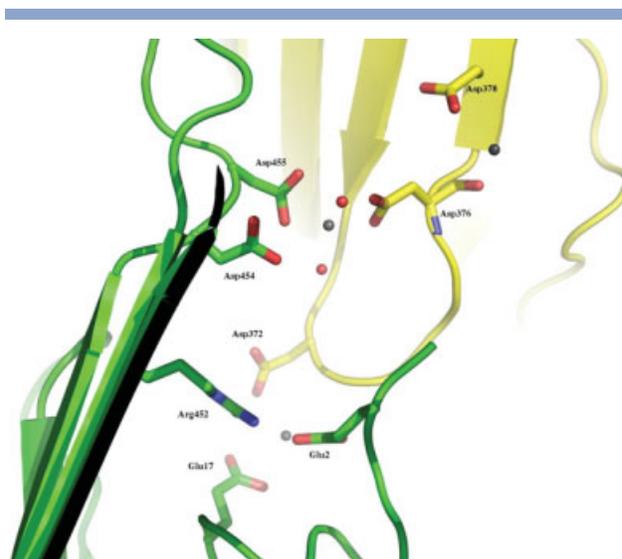
Heavy atom binding sites—quality of the structure

Only the crystals obtained with heavy atoms diffracted X-rays beyond 3.5 Å resolution. In the ShuA-Pb structure, 3 Pb^{2+} ions are bound at the protein surface: 2 Pb^{2+} ions are involved in intermolecular contacts (Fig. 1). One cation (occupancy: 1) interacts with two water molecules and the Asp376, Asp454, and Asp455 carboxylate groups. The other (occupancy: 0.31) interacts with the Glu2, Glu17, and Asp372 carboxylate groups and with the Arg452 guanidinium group. The third Pb^{2+} ion (occupancy: 0.26) is bound to the Asp378 carboxylate group and Asp376 carbonyl group. Only the position corresponding to the first site is occupied by Eu^{3+} and

Table III

Sharp Phasing Statistics of [SeMet]-ShuA

	[SeMet]-ShuA		
	Peak	Inflection	Remote
Resolution (Å)		37.8–3.3	
Phasing power	0.66	0.52	0.59
Rcullis	0.89	0.94	0.94
FOM overall	0.30		

**Figure 1**

View of the Pb^{2+} binding sites found at the surface of ShuA. The residues involved in the Pb^{2+} stabilization are colored in yellow and green according to the symmetry related molecules. The water molecules interacting with Pb^{2+} and ions are represented with spheres colored in red and gray, respectively. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Tb^{3+} in the crystals of ShuA-Eu and ShuA-Tb. A fourth Pb^{2+} ion (occupancy: 0.37) is observed at the interface of the plug and barrel domain.

The 3D structure of ShuA-Pb was solved at 2.6 Å resolution with R and Rfree²⁹ factors of 23.7 and 28.6%, respectively (Table IV). The ShuA construct encoded a 70 kDa mature protein (632 residues) and 602 side chains were assigned. Electron density was observed for 621 residues. Electron density for residues of three extracellular loops (loop L4, L5, and L10) was missing due to their

Table IV

Refinement and Model Statistics

Resolution range ^a (Å)	19.94–2.60 (2.67–2.60)
Number of reflections used for Rcryst calculation ^a	29,458 (2218)
Number of reflections used for Rfree calculation ^a	1647 (119)
Data cutoff F/σ_F	0.0
Rcryst value ^a (%)	23.74 (33.60)
Rfree value ^a (%)	28.58 (37.20)
Number of nonhydrogen protein atoms	4757
Mean B factors, protein main chain atoms (Å ²)	58.7
Mean B factors, protein side chain atoms (Å ²)	60.0
Ramachandran Plot	
Residues in most favored regions (%)	85.7
Residues in additionally allowed regions (%)	13.2
Residues in generously allowed regions (%)	1.1
Residues in disallowed regions (%)	0.0
Rms differences from ideal geometry	
Bond length (Å)	0.012
Bond angle (°)	1.489

^aValues indicated in parentheses correspond to the statistics in the highest resolution shell. $R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$. R_{free}^{29} is the same as R_{cryst} but calculated for n % data omitted from the refinement where n is 5.0% for ShuA.

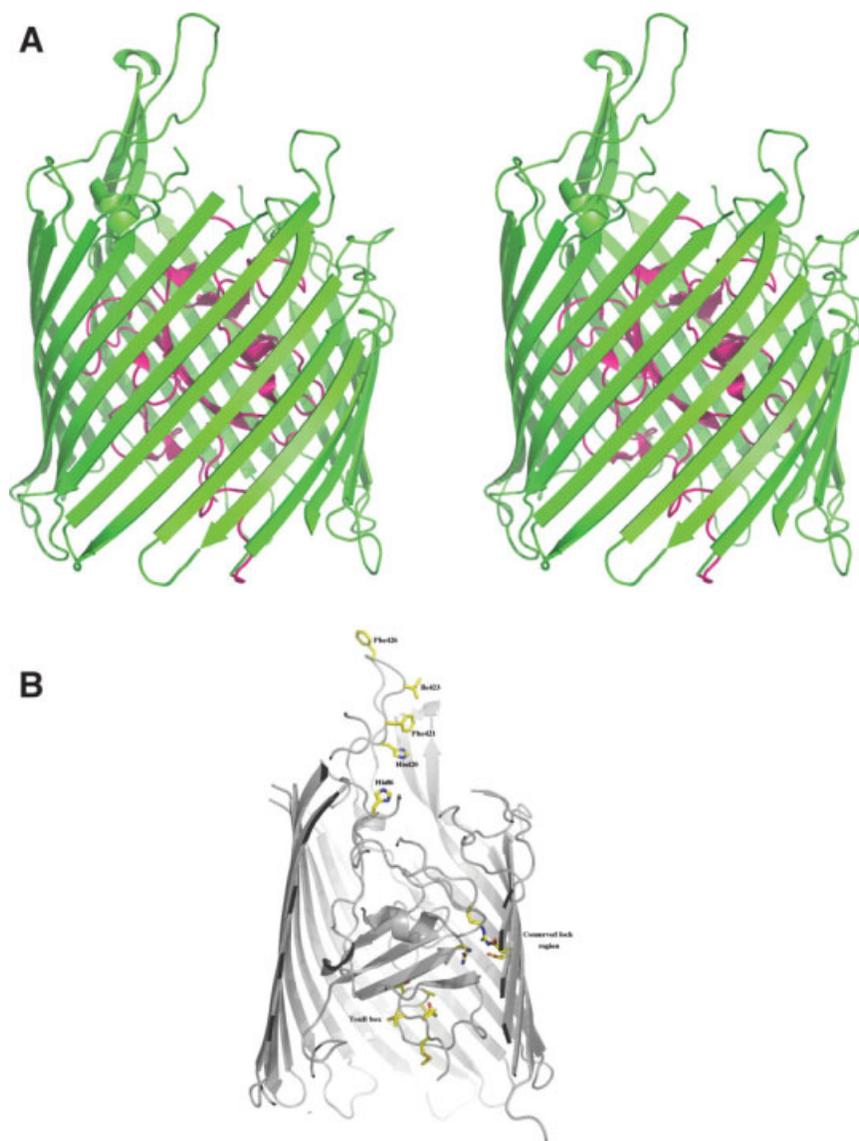


Figure 2

Overall structure of ShuA. (A) Stereoview of the structure. The plug and the barrel are pink and green colored, respectively. (B) View of the ShuA structure. The side chains of the residues belonging to the TonB-box and lock region as well as the His86, His420, Phe421, Ile423, and Phe426 side chains are represented. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

flexibility. One molecule of detergent used for crystallization (octyl- β -D-glucopyranoside) was observed in the electron density. The overall B-factor average is 59.3 \AA^2 . 85.7% residues are in the most favored regions of the Ramachandran plot. No residue is found in disallowed regions.

The overall 3D structure

ShuA displays the classical fold of the TBDTs. The C-terminal domain is folded into a 22-stranded transmembrane β -barrel (Ser136 to Trp632) and the lumen is filled with the N-terminal plug domain (Thr1 to Gln135) (Fig.

2). The transmembrane antiparallel β -strands are connected by long extracellular loops and periplasmic turns. The root-mean-square deviation calculated with MSD-fold³⁰ between ShuA and the siderophore TBDTs goes from 1.87 \AA (ShuA/FepA, PDB entry: 1FEP³¹) to 2.2 \AA (ShuA/FpvA, PDB entry: 1XKH³²) and is 1.75 \AA with BtuB (PDB entry: 1NQE³³). The conserved interactions between acid and basic residues from the barrel and plug respectively,³⁴ called lock region,³⁵ involve Arg64, Arg104 from the plug and Glu446 (β -strand 14), Asp503 (β -strand 16) in the β -barrel. The periplasmic N-terminal TonB-box (Met4-TVTAT-Gly10) is well defined in the electron density and is buried. At the extracellular face,

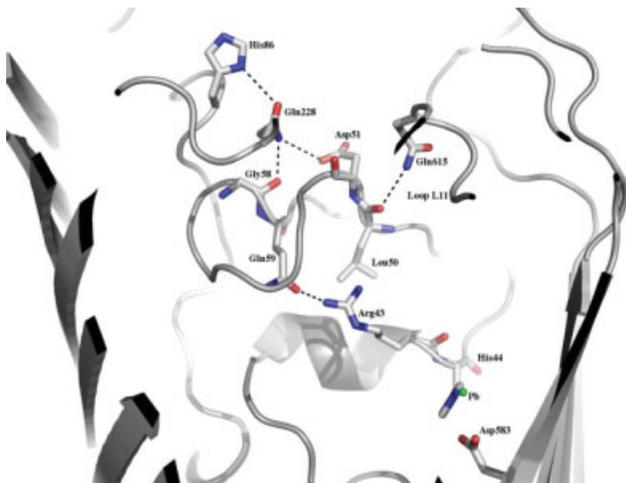


Figure 3

The hydrogen bond networks involving His86. One network includes His86, Gln615, Leu50, Asp51, and Gln228. The second network involves His86, Gln228, Gly58, Gln59, and Arg43. His44, Asp583, and Pb^{2+} are also drawn. The hydrogen bonds are drawn in dashed lines. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

His86 is located at the apex of the plug domain and is exposed to the solvent. The second distal coordinating residue of heme, His420, is located 9.86 Å apart His86. His420 is in one of the largest extracellular loop, the loop L7. The loop L7 contains three hydrophobic resi-

dues exposed to the solvent: Phe421, Ile423, and Phe426 (Fig. 2). The FRAP and NPNL signatures of the heme TBDTs³⁶ begins (Phe406 to Pro409) and ends (Asn434–Leu437) the loop L7, respectively. A Pb^{2+} ion is at the interface of the domains and interacts with the imidazole and carboxylate groups of His44 and Asp583, respectively.

The heme binding and transport

The heme transfer from hemoglobin and its binding at the extracellular face of ShuA involve the conserved His86 and His420.¹⁴ His86 is 9.86 Å apart from His420. Structural rearrangements are required for heme binding. Due to its hydrophobic properties, the porphyring recognition could involve Phe421 or Ile423 in the loop L7. Ile423 is replaced by another hydrophobic residue in the sequence alignments. The His86 side chain interacts with the Gln228 side chain hydrogen bonded to the Gly58 carbonyl group. The Gln59 side chain shares a hydrogen bond with the Arg43 guanidinium group conserved in the sequence alignments (Fig. 3). An interaction network is observed from residues of the loop containing Arg43 to the TonB-box, and involves hydrogen bonds as well as van der Waals contacts (Fig. 4). The conserved lock region which could play an important role for the opening of a channel,³⁵ participates to this network (Fig. 4). Gln228 is also hydrogen bonded to the Asp51 side chain, and the Leu50 carbonyl group interacts by hydrogen

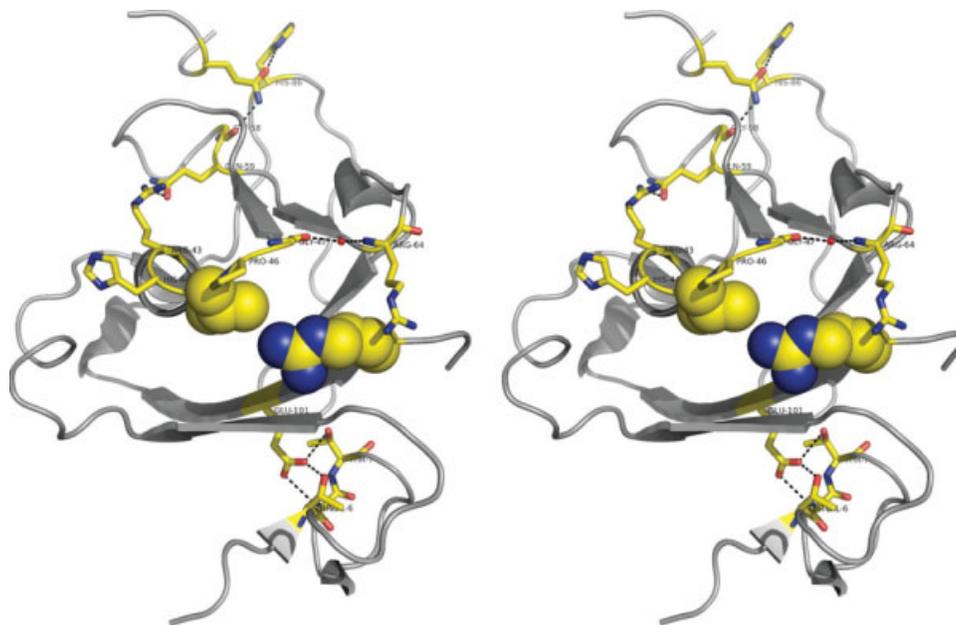


Figure 4

Stereoview of the interaction network from His86 to the residues of the TonB-box. For clarity, only the plug and trace of residues surrounding Gln228 were drawn. Arg104 and Val45 are represented in van der Waals spheres. The hydrogen bonds are drawn in dashed black lines.

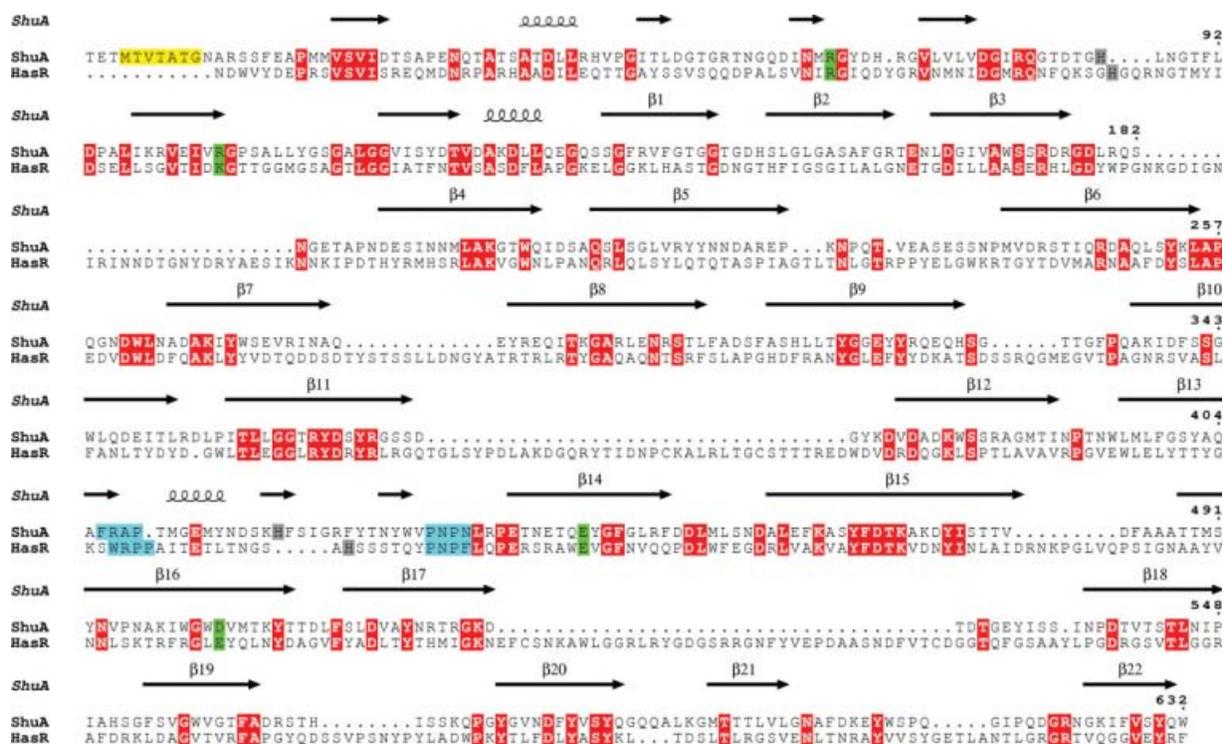


Figure 5

Sequence alignment deduced from the superposition of ShuA/HasR. The TonB-box is highlighted in yellow, the conserved distal histidine ligands of heme are gray shaded. The FRAP and NPNL signatures and the residues involved in the lock region are cyan and green shaded, respectively. The conserved residues are red shaded. The drawing was prepared with ESPrift⁴⁹ from the structure superimposition obtained using MSDFold.³⁰ [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

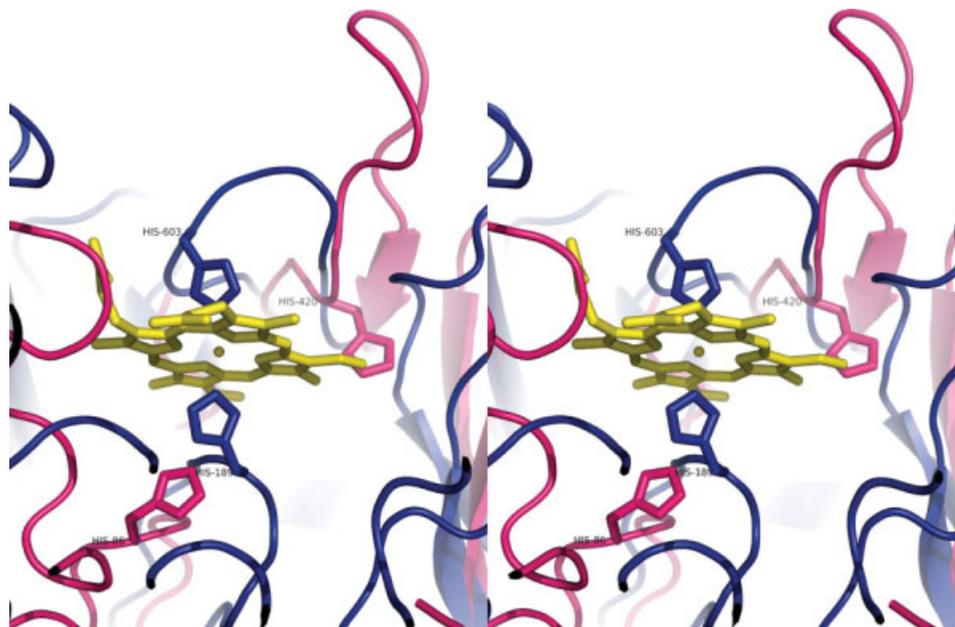


Figure 6

Stereoview of the heme binding site of HasR (blue) superposed onto ShuA (pink). The heme is yellow colored. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

bond with the Gln615 side chain located at the apex of the loop L11 (Fig. 3). The loop L11 closes a large cavity from the extracellular face, whereas the bottom of the cavity is closed from the periplasm by the loop containing Arg43 and His44. One Pb^{2+} ion is in the cavity and interacts with the His44 and Asp583 side chains (Fig. 3). This Pb^{2+} binding site was free of Eu^{3+} or Tb^{3+} in the electron density maps calculated from the diffraction data collected with the ShuA crystals obtained by cocrystallization with EuCl_3 or TbCl_3 . No transmembrane pore is observed inside the barrel domain.

Structural comparisons with HasR

The overall fold of the TBDTs is well conserved, and the structures superimpose with a RMS deviation of 1.91 Å. The main structural differences are the length and orientation of the extracellular loops from the plug and β -barrel. Analyses of the resulting sequence alignment (Fig. 5) show three large gaps resulting from three larger extracellular loops (L2, L6, and L9) in HasR. The loops L2, L6, and L9 are involved in the hemophore (HasA) or HasA-Heme binding to HasR. In the sequence alignment, the FRAP and NPNL signatures of heme TBDTs and fingerprints of TBDTs are conserved. The TonB-box is not defined in the electron density of HasR probably due to the binding of HasA or HasA-Heme to HasR. The distal ligands of heme in HasR, His189, and His603, are at the apex of the plug and in the loop L7, respectively. In HasR-HasA-Heme, they are bound to heme and therefore do not superimpose onto His86 and His420 of ShuA. The extracellular loop L3 of ShuA contacts with heme from HasR-HasA-Heme (Fig. 6). The conformational changes of the plug, loop L3 and L7 in ShuA are necessary for the heme binding as observed in the structure of HasR-HasA-Heme.

DISCUSSION

The crystals of ShuA derivatives always diffracted the X-rays better than the crystals of the native protein (3.5 Å resolution) and allowed for the structure determination of ShuA at 2.6 Å resolution. Similar results were obtained with the ribosome.³⁷ The positive heavy ions used to crystallize ShuA decreased the crystal disorder by bridging the molecules (Fig. 1) and strengthened the intermolecular interactions. The structure of ShuA displays a similar fold to the 3D structures of siderophore and vitamin B12 TBDTs (Fig. 2). The β -strands of the β -barrel are connected by long and flexible extracellular loops. The flexibility was revealed by the lack of electron density in several TBDTs (FepA,³¹ BtuB,³³ FptA,³⁸ CirA,³⁹ and FauA¹⁶). The lengths of the extracellular loops from the plug and barrel domain are the main structural differences between the TBDTs. As shown by several mutagenesis experiments, the extracellular loops are involved in

transport.⁴⁰ Their flexibility allows for the ligand recognition before binding into its binding pocket.

The heme binding pocket is not preformed at the extracellular face of ShuA. After the transfer from hemoglobin or directly by using free heme, the heme is bound to two conserved and solvent exposed histidines, His86 and His420 apart from 9.86 Å (Fig. 2). Therefore, a large conformational change should occur. The ligand binding pocket can be preformed as we observed it when structures of the unliganded TBDTs (FpvA, FhuA, or BtuB for example) and iron-siderophore (or apo-siderophore or vitamin B12) loaded TBDTs were compared. An induced fit mechanism probably occurs in ShuA for the heme binding (Fig. 6). The apex of the plug and loop L7 probably undergo a conformational change to coordinate heme involving His86 and His420. The induced fit mechanism is strongly supported by the structural comparison with HasR-HasA-Heme (Fig. 6). The upper part of the loop L7 is hydrophobic and exposed to the solvent (Fig. 2). It could be involved to recognize heme whose porphyrin ring is hydrophobic.

The plug domain separates the periplasmic space from the extracellular medium and prevents the passive diffusion of molecules through the TBDTs. Conformational changes and energy are required for the transport. Energy is provided by the energy-transducing complex TonB-ExbB-ExbD of the inner membrane through an interaction between the periplasmic part of TonB and the N-terminal TonB-box of the TBDTs.⁴ In ShuA, the TonB-box is buried (Fig. 2) and cannot interact with TonB. This observation is not consistent with the biochemical results obtained in binding assays between TonB and the apo form of ShuA.¹⁴ The crystal structures of the loaded FhuA and BtuB complexed to periplasmic part from TonB were solved.^{41,42} Therefore, either the fold of the TonB-box observed in our crystal structure was constrained by the crystallization conditions as it was also shown for BtuB using EPR⁴³ or the complex studied in solution resulted from nonspecific interactions between TonB and ShuA. In FhuA,^{44,45} FecA,^{34,46} and FpvA⁴⁷ a large conformational change of the N-terminal part containing the TonB-box occurs to interact with TonB upon the ferri-siderophore binding. In HasR-HasA-Heme,¹⁰ the N-terminal part containing the TonB-box was not observed in the electron density due to its flexibility. Upon the heme binding, the conformational change of the TonB-box probably occurs in ShuA for interacting with the periplasmic part of TonB.

The structural comparison with HasR suggested a conformational change of His86 and surrounding residues upon the heme binding. His86 is involved in two hydrogen bond networks. One hydrogen bond network goes from His86 to the conserved Arg43 located in a loop containing His44, Val45, Pro46, and Gly47. The second hydrogen bond network goes from His86 to the conserved Gln615 in loop L11 (Fig. 3). The loop L11 closes

a large cavity from the extracellular face and the bottom of the cavity is closed from the periplasm by the loop containing Arg43 and His44. The movement of both loop could be triggered upon the hydrogen bond perturbation due to the heme binding and transmitted to residues in their vicinity such as the conserved Agr64. Arg64 is involved in the lock region together with Arg104, Glu446, and Asp503. The lock region could be involved for the opening of a channel.³⁵ Arg64 interacts with a water molecule ($B = 26.61 \text{ \AA}^2$, overall B-factor average: 59.3 \AA^2) hydrogen bonded to the Gly47 carbonyl group. The movement of Arg64 could disturb the lock region and surrounding interactions such as those of Glu101 with Thr5, Val6, and Thr7 from the TonB-box (Fig. 6). This pathway for the signal transduction could lead to the conformational change of the TonB-box for interacting with TonB. Since, no transmembrane pore is observed in ShuA for the heme transfer, energy would allow for conformational changes of the plug to deliver heme to the periplasmic heme binding protein ShuT, which binds and transports heme to the ABC transporter ShuU/ShuV of the inner membrane.⁴⁸

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Shelley M. Payne from the Section for Molecular Genetics and Microbiology University of Texas at Austin for providing us the DNA encoding for ShuA. The authors thank the BL14 staff at BESSY and people of the MX group and BM30A beamline at ESRF for their kind assistance during the data collections.

REFERENCES

- Posey JE, Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 2000;288:1651–1653.
- Stintzi A, Barnes C, Xu J, Raymond KN. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10691–10696.
- Braun V, Killmann H. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* 1999;24:104–109.
- Ferguson AD, Deisenhofer J. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565:318–332.
- Velayudhan J, Hughes NJ, Mccolm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol* 2000;37:274–286.
- Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:154–171.
- Chen CJ, Sparling PF, Lewis LA, Dyer DW, Elkins C. Identification and purification of a hemoglobin-binding outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1996;64:5008–5014.
- Murphy ER, Sacco RE, Dickenson A, Metzger DJ, Hu Y, Orndorff PE, Connell TD. BhuR, a virulence-associated outer membrane protein of *Bordetella avium*, is required for the acquisition of iron from heme and hemoproteins. *Infect Immun* 2002;70:5390–5403.
- Cescau S, Cwerman H, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F. Heme acquisition by hemophores. *Biometals* 2007;20:603–613.
- Krieg S, Huché F, Diederichs K, Izadi-Pruneyre N, Lecroisey A, Wandersman C, Delepelaire P, Welte W. Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1045–1050.
- Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003;228:159–166.
- Sansonetti PJ. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:3–14.
- Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol* 2000;88:729–745.
- Burkhard KA, Wilks A. Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. Substrate specificity and identification of the heme protein ligands. *J Biol Chem* 2007;282:15126–15136.
- Mills M, Payne SM. Identification of ShuA, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a ShuA mutant. *Infect Immun* 1997;65:5358–5363.
- Brillet K, Meksem A, Lauber E, Reimann C, Cobessi D. Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallogr D* 2009;65:326–331.
- Brillet K, Meksem A, Thompson A, Cobessi D. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the TonB-dependent haem outer membrane transporter ShuA from *Shigella dysenteriae*. *Acta Crystallogr F* 2009;65:402–405.
- Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* 1993;26:795–800.
- Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* 2008;64:112–64122.
- Pape T, Schneider TR. HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J Appl Crystallogr* 2004;37:843–844.
- De La Fortelle E, Bricogne G. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol* 1997;276:472–494.
- Abrahams JP, Leslie AGW. Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F_1 ATPase. *Acta Crystallogr D* 1996;52:30–42.
- Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* 2004;60:2126–2132.
- Brunger AT. Version 1.2 of the crystallography and NMR system. *Nat Protoc* 2002;2:2728–2733.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D* 1997;53:240–255.
- CCP4. Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Crystallogr D* 1994;50:760–763.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–291.
- Delano WL. The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific; 2002.
- Brunger AT. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 1992;355:472–475.
- Krissinel E, Henrick K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D* 2004;60:2256–2268.
- Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, Van Der Helm D, Deisenhofer J. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 1999;6:56–63.

CHAPITRE VI

Caractérisation fonctionnelle des protéines impliquées dans le transport de la ferri-pyoverdine à travers la membrane interne chez *P. aeruginosa*

Introduction

VI.1. Caractérisation fonctionnelle des protéines de l'opéron *fpvCDEF*

Article IV

Meksem, A., Hoegy, F., Reimann, C., Journet, L., and Schalk, I.J. (en préparation)
A role for FpvCDEF in iron release from siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*

VI.2. Caractérisation fonctionnelle du transporteur ABC FpvGHJK

Article V

Meksem, A., Adams, H., Hoegy, F., Schalk, I.J. and Journet, L. (en préparation)
Involvement of FpvG in iron uptake through pyoverdine

INTRODUCTION

La souche *P. aeruginosa* PAO1 constitue le modèle d'étude du laboratoire. Chez cette bactérie, les mécanismes moléculaires de transport de la ferri-pyoverdine au travers de la membrane externe *via* le RTBD FpvA ont été largement étudiés. Les étapes consécutives à la fixation de la ferri-pyoverdine sur FpvA, qui restent encore mal connues, font actuellement l'objet de nombreuses études dont celle qui a fait l'objet de la deuxième partie de cette thèse. Dans les conditions de carence en fer, *P. aeruginosa* synthétise et sécrète dans le milieu extracellulaire, *via* la pompe à efflux PvdRT-OpmQ ATP-dépendante, un sidérophore majoritaire fluorescent : la Pvd ((Meyer & Abdallah, 1978) (Meyer & Hornspreger, 1978) (communication interne)). Celle-ci capte, avec une très forte affinité, et solubilise le Fe³⁺ puis le transfert à l'intérieur de la bactérie *via* le RTBD FpvA de manière TonB-dépendante ((Poole *et al.*, 1993) (Albrecht-Gary *et al.*, 1994) (Schalk *et al.*, 1999) (Schalk, 2008) (Schalk *et al.*, 2009)). La structure de FpvA a été résolue par le Dr D. Cobessi au sein du laboratoire sous ses différentes formes ((Cobessi *et al.*, 2005b) (Brillet *et al.*, 2007) (Wirth *et al.*, 2007)). Le site de liaison de la Pvd est localisé dans la région extracellulaire du récepteur et est composé essentiellement de résidus aromatiques appartenant au tonneau et au bouchon. Le domaine N-terminal du RTBD FpvA, localisé dans le périplasma, est composé de la boîte TonB et du domaine de signalisation. Ce dernier est impliqué dans la cascade de signalisation permettant la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer par la voie Pvd ((Lamont *et al.*, 2002) (Shen *et al.*, 2002) (Visca *et al.*, 2002) (Mettrick & Lamont, 2009)). Le transport de la ferri-pyoverdine par FpvA nécessite de l'énergie qui est fournie par la force proton-motrice à travers la membrane interne. Cette énergie est transmise à FpvA suite à l'interaction entre sa boîte TonB et le domaine C-terminal de la protéine TonB de la membrane interne (Adams *et al.*, 2006). Dans le périplasma, la ferri-pyoverdine se dissociait par un mécanisme impliquant une réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ et un échange de ligand (Greenwald *et al.*, 2007), cela suggère que seul le Fe²⁺ serait pris en charge et transporté dans le cytoplasme à travers la membrane interne. La dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine a été démontrée en utilisant des complexes qui ne se dissocient pas tels Pvd-Gallium (Pvd-Ga) et Pvd-Chrome (Pvd-Cr). Ces complexes s'accumulent ainsi dans le périplasma. Après dissociation, la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire, sans subir de modifications chimiques, par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ ATP-dépendante ((Schalk *et al.*, 2002) (Imperi *et al.*, 2009) (Yeterian *et al.*, in press)).

Dans le milieu extracellulaire, la Pvd recyclée est capable de lier à nouveau le fer et d'effectuer un nouveau cycle de transport membranaire (Schalk *et al.*, 2002). Les protéines impliquées dans la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺, dans la prise en charge du Fe²⁺ dans le périplasma et dans son transport à travers les membranes internes ne sont pas encore identifiées.

La biosynthèse cytoplasmique et la sécrétion de la Pvd, l'import de la ferri-pyoverdine et la régulation de l'expression des gènes de ce système sont gouvernés par une trentaine de gènes regroupés dans le locus *pvd* (**figure 40**) (Ravel & Cornelis, 2003). La fonction de certains de ces gènes est identifiée (**tableau 6**). Toutefois, nombreux gènes de ce locus coderaient pour des protéines membranaires ou périplasmiques de fonctions inconnues.

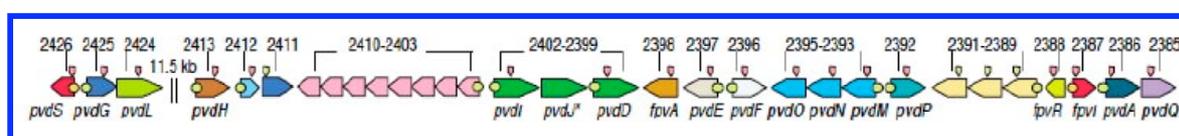


Figure 40 : Représentation schématique du locus *pvd* (Ravel & Cornelis, 2003)

Tableau 6 : Gènes du locus *pvd* et leur implication dans la voie Pvd

Gène	Nom	Fonction
PA2385	<i>pvdQ</i>	Synthèse
PA2386	<i>pvdA</i>	Synthèse
PA2387	<i>fpvI</i>	Régulation
PA2388	<i>fpvR</i>	Régulation
PA2389- PA2391	<i>ompQ</i> (PA2391)	Transport
PA2392	<i>pvdP</i>	Synthèse
PA2393	<i>pvdM</i>	Inconnue
PA2394	<i>pvdN</i>	Synthèse
PA2395	<i>pvdO</i>	Synthèse
PA2396	<i>pvdF</i>	Synthèse
PA2397	<i>pvdE</i>	Transport
PA2398	<i>fpvA</i>	Transport
PA2399- PA2402	<i>pvdDJI</i>	Synthèse
PA2403- PA2406	<i>fpvCDEF</i>	Objet de cette étude
PA2407- PA2410	<i>fpvGHJK</i>	Objet de cette étude
PA2411	-	Inconnue
PA2412	-	Inconnue
PA2413	<i>pvdH</i>	Synthèse
PA2424	<i>pvdL</i>	Synthèse
PA2425	<i>pvdG</i>	Inconnue
PA2426	<i>pvdS</i>	Régulation

Dans le locus *pvd* se trouvent les gènes du cluster *fpvCDEFGHJK* (PA2403-4-5-6-7-8-9-10), ce cluster est très conservé en entier dans le génome des *Pseudomonas* produisant la Pvd. La co-occurrence des gènes PA2403-4-5-6-7-8-9-10 suggère leur implication dans le même processus biologique. L'expression de ces gènes est induite dans les conditions de carence en fer et est régulée par le facteur σ PvdS, suggérant leur implication dans l'acquisition du fer par la Pvd ((Oschner *et al.*, 2000) (Ravel & Cornelis, 2003)). Ce cluster comprends deux opérons, *fpvCDEF* et *fpvGHJK*, séparés par 32 paires de bases (Llamas *et al.*, 2008). Les gènes *fpvCDEF* coderaient pour des protéines intégrales de la membrane interne. Ces protéines ne possèdent pas de motifs ou domaines particuliers permettant de leur attribuer une fonction. Les gènes *fpvGHJK* coderaient pour un transporteur ABC potentiel à fer/métal ((Oschner *et al.*, 2002) (Smith *et al.*, 2005) (Llamas *et al.*, 2008)).

Le but de cette partie du travail de thèse a été de caractériser l'implication de ces gènes candidats dans le transport du fer par la Pvd. L'analyse du phénotype de mutants de ces différents gènes vis-à-vis de l'acquisition du fer a été effectuée. L'incorporation du fer à travers la membrane externe *via* le RTBD FpvA a été suivie en utilisant de la ferri-pyoverdine dont le fer est radioactif (^{55}Fe). La dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine et le recyclage dans le milieu extracellulaire de la Pvd ont été analysés par spectroscopie de fluorescence grâce aux propriétés spectrales de la Pvd. La microscopie de fluorescence, sur les cellules, nous a permis de localiser la Pvd dans le périplasme. Ce travail devrait permettre de déterminer la fonction des protéines FpvCDEFGHJK et leur implication dans l'assimilation du fer chez *P. aeruginosa*. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires utilisés pour l'assimilation du fer est indispensable au développement d'une nouvelle génération d'antibiotiques ayant pour cible ces voies.

VI.1. Caractérisation fonctionnelle des protéines de l'opéron *fpvCDEF*

Discussion des résultats

Le gène *fpvC* (PA2403) coderait pour une protéine intégrale de la membrane interne de 403 acides aminés et d'un poids moléculaire de 45 kDa. Elle posséderait 5 hélices transmembranaires. L'extrémité N-terminale de FpvC serait localisée dans le cytoplasme. *fpvD* (PA2404) coderait pour une protéine intégrale de la membrane interne de 19,9 kDa et de 179 acides aminés. Cette protéine contiendrait un seul segment transmembranaire. *fpvE* (PA2405) coderait pour une protéine de 11,4 kDa et de 109 acides aminés possédant une séquence signal. *fpvF* (PA2406) coderait pour une protéine intégrale de la membrane interne de 19,4 kDa et de 186 acides aminés, pouvant contenir un ou deux segments transmembranaires.

Un mutant $\Delta fpvC$ a été construit par le Dr C. Reimann (Département de Microbiologie Fondamentale, Université de Lausanne, Suisse).

Nous avons montré que, dans les conditions de carence en fer, la croissance du mutant $\Delta fpvC$, sa capacité à produire de la Pvd et d'exprimer le RTBD FpvA n'ont pas été affectées. La ferri-pyoverdine se lie au récepteur FpvA avec une affinité comparable à celle qui a été observée dans une souche sauvage. Les expériences de transport, effectuées en utilisant de la Pvd chargée en fer radioactif (Pvd-⁵⁵Fe), ont montré que le mutant $\Delta fpvC$ était incapable d'incorporer la ferri-pyoverdine et d'accumuler le ⁵⁵Fe. Les étapes consécutives à la fixation de la ferri-pyoverdine sur le récepteur FpvA ont été visiblement abolies dans le mutant $\Delta fpvC$. Ainsi, nous n'avons pas observé la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine, ni le recyclage de la Pvd dans le milieu extracellulaire. La complémentation du mutant $\Delta fpvC$ avec un plasmide contenant les gènes *fpvC* ou *fpvDEF* ne permet pas de restaurer le phénotype au niveau sauvage. Par contre la complémentation du mutant $\Delta fpvC$ avec un plasmide contenant les gènes *fpvCDEF* permet de restaurer le phénotype sauvage capable d'incorporer la ferri-pyoverdine et d'effectuer les étapes consécutives à la liaison de la ferri-pyoverdine sur le RTBD FpvA. La délétion de *fpvC* aurait donc un effet polaire sur l'expression des autres gènes de l'opéron, *fpvDEF*.

Ces résultats suggèrent que la protéine FpvC est essentielle au transport du fer par le système Pvd. Ce transport est aussi dépendant de la présence d'au moins une des trois autres protéines du cluster FpvCDEF.

Il a été montré précédemment au laboratoire que la dissociation de la ferri-pyoverdine a lieu dans le périplasma et impliquait une réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ (Greenwald *et al.*, 2007).

Nous avons montré qu'*in vitro* la ferri-pyoverdine se dissociait en présence d'un réducteur comme le DTT ou l'acide ascorbique. L'efficacité de cette dissociation est fortement augmentée en présence d'un chélateur de l'ion Fe^{2+} , comme la ferrozine.

Ces données suggèrent qu'*in vivo* nous pourrions avoir un mécanisme similaire faisant intervenir une ou plusieurs protéines pour assurer la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , mais aussi une protéine chélatant le Fe^{2+} . Pour vérifier l'éventuelle implication des protéines FpvCDEF dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine, nous avons suivi l'incorporation du fer par la Pvd chez un mutant $\Delta fpvC$ en présence d'un agent réducteur, le DTT. En présence du DTT, l'incorporation du fer est restaurée au niveau sauvage pour le mutant $\Delta fpvC$, mais aussi pour des mutants complémentés avec le gène *fpvC* ou les gènes *fpvDEF*. Lorsque la souche est mutée au niveau du gène qui code pour le RTBD FpvA ($\Delta fpvA$), la présence du DTT ne permet pas d'incorporation du fer par la Pvd indiquant que l'effet du DTT est spécifique, dans le cas du mutant $\Delta fpvC$, et qu'il n'est pas extracellulaire. Si la dissociation de la ferri-pyoverdine était extracellulaire, elle serait suivie d'un transport du Fe^{2+} dans la bactérie par diffusion passive *via* les porines de la membrane externe même dans le cas du mutant $\Delta fpvA$ (absence du RTBD FpvA). En présence du DTT, les protéines FpvCDEF ne sont plus nécessaires au transport du fer par la Pvd, suggérant un rôle pour ces protéines, direct ou indirect, dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Les sidérophores ayant une affinité meilleure pour la forme ferrique du fer, comparée à la forme ferreuse, ce qui facilite la dissociation de la ferri-pyoverdine par réduction du fer ferrique en fer ferreux. Ces résultats suggèrent également un couplage entre le transport à travers la membrane externe, *via* FpvA, et l'étape de dissociation du fer de la ferri-pyoverdine dans le périplasma. FpvC, protéine de la membrane interne, doit probablement interagir avec le récepteur de la membrane externe FpvA, et la ferri-pyoverdine est immédiatement dissociée dès son entrée dans le périplasma. Les protéines codées par les gènes de l'opéron *fpvCDEF* n'ont pas d'homologies de séquences avec des réductases connues. Toutefois, la recherche d'éventuels domaines caractéristiques dans la séquence de *fpvC* révèle la présence d'un domaine appelé **PepSY** (résidus 60 à 119) et de deux domaines appelés **hélices transmembranaires associées au domaine PepSY (PepSY_TM)** (résidus 190 à 216 et 328 à 363). On retrouve les domaines PepSY dans des pro-peptides de protéases de la famille M4 des MEROPS (comme la thermo-lysine ou la bacillo-lysine) dans lesquels ils auraient une fonction inhibitrice de l'activité protéasique et dans de nombreuses autres protéines, comme les métalloprotéases et les protéines à activité oxydoréductase, dans lesquelles ils auraient une

fonction inconnue. L'analyse de la séquence de la protéine FpvC a également permis la détection d'un domaine **PiuB**, à fonction inconnue, que l'on retrouve dans d'autres protéines impliquées dans le transport du fer. La recherche du domaine PiuB dans le génome de *P. aeruginosa* révèle que 8 gènes contiennent ce type de domaine. Six d'entre eux sont situés à proximité des gènes codant pour des systèmes d'assimilation du fer. De façon intéressante, la protéine PiuB contient deux domaines : un domaine **PiuB** et un domaine **CysJ** qui aurait une fonction d'oxydo-réductase notamment dans le cas des protéines codées par les gènes PA3768 et PA4158. Il est intéressant de souligner que la protéine PiuB codée par le gène PA4513 à activité sulfite réductase putative, aurait 3 hélices PepSY_TM, et des domaines de liaison de la flavodoxine et du NAD.

Conclusion et perspectives

En conclusion, ce travail nous a permis d'identifier des protéines membranaires essentielles au transport du fer par la voie Pvd, FpvCDEF. Ces protéines seraient impliquées dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Il s'agit maintenant de confirmer cette hypothèse et d'étudier l'activité « réductase » des protéines du cluster FpvCDEF. Dans un premier temps, on peut envisager de travailler sur des préparations des membranes internes et essayer d'identifier laquelle des 4 protéines FpvCDEF est dotée d'une activité réductase et d'identifier le rôle exact des autres protéines du cluster. Dans un second temps, on peut surexprimer et purifier ces protéines individuellement et de vérifier *in vitro* leur implication dans la dissociation de la ferri-pyoverdine et leur rôle catalytique dans la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Il serait également intéressant, d'étudier les interactions protéine-protéine entre FpvC et FpvA et entre FpvC et TonB et d'essayer de comprendre pourquoi l'absence de FpvC, protéine de la membrane interne, empêche le RTBD FpvA, localisée dans la membrane externe, d'incorporer la ferri-pyoverdine. Il se pourrait également que l'absence de transport soit due à une interaction entre FpvC et FpvA, ou à une interaction indirecte *via* TonB qui régulerait l'activité de FpvA. Pour l'étude de ces interactions, il serait intéressant cloner le gène *fpvC* avec une étiquette polyHis ou fluorescente, afin de faciliter la purification de cette protéine et étudier ensuite ses interactions avec d'autres protéines du système d'acquisition du fer par la voie Pvd. Des constructions de ce type existent déjà au laboratoire pour la protéine TonB de la membrane interne.

Article IV (en préparation)

Ahmed Meksem^{1#}, Laure Journet^{1#}, Françoise Hoegy[#], Cornelia Reimann[§], Isabelle J. Schalk^{2#}

A role for FpvCDEF in iron release from siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*

[#]Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. FRE3211 CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

[§] Département de Microbiologie Fondamentale, Bâtiment Biophore, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

¹These authors contributed equally to this work

²To whom correspondence should be addressed: Isabelle J. Schalk, Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. FRE 3211, ESBS, Blvd Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

Tel: +33 3 68 85 47 19; Fax: +33 3 68 85 48 29; E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* *FpvCDEF* GENES ARE INVOLVED IN IRON RELEASE FROM THE SIDEROPHORE PYOVERDINE

Ahmed Meksem[#], Françoise Hoegy[#], Cornelia Reimmann[§], Laure Journet^{1,#}, Isabelle J. Schalk^{1,2,#}

[#]Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. FRE3211 CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

[§]Département de Microbiologie Fondamentale, Université de Lausanne, Bâtiment Biophore, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Running Title: Involvement of *FpvCDEF* in ferripyoverdine dissociation

¹These authors contributed equally to this work

²To whom correspondence should be addressed: Isabelle J. Schalk, Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. FRE 3211, ESBS, Blvd Sébastien Brandt, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France. Tel: 33 3 68 85 47 19; Fax: 33 3 68 85 48 29; E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

Siderophores have an extremely high affinity for Fe(III). The resulting stable ferrisiderophore complexes are dissociated either by iron reduction or by chelator degradation. Pyoverdine (PVDI), the major siderophore produced by *Pseudomonas aeruginosa*, consists of a fluorescent chromophore linked to an octapeptide. We followed the kinetics of iron release from this siderophore *in vitro* and *in vivo*, in living cells, by monitoring the fluorescence of PVDI (as apo PVDI is fluorescent whereas PVDI-Fe(III) is not). Iron was released *in vitro* in the presence of DTT, and the formation of apo PVDI was promoted by ferrozine, an Fe(II) chelator. *In vivo*, the deletion of *fpvC* (PA2403) completely abolished PVDI-Fe uptake. PVDI-Fe uptake and iron release from the siderophore were restored by complementation with a plasmid carrying the *fpvCDEF* genes (PA2403-06) or by adding DTT. The mutation is thus polar and these genes seem to be involved in PVDI-Fe dissociation by iron reduction. Fluorescence microscopy studies, in the presence of DTT, of strains with deletions of *fpvC* and/or *pvdRTopmQ*, encoding the efflux pump involved in PVDI-recycling, confirmed that iron was released from PVDI in the periplasm via a mechanism involving metal reduction and *FpvCDEF*. Moreover, when iron could not be released from PVDI due to the presence of hydrogen peroxide or *fpvC* mutation, PVDI-Fe was not transported into the bacteria, demonstrating direct coupling

between PVDI-Fe transport across the outer membrane by *FpvAI* and iron release from PVDI in the periplasm.

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative opportunistic human pathogen. It has become a major cause of infections, particularly in immunocompromised individuals, and is also particularly dangerous for cystic fibrosis patients. This bacterium also has minimal nutritional requirements and can tolerate a wide variety of physical conditions, but, like all living organisms, it requires iron for its growth. Iron is abundant in the Earth's crust, but its availability is severely limited by the very low solubility of iron(III) at physiological pH. In the presence of oxygen, iron(II) is rapidly oxidized to iron(III), which precipitates as a polymeric oxyhydroxide. The concentration of free iron(III) at physiological pH has been estimated between 10^9 to 10^{-18} M. For optimal growth, bacteria require an iron concentration of about 10^{-6} M, and they have developed several strategies for increasing their access to this essential element. One of the most common strategies used involves the synthesis of siderophores and their release into the extracellular medium (1,2). These molecules have a low molecular weight (200 to 2000 Da) and an extremely high affinity for ferric iron, with K_a values of 10^{43} and 10^{32} M⁻¹ for enterobactin and pyoverdine, respectively (3,4). All fluorescent *Pseudomonas* species produce and secrete pyoverdines as their principal siderophores, but the pyoverdine pathway of *P. aeruginosa* PAO1 is the only such pathway to

have been investigated at the molecular level. Pyoverdine I (PVDI), the siderophore produced by *P. aeruginosa* PAO1, is a partly cyclic octapeptide linked to a chromophore derived from 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, which renders the molecule both colored and fluorescent (5,6).

Siderophores chelate iron in the extracellular medium and the resulting ferrisiderophore complex is then transported back into the bacteria. This uptake always involves a specific outer membrane transporter, FpvAI in the case of PVDI-Fe in *P. aeruginosa* (7-9). The protonmotive force of the inner membrane drives this transport across the outer membrane via an inner membrane complex comprising TonB, ExbB, and ExbD (10,11). Once in the periplasm, the fate of the ferrisiderophore is strain- and siderophore-specific. For example, in the ferrichrome and enterobactin pathways in *Escherichia coli*, iron is released from the siderophore in the cytoplasm and the translocation of ferrichrome and ferrienterobactin across the inner membrane involves an ABC transporter (12-16). Iron release from ferrichrome in *E. coli* probably involves iron reduction (17), followed by acetylation of the siderophore and its recycling in the growth medium (18). In the ferrienterobactin pathway, a cytoplasmic esterase hydrolyses the siderophore (19). In addition to PVDI, *P. aeruginosa* PAO1 can make use of ferrichrome (20-22). In the ferrichrome pathway in *P. aeruginosa*, translocation across the inner membrane involves two permeases but no ABC transporter (20,23). Metal release from the siderophore involves the acylation of ferrichrome and the recycling of the siderophore in the extracellular medium, as in *E. coli* (20). For PVDI, iron is released from the siderophore in the periplasm, via a mechanism involving no chemical siderophore modification but an apparent reduction of iron (24,25) and the recycling of the siderophore into the extracellular medium by PvdRT-OpmQ, an ATP-dependent efflux pump (25-27). The cellular location of PVDI-Fe dissociation was determined with gallium (Ga^{3+}), a metal that cannot be removed from PVDI by reduction. PVDI-Ga is taken up by *P. aeruginosa*, but no dissociation occurs and PVDI-Ga accumulates in

the periplasm (24,25). The proteins and the precise mechanism involved in metal reduction and iron release from PVDI have not been identified. All the genes involved in PVDI synthesis and iron uptake by this siderophore map to the *pvd* locus (28). The functions of most of these genes have been determined, with the exception of a cluster of genes organized into two operons separated by 32 bp, the PA2403-2406 and PA2407-2410 operons. These operons are conserved in most *Pseudomonas* species, with the exception of the non-fluorescent *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas mendocina*. The expression of PA2403-10 is regulated by iron and PvdS (28,29), together with two other ECF factors (21). Mutation of genes in these two operons does not affect bacterial growth and PVDI production (29).

In this study, we investigated the involvement of PA2403 (*fpvC*) and the PA2404-6 (*fpvDEF*) genes in iron uptake through PVDI. The mutation of PA2403 abolished the transport of PVDI-Fe into the periplasm by FpvAI, although this receptor was still able to bind PVDI-Fe. The addition of dithiothreitol (DTT) to the cells restored both uptake and iron release from PVDI in the periplasm, despite a lack of expression of the genes of PA2403-06, suggesting a role of this operon in iron release from PVDI in the periplasm.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and siderophores. The protonophore CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone), hydrogen peroxide (H_2O_2) and ferrozine were purchased from Sigma, DTT from EuroMedex, and ascorbic acid from Alpha Aesar. PVDI- ^{55}Fe was prepared from purified PVDI as described previously (3,30) using [^{55}Fe]Cl $_3$ from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, USA).

Bacterial strains and growth media. All strains used in this study are presented in Table 1. *Escherichia coli* TOP10 and DH5 α were used as host strains for plasmid constructions. Bacteria were usually grown on nutrient agar and in nutrient yeast broth (NYB) at 37°C (31) or in succinate medium (composition in g/L is :

K₂HPO₄, 6.0; KH₂PO₄, 3.0; (NH₄)₂SO₄, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 0.2; sodium succinate, 4.0 and the pH was adjusted to 7.0 by addition of NaOH) where iron availability is limited. Antibiotics were added to growth media at the following concentrations: kanamycine, 25 µg/ml for *E. coli* and 300 µg/ml for *P. aeruginosa*; tetracycline, 25 µg/ml for *E. coli* and 100 µg/ml for *P. aeruginosa*; ampicillin, 100 µg/ml for *E. coli*; carbenicillin, 250 µg/ml for *P. aeruginosa*. To counterselect *E. coli* donor cells in matings with *P. aeruginosa*, chloramphenicol was used at a concentration of 10 µg/ml.

DNA manipulations and sequencing. DNA manipulations were performed according to standard procedures (32) with enzymes purchased from Fermentas. Small- and large-scale preparations of plasmid DNA were made with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Inc.) and Jetstar kit (Genomed GmbH), respectively. DNA fragments were purified from agarose gels using the MinElute and QIAquick Gel Extraction kits from Qiagen (Qiagen, Inc.). Transformation of *E. coli* and *P. aeruginosa* was carried out by electroporation (33) or using a MgCl₂-based method for *P. aeruginosa* (34). All constructs involving PCR techniques were verified by sequence analysis carried out commercially.

Construction of plasmids and gene replacement mutants. A DNA fragment carrying the *fpvC* (PA2403) open reading frame and 363 bp of its upstream region was PCR-amplified from genomic DNA of PAO1 using oligos n°44 (GTCTAGATTTCGATAAAGCGGCGGGCGAG C) a n d n ° 2 2 (GTCAAAGCTTTCATGGCTGTCCCTCCGC) which generated restriction sites for XbaI and HindIII at the ends. This fragment was first ligated into pJET1.2/blunt and then subcloned via XbaI and HindIII into the broad-host-range vector pUCP18, generating pLJ67. Similarly, a DNA fragment carrying *fpvCDEF* with flanking sequences (500 bp upstream of *fpvC* and 326 bp downstream of *fpvF*) was PCR-amplified from PAO1 genomic DNA using XbaI-tagged oligo n°16 (GATCTCTAGAACATGCGCTGCTGGGCGT AG) and BamHI-tagged oligo n°45

(GGGATCCTCATGCGCTCGGCGAAATCGT C). This fragment was ligated into pJET1.2/blunt and then subcloned via XbaI and BamHI into pUCP18 to yield pLJ74.

To construct plasmid pME7598, which was used to remove the *fpvC* codons 4 to 403 in different *P. aeruginosa* strains, two 0.7-kb PCR fragments were amplified from PAO1 chromosomal DNA using the primer pairs PA2403-1 (ACGTGGATCCAGGCAACCTCCAGGGGGC G; BamHI-tagged) together with PA2403-2 (CGACATGAGGCTAACGGTAGG), and PA2403-3 (ACCGTTAGCCTCATGTGCGAAATGAGCAA GGCCGCCGTTGCC) together with PA2403-4 (ACGTAAGCTTGTAGCCGATCACGTCGAG G; HindIII-tagged). An equimolar mixture of these fragments then served as template to amplify, in a subsequent PCR reaction with primers 2403-1 and 2403-4, a 1.4-kb fragment which was cloned between the BamHI and HindIII sites of pME3087. Plasmid pME7598 was then mobilised from *E. coli* DH5α into the *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO6382, and PAO1*pvdDpvdRTompQ* using the helper plasmid pME497 and chromosomally integrated with selection for tetracycline resistance. Excision of the vector via a second crossing over was obtained by enrichment for tetracycline-sensitive cells (35), to generate the corresponding mutants PAO6598, PAO6662, and PAO1*pvdDpvdRTompQfpvC*, respectively. Mutants with *fpvC* deletions were identified by PCR.

Immunoblot analysis. Cell extracts (OD_{600 nm} = 0.2) were analyzed on SDS-PAGE and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting (Bio-Rad). Nitrocellulose membranes were blocked by incubation for 1 h in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6, 10 % dried milk powder) and subsequently incubated in blocking buffer first with the primary antibody anti-FpvAI (36), then with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG as the secondary antibody (Sigma, dilution 1/10000). Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce).

⁵⁵Fe uptake. PVDI-⁵⁵Fe was prepared as reported previously (30). An overnight culture in iron-limited medium was harvested and the bacteria prepared at an OD₆₀₀ of 1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and incubated at 37°C. Transport assays were initiated by adding 100 nM of PVDI-⁵⁵Fe as described previously (30). Aliquots (100 µL) of the suspension were removed at different times, filtered, washed with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and the retained radioactivity was counted. For the experiments carried out in the presence of DTT or H₂O₂, the cells were preincubated during 15 min in the presence of 2 mM DTT or 2 mM H₂O₂. The ⁵⁵Fe uptake assays were repeated for all strains and experimental conditions studied in the presence of 200 µM CCCP.

Ligand-binding assays. For the *in vivo* determination of the apparent dissociation constant of PVDI-Fe to FpvAI, we used the filtration assay described previously (30). After an overnight growth in succinate medium, PAO6382 and PAO6662 cells were washed in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and prepared at an OD₆₀₀ of 0.3 and incubated at 0°C in a final volume of 500 µl, in the presence of 200 µM of the protonophore CCCP and varying concentrations of PVDI-⁵⁵Fe (10 to 100 µM; 2.1 Ci/mmol), for 1 h.

Fluorescence Spectroscopy. Fluorescence experiments were performed with a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrofluorometer. For all experiments, the sample was stirred at 29°C in a 1 mL cuvette, the excitation wavelength (λ_{exc}) was set at 400 nm (for direct excitation), and the emission of fluorescence (λ_{em}) was measured at 447 nm. The cells were washed with 2 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and resuspended in the same buffer to a final OD₆₀₀ of 1. PVDI-Fe was added and the fluorescence at 447 nm was measured every 300 ms for the duration of the experiment. When the experiment was carried out in the presence of DTT, the cells were preincubated during 15 min with 150 µM DTT. For the *in vitro* dissociation of PVDI-Fe, the experiments were carried out with 0.2 mM PVDI-Fe, 2 mM DTT (preincubated during 15 min with the cells before addition of PVDI-Fe),

2 mM ferrozine and 2 mM ascorbic acid in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

UV spectroscopy. PVDI-Fe dissociation *in vitro* was carried out in 50 mM TrisHCl (pH 8.0) buffer, in the presence of 0.2 mM PVDI-Fe, 2 mM DTT and/or 2 mM ferrozine and the absorbance was monitored at 563 nm.

Fluorescence microscopy. Cells were grown overnight in succinate medium and then mounted onto S750-agarose coated slides, as described previously (25,37). Images were acquired on a Nikon 50i (objective : CFI Achroplan 100X A ON 1,25 DT 0,18) microscope with a numeric 12 bits DS-Fi1 camera. Images were captured using imaging software NIS elements.

Recycling experiments. After overnight growth in succinate medium, cells were washed with 2 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), resuspended in the same buffer to a final OD₆₀₀ of 0.7, and incubated in the presence of 2 µM PVDI-Fe at 30 °C in 10 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. 1 mL aliquots were pelleted every 15 min, and the fluorescence emission was monitored (λ_{ex} = 400 nm) in the corresponding supernatants containing the recycled PVDI. The experiment was repeated with cells preincubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) with 2 mM DTT during 15 min.

RESULTS

***fpvCDEF* are predicted to encode inner membrane proteins.** Bioinformatic methods predict that the locus tags PA2403, PA2404, PA2405 and PA2406 (hereafter called *fpvC*, *fpvD*, *fpvE* and *fpvF*) form an operon (<http://www.pseudomonas.com>). The start and stop codons of these genes overlap, suggesting that their expression may be coupled. The nucleotide sequence of *fpvC* encodes a predicted 403-amino acid, 45 kDa inner membrane protein (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). The predicted membrane topology of this protein includes four or five transmembrane helices (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_f

[orm.html](#)). Pfam analysis of FpvC suggested the presence of a PepSY domain (Pfam PF03413, amino acids 60 to 119) (38). The *fpvD* gene is predicted to encode a 179-amino acid, 19.9 kDa inner membrane protein with one potential transmembrane segment. The next ORF in the operon, *fpvE*, is thought to encode a 109-amino acid (11.4 kDa) protein with a signal sequence (39), whereas the last gene of the operon, *fpvF*, is thought to encode a 186-amino acid protein with a molecular mass of 19.4 kDa. One or two transmembrane segments are predicted for FpvF, indicating a possible cytoplasmic membrane location. FpvC is the only one of the proteins with any conserved domains or special features.

PVDI-⁵⁵Fe does not accumulate in a *fpvC* deletion mutant. We assessed the ability of an *fpvC* deletion mutant to transport and accumulate iron in the presence of PVDI, in a PVDI-⁵⁵Fe uptake assay. PVDI concentration was controlled precisely, by performing the experiment with the pyoverdine-negative *P. aeruginosa* mutant PAO6382 and its *fpvC* deletion derivative PAO6662. Bacteria were incubated in the presence of PVDI-⁵⁵Fe and the radioactivity incorporated into the cells was monitored. ⁵⁵Fe was readily incorporated into PAO6382 cells, whereas no ⁵⁵Fe accumulation was observed in the *fpvC* deletion mutant PAO6662 (Fig. 1A). ⁵⁵Fe accumulation in PAO6662 was largely restored by pLJ74, a pUCP18 derivative carrying the *fpvCDEF* genes. By contrast, no complementation was observed with the *fpvC*-containing plasmid pLJ67. This indicated that the *fpvC* mutation has a polar effect on expression of the downstream genes and that some or all of these genes are involved in PVDI-mediated ⁵⁵Fe uptake. The polar effect is probably due to removal of the putative *fpvD* ribosome binding site as a result of *fpvC* deletion. For each strain, we repeated the experiment after treating the cells with the protonophore CCCP. This compound inhibits the protonmotive force (PMF) of the bacteria and, therefore, also inhibits TonB-dependent uptake (40). As expected, no iron uptake occurred with CCCP-treated cells (Fig. 1).

The *fpvC* mutation abolishes iron uptake without affecting the ability of FpvAI to bind

PVDI-Fe. The absence of ⁵⁵Fe accumulation in the *fpvC* deletion mutant PAO6662 (Fig. 1A) may be due to *fpvCDEF* playing a direct role in the iron uptake process or to an indirect effect, such as the production of smaller amounts of FpvAI or the inability of this transporter to bind PVDI-Fe. We therefore compared the amounts of FpvAI in cell extracts from the wild-type strain PAO1 and its *fpvC* deletion derivative PAO6598. Immunoblot analysis showed the amounts of the receptor protein to be similar in the two strains (Fig. 2). We also measured the affinity of PVDI-Fe for the FpvAI receptor and obtained similar dissociation constants for the pyoverdine-negative strain PAO6382 ($K_d = 0.29$ nM) and its *fpvC*-deletion derivative PAO6662 ($K_d = 0.4$ nM). We thus conclude that the lack of ⁵⁵Fe accumulation in the *fpvC* deletion mutant is due to neither the presence of smaller amounts of FpvAI nor lower levels of binding of PVDI-Fe to the receptor.

The PvdRT-OpmQ efflux pump has recently been implicated in the recycling to the extracellular medium of PVDI after the transport and release of iron into the bacterial periplasm (25,26). Mutation of the gene encoding this pump does not affect PVDI-⁵⁵Fe uptake, but completely inhibits PVDI recycling after iron release (25,26). The absence of ⁵⁵Fe accumulation in an *fpvC* mutant could be due either to the absence of PVDI-⁵⁵Fe uptake by FpvAI or immediate recycling by PvdRT-OpmQ without iron release in the periplasm. No accumulation of PVDI-⁵⁵Fe was observed in a double *fpvC* and *pvdRTopmQ* mutant (Figure 1B), indicating that apparently PVDI-⁵⁵Fe is not incorporated into a *fpvC* mutant. Altogether these data indicate, that PVDI-⁵⁵Fe is not transported into an *fpvC* mutant despite the ability of FpvAI to bind this complex with an affinity equivalent to the one found in a wild type strain.

DTT restores PVDI-⁵⁵Fe transport in a *fpvC* deletion mutant. We have previously shown that iron release from PVDI in *P. aeruginosa* PAO1 probably involves iron reduction in the periplasm (24,25). We investigated whether the proteins encoded by the *fpvCDEF* genes were involved in this step, by determining ⁵⁵Fe levels in the presence of the reducing agent DTT

(Figure 3A), which was added to the bacterial cells before PVDI-⁵⁵Fe. Surprisingly, the *fpvC* deletion mutant PAO6598 incorporated similar amounts of ⁵⁵Fe to the wild-type strain PAO1, in the presence of 2 mM DTT, with similar iron uptake kinetics. The addition of DTT had no effect on ⁵⁵Fe uptake in strain PAO1. ⁵⁵Fe incorporation was no longer observed after the addition of the protonophore CCCP, demonstrating the dependence of iron uptake in the presence of DTT on TonB. Indeed, no ⁵⁵Fe accumulated in the FpvAI receptor mutant PAO*fpvA* in the presence of DTT (Figure 3A). Bacterial ⁵⁵Fe accumulation in the presence of DTT therefore does not result from the passive diffusion of ferrous iron across the outer membrane via porins, but is instead due to the FpvAI-dependent uptake of PVDI-⁵⁵Fe. Thus, addition of the reducing agent DTT restores the FpvAI/PVDI-dependent uptake of ⁵⁵Fe in a *fpvC* deletion mutant.

H₂O₂ abolishes PVDI-⁵⁵Fe uptake in PAO1. We investigated the importance of a metal reduction step in PVDI-Fe dissociation further, by monitoring PVDI-⁵⁵Fe uptake in PAO1 cells in the presence of an oxidizing agent, H₂O₂. DTT had no effect on PVDI-⁵⁵Fe uptake (Figure 3A and B), whereas H₂O₂ inhibited iron incorporation completely (Figure 3B), confirming that iron uptake via the PVDI pathway involves a reduction step. Moreover, the absence of PVDI-⁵⁵Fe uptake in the presence of H₂O₂ suggests that PVDI-⁵⁵Fe is not transported by FpvAI if iron is not removed from the siderophore in the periplasm.

In vitro, DTT-promoted iron dissociation from PVDI-Fe is enhanced by ferrozine. We investigated the mechanism involved in iron release from PVDI in more detail, by studying this process *in vitro*, with DTT as the reducing agent and ferrozine as the ferrous iron chelator. Ferrozine is used as a reagent and indicator for Fe²⁺ because it forms a stable magenta-colored complex (absorption peak at 562 nm) with ferrous iron (41). As the apo form of the siderophore is fluorescent but the PVDI-Fe complex is not (excitation at 400 nm, emission at 447 nm) (42,43), the release of iron from the PVDI-Fe complex can be followed by

monitoring the fluorescence of apo PVDI. An increase in fluorescence, corresponding to the formation of metal-free PVDI, was observed when PVDI-Fe was incubated in the presence of DTT (Figure 4A). The addition of ferrozine led to a larger increase in fluorescence, suggesting that ferrozine increases the efficiency of PVDI-Fe dissociation in the presence of DTT, probably by chelating the ferrous iron formed. We thus followed the formation of the ferrous ferrozine complex, by monitoring the absorbance at 562 nm over time (Figure 4B). The kinetics of complex formation was similar to that for the formation of metal-free PVDI (Figure 4A), except that the plateau was reached later. We next assessed the effect of pH on the dissociation of PVDI-Fe in the presence of DTT and ferrozine. We found that the optimal pH was pH 8.0 (Figure 4C). Finally, we followed iron release from PVDI in the presence of ascorbic acid, a reducing agent and chelator of ferrous iron. In the presence of ascorbic acid, iron was released from the complex as efficiently as in the presence of DTT and ferrozine (Figure 4D). Thus, Fe³⁺ can be removed from PVDI by metal reduction, and the rate of dissociation is faster in the presence of an Fe²⁺ chelator.

DTT restores iron release from PVDI in the periplasm of a *fpvC* deletion mutant. We investigated whether DTT also restored the ability of a *fpvC* mutant to accumulate PVDI-⁵⁵Fe, by following the *in vivo* kinetics of iron release from PVDI in the presence and absence of DTT (Figure 5). Iron release from PVDI can be followed *in vivo*, in real time, by exciting the bacteria at 400 nm and monitoring fluorescence at 447 nm (24). Cells of the PVDI-negative mutant PAO6382 and its *fpvC* deletion derivative PAO6662 were incubated with PVDI-Fe and fluorescence was recorded at 447 nm (Figure 5A). Consistent with previous findings (24), an increase in fluorescence was observed following the addition of PVDI-Fe to PAO6382, corresponding to the dissociation of PVDI-Fe (formation of fluorescent apo PVDI) in the bacterial periplasm. DTT did not accelerate or modify the kinetics of PVDI-Fe dissociation in PAO6382. The addition of PVDI-Fe to PAO6662 cells resulted in no significant increase in fluorescence, which is consistent with

the absence of PVDI-⁵⁵Fe incorporation in this mutant (Figure 1). However, an increase in fluorescence was observed following the addition of DTT to PAO6662 cells, indicating apo PVDI formation. The kinetics of apo PVDI formation was similar in PAO6382 and PAO6662 cells, but about 25% less apo PVDI was formed in the *fpvC* deletion mutant. To investigate if the fluorescence increase observed with PAO6662 cells was not simply caused by DTT-induced PVDI-Fe dissociation that would also occur to some extent in the absence of cells (see Figure 4A), we performed control experiments in which we assessed apo PVDI formation with DTT in the absence of cells and with cells of a PVDI mutant in which the *fpvA* receptor gene had been deleted (PAO*pvdFfpvA*). We found that at least 30% more apo PVDI was formed with PAO6662 cells in the presence of DTT than with cells of PAO*pvdFfpvA* or in the absence of cells. DTT thus restores PVDI-Fe uptake and iron release in the *fpvC* deletion mutant.

The kinetics of PVDI-Fe dissociation was also monitored in PAO6662 cells complemented with the *fpvCDEF* genes. Compared to PVDI-Fe dissociation in PAO6382, dissociation was restored to about 80% in PAO6662 cells carrying pLJ74, whereas 100% dissociation was observed following the addition of DTT to the complemented strain (Figure 5B).

Studies based on fluorescence microscopy and cellular fractionation on PVDI deficient *P. aeruginosa* strains have previously shown that PVDI-Fe dissociation occurs in the periplasm (24-26). The effect of DTT on PVDI-Fe uptake and iron release by the *fpvC* deletion mutant was therefore also investigated in fluorescence microscopy experiments. An accumulation of fluorescence was observed for PAO6662 only in the presence of both PVDI-Fe and DTT (Figure 6), showing that DTT allows PVDI-Fe to enter the bacteria and to release iron from the siderophore in the periplasm. By contrast, DTT did not promote the accumulation of fluorescence following the addition of PVDI-Fe to the pyoverdine receptor-negative strain PAO*pvdFfpvA*, confirming that PVDI-Fe uptake requires the FpvAI receptor in the presence of DTT.

PVDI recycling in the fpvC deletion mutant is restored by DTT. The data presented above demonstrate that DTT restores PVDI-⁵⁵Fe accumulation in a *fpvC* deletion mutant, together with iron release from the siderophore in the periplasm. However, the PVDI-Fe uptake pathway in *P. aeruginosa* also involves the recycling of apoPVDI from the periplasm into the extracellular medium via the PvdRT-OpmQ efflux system (25,26). It is possible to monitor this recycling by incubating PVDI-negative strains with PVDI-Fe. Following the uptake of PVDI-Fe and the release of iron in the periplasm, apoPVDI becomes fluorescent, and its recycling can be followed by monitoring increases in the fluorescence of the extracellular medium after removal of the cells by centrifugation. Fluorescence at 447 nm increased markedly in the culture supernatant of PAO6382 cells, regardless of the presence or absence of DTT, demonstrating the recycling of apoPVDI in the extracellular medium (Figure 7). By contrast, no increase in fluorescence was observed in the extracellular medium of the *fpvC* deletion mutant PAO6662. However, the addition of DTT to the cells led to an increase in fluorescence at 447 nm over time similar to that observed with PAO6382. The fluorescence emission spectrum of the culture medium after removal of the cells was typical of that for iron-free PVDI (data not shown). As the *fpvC* deletion mutant used in this experiment cannot synthesize PVDI *de novo*, these results strongly suggest that, in the presence of DTT, iron uptake via the PVDI pathway is entirely restored. Thus, after receptor-mediated PVDI-Fe uptake, iron is released in the periplasm and apoPVDI is recycled to the extracellular medium.

DISCUSSION

Recent publications have shown that the fate of PVDI-Fe in PAO1, after its translocation across the outer membrane by FpvAI, is clearly different from those of ferrichrome and ferrienterobactin after their entry into *E. coli* cells. For these two iron uptake pathways in *E. coli*, the ferrisiderophore is further transported into the cytoplasm and the metal is released from the siderophore by a mechanism involving iron reduction for ferrichrome (17) and enzymatic

siderophore degradation for ferrienterobactin (19). In the PVDI iron uptake pathway in *P. aeruginosa*, the iron is released from the siderophore in the periplasm by a mechanism that probably involves iron reduction. This was demonstrated with PVDI-Ga complexes, as Ga³⁺ cannot be reduced. When incubated in the presence of PVDI-Ga, *P. aeruginosa* cells are able to transport this complex, like PVDI-Fe, by FpvAI, but the metal is not released from the siderophore. The complex therefore accumulates in the periplasm and no metal-free PVDI is recycled by PvdRT-OpmQ (24,25). A mechanism of PVDI-Fe dissociation involving metal reduction is also consistent with the *in vitro* PVDI-Fe dissociation studies carried out here. PVDI-Fe dissociated in the presence of a reducing agent, such as DTT, but the rate of dissociation was increased by the addition of an Fe²⁺ chelator, such as ferrozine. Previous studies have shown that PVDI chelates Fe²⁺ (44), suggesting that, in the absence of Fe²⁺ trapping by ferrozine or another Fe²⁺ chelator, PVDI binds both Fe³⁺ and Fe²⁺, and only small amounts of metal-free PVDI are formed. In the presence of ferrozine or ascorbic acid, ferrozine-Fe²⁺ and ascorbic-Fe²⁺ complexes are formed and iron is released from PVDI. This observation suggests that efficient PVDI-Fe dissociation *in vivo* requires both Fe³⁺ reduction and an exchange process in which the Fe²⁺ formed interacts with another chelator having a higher affinity for the reduced metal than PVDI. This is consistent with the findings of Mies and collaborators who showed that, despite the kinetic inertia and thermodynamic stability of the siderophore ferrioxamine B, together with the difficulty of reducing this compound, the formation of a ternary complex with another chelator facilitates the reduction and release of bound iron in the range of pH found *in vivo*, by the physiological reducing agents glutathione and ascorbic acid (45).

The *in vivo* data presented here suggest clearly that the *fpvCDEF* genes are involved in iron acquisition by the PVDI pathway and, more precisely, in iron release from PVDI-Fe in the periplasm. In an *fpvC* deletion mutant, PVDI-Fe bound FpvAI, but did not enter the bacteria, despite the presence of FpvAI in amounts similar

to those in PAO1. Complementation experiments with plasmids carrying either *fpvC* or *fpvCDEF* showed that the wild-type phenotype was restored with *fpvCDEF* but not with *fpvC*, indicating that the *fpvC* mutation is polar and that FpvC is not the only protein encoded by the *fpvCDEF* operon required for transport of PVDI-Fe. DTT completely restored PVDI-Fe uptake in the *fpvC* deletion mutant and this transport was dependent on FpvAI and protonmotive force. This was not due to the dissociation of PVDI-Fe by iron reduction in the extracellular medium followed by passive diffusion of Fe²⁺ into the cells via porins. PVDI and iron, in either its ferric or ferrous form, enter the bacteria as a complex via FpvA. As the rate of apo PVDI formation was higher in the presence of cells of the *fpvC* deletion mutant than when PVDI-Fe and DTT were incubated together in the absence of cells, the Fe²⁺ formed must be trapped in the bacterium by a chelator with a higher affinity than PVDI for the reduced form of iron. Fluorescence microscopy showed that fluorescent apo PVDI accumulated in the periplasm, demonstrating that ligand exchange for iron occurs in the periplasm. In this scenario, the inner membrane FpvC and at least one of the other proteins encoded by the *fpvCDEF* operon must be involved in iron reduction for the PVDI iron uptake pathway, and an as yet unidentified protein must bind the Fe²⁺ formed.

None of the proteins encoded by *fpvCDEF* displays any similarity to known reductases. FpvC appears to have a PepSY domain (amino acids 60 to 119). PepSY domains are found in the propeptides of peptidases of the M4 family and are thought to inhibit protease activity, but they are also found in many non-peptidase proteins of unknown function (46). Analysis of the *P. aeruginosa* PAO1 genome suggests that this organism has five PepSY domain-containing proteins: PA2403, three proteins of unknown function (PA2658, PA2659 and PA3789), and an elastase, in which the PepSY domain has been shown to have inhibitory activity (47). Interestingly, PA3789 is predicted to belong to the same operon as *oprC*, a gene encoding a TonB-dependent copper receptor (48). Further studies are required to investigate this family of proteins and their role in iron uptake by siderophores.

Overall, PVDI-⁵⁵Fe uptake assays (Figure 3) and the kinetics of PVDI-Fe dissociation (Figure 4) indicate that, in a *fpvC* deletion mutant, PVDI-Fe uptake and subsequent iron release from the siderophore into the periplasm may be restored by DTT. These observations led us to suggest that at least one protein from the *fpvCDEF* operon must be involved in the mechanism of PVDI-Fe dissociation in the periplasm. Our data also strongly suggest that the iron uptake and iron release steps are linked: uptake through FpvAI occurs only if the PVDI-Fe complex can be dissociated in the bacterial periplasm. Further

studies are now required to improve our understanding of the exact mechanism of Fe(III) reduction for PVDI-Fe dissociation in the *P. aeruginosa* periplasm and of the molecular roles of FpvC and FpvDEF in this iron reduction step.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS), a grant from the ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, No. ANR-08-BLAN-0315-01). A. Meksem held a fellowship from the French *Ministère de la Recherche et de la Technologie*.

REFERENCES

1. Boukhalfa, H., and Crumbliss, A. L. (2002) *Biometals* **15**(4), 325-339
2. Braun, V. (2003) *Front. Biosci.* **8**, 1409-1421
3. Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A. Z., and Abdallah, M. A. (1994) *Inorg. Chem.* **33**, 6391-6402
4. Raymond, K. N., Dertz, E. A., and Kim, S. S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**(7), 3584-3588
5. Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M. T., and Dell, A., Abdallah, M.A. (1990) *Biol. Metals* **3**, 155-170
6. Wasielewski, E., Atkinson, R. A., Abdallah, M. A., and Kieffer, B. (2002) *Biochemistry* **41**(41), 12488-12497
7. Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2005) *J. Mol. Biol.* **34**, 121-134
8. Poole, K., Neshat, S., Krebs, K., and Heinrichs, D. E. (1993) *J. Bacteriol.* **175**(15), 4597-4604
9. Schalk, I. J. (2008) *J. Inorg. Biochemi.* **102**, 1159-1169
10. Postle, K., and Kadner, R. J. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**(4), 869-882
11. Postle, K., and Larsen, R. A. (2007) *Biometals* **20**(3-4), 453-465
12. Chenault, S. S., and Earhart, C. F. (1991) *Mol. Microbiol.* **5**(6), 1405-1413
13. Koster, W. (1991) *Biol. Met.* **4**(1), 23-32
14. Koster, W. (2001) *Res. Microbiol.* **152**(3-4), 291-301
15. Koster, W., and Braun, V. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **204**(3), 435-442
16. Koster, W., and Braun, V. (1989) *Mol. Gen. Genet.* **217**(2-3), 233-239
17. Matzanke, B. F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein, A. X., and Hantke, K. (2004) *Biochemistry* **43**(5), 1386-1392
18. Hartman, A., and Braun, V. (1980) *J. Bacteriol.* **143**(1), 246-255
19. Brickman, T. J., and McIntosh, M. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**(17), 12350-12355
20. Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L., Shanzer, A., and Schalk, I. J. (2010) *J. Bacteriol.* **192**, 1212-1220

21. Llamas, M. A., Mooij, M. J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008) *Mol. Microbiol.* **67**(2), 458-472
22. Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006) *J. Bacteriol.* **188**(5), 1882-1891
23. Cuiv, P. O., Keogh, D., Clarke, P., and O'Connell, M. (2007) *J. Bacteriol.* **189**(1), 284-287
24. Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L. A., Graumann, P. L., and Schalk, I. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2987-2995
25. Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., and Schalk, I. J. (2010) *Environ. Microbiol. Report* **2**(3), 412-418
26. Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**(48), 20440-20445
27. Schalk, I. J., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2002) *Biochemistry* **41**(5), 1663-1671
28. Ravel, J., and Cornelis, P. (2003) *Trends Microbiol.* **11**(5), 195-200
29. Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., and Vasil, M. L. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**(5), 1277-1287
30. Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**(2), 351-360
31. Stanisich, V. A., and Holloway, B. W. (1972) *Genet. Res. Camb.* **19**, 91-108
32. Sambrook, J., Russel, D. W., and Irwin, N. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY
33. Farinha, M. A., and Kropinski, A. M. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* **58**(2), 221-225
34. Mercer, A. A., and Loutit, J. S. (1979) *J. Bacteriol.* **140**(1), 37-42
35. Ye, R. W., Haas, D., Ka, J. O., Krishnapillai, V., Zimmermann, A., Baird, C., and Tiedje, J. M. (1995) *J. Bacteriol.* **177**(12), 3606-3609
36. Voulhoux, R., Filloux, A., and Schalk, I. J. (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 3317-3323
37. Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., and Schalk, I. J. (2009) *Amino Acids* **38**(5), 1447-1459
38. Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., and Bateman, A. (2010) *Nucl. Acids Res.* **38**(Database issue), D211-222
39. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) *J. Mol. Biol.* **340**(4), 783-795
40. Clément, E., Mesini, P. J., Pattus, F., Abdallah, M. A., and Schalk, I. J. (2004) *Biochemistry* **43**, 7954-7965
41. Stookey, L. L. (1970) *Anal. Chem.* **42**(7), 779-781
42. Folschweiller, N., Schalk, I. J., Celia, H., Kieffer, B., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (2000) *Mol Membr Biol* **17**(3), 123-133
43. Schalk, I. J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M. A., and Pattus, F. (1999) *Biochemistry* **38**(29), 9357-9365
44. Xiao, R., and Kisaalita, W. S. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(4), 1472-1476
45. Mies, K. A., Wirgau, J. I., and Crumbliss, A. L. (2006) *Biometals* **19**(2), 115-126
46. Yeats, C., Rawlings, N. D., and Bateman, A. (2004) *Trends Biochem. Sci.* **29**(4), 169-172
47. McIver, K. S., Kessler, E., and Ohman, D. E. (2004) *Microbiology* **150**(Pt 12), 3969-3977
48. Yoneyama, H., and Nakae, T. (1996) *Microbiology* **142** (Pt 8), 2137-2144

49. Hoegy, F., Lee, X., Noël, S., Mislin, G. L., Rognan, D., Reimann, C., and Schalk, I. J. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**(22), 14949-14957
50. Shirley, M., and Lamont, I. L. (2009) *J. Bacteriol.* **191**(18), 5634-5640
51. Schweizer, H. P. (1991) *Gene* **97**(1), 109-121
52. Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., and Haas, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(24), 14073-14078
53. Voisard, C., Bull, C., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., Défago, G., and Haas, D. (1994) Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches. In: O'Gara, F., Dowling, D. N., and Boesten (eds). *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*, VCH, Weinheim, Germany

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain/ Plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>P. aeruginosa</i> strains		
PAO1	Wild-type	Laboratory stock
PAO1 <i>pvdDpvdRTopmQ</i>	$\Delta pvdD \Delta pvdRTopmQ$	(25)
PAO1 <i>pvdDpvdRTopmQfpvC</i>	$\Delta pvdD \Delta pvdRTopmQ \Delta fpvC$	This study
PAO6382	$\Delta pvdF$	(49)
PAO6598	$\Delta fpvC$	This study
PAO6662	$\Delta pvdF \Delta fpvC$	This study
PAO <i>fpvA</i>	$\Delta fpvA$	(50)
PAO <i>pvdFfpvA</i>	<i>pvdF::Kan</i> $\Delta fpvA$; Km ^R	(50)
<i>E. coli</i> strains		
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $_{(mrr-hsdRMS mcrBC)}$, $_{80lacZ_M15}$, $_{lacX74}$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $_{(ara,leu)7697}$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
DH5 α	$_{80lacZ_M15}$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> , <i>m_K</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $_{(lacZYA-argF) U169}$, <i>phoA</i>	(32)
Plasmids		
pUCP18	ColE1, broad-host-range plasmid; Ap ^R	(51)
pJET1.2/blunt	Rep (pMB1), <i>bla</i> , <i>eco47IR</i> , PlacUV5; Ap ^R	Fermentas
pME497	Mobilizing plasmid; Ap ^R	(52)
pME3087	Suicide vector; ColE1 replicon; EcoRI KpnI DraII XhoI HindIII polylinker; Tc ^R	(53)
pME7598	pME3087 carrying the 700-bp flanking regions of <i>fpvC</i> on a 1.4-kb BamHI- HindIII fragment	This study
pLJ67	pUCP18 carrying <i>fpvC</i> on a XbaI-HindII fragment	This study
pLJ74	pUCP18 carrying <i>fpvCDEF</i> on a XbaI- BamHI fragment	This study

FIGURE LEGENDS

Figure 1: A. PVDI-⁵⁵Fe uptake is abolished in an *fpvC* deletion mutant. *P. aeruginosa* cells at an OD₆₀₀ of 1 were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) during 15 min before transport assays were started by adding 100 nM PVDI-⁵⁵Fe. Aliquots (100 μl) of the suspension were removed at different times, filtered and the retained radioactivity counted (PAO6382, ○; PAO6662, □; PAO6662/pLJ67, ◇; PAO6662/pLJ74, ▽). The experiment was repeated at 0°C in the presence of 200 μM CCCP (PAO6382, ●; PAO6662, ■; PAO6662/pLJ67, ◆; PAO6662/pLJ74, ▼).

B. PVDI-⁵⁵Fe uptake in the *fpvC* deletion mutant is not restored by a mutation in *pvdRTopmQ*. ⁵⁵Fe uptake assays were carried out as above with PAO6382 (○), PAO6662 (□), and PAO1*pvdDpvdRTopmQfpvC* (◇). The experiment was repeated with cells pretreated with 200 μM CCCP (PAO6382, ●; PAO6662, ■; PAO1*pvdDpvdRTopmQfpvC*, ◆). The experiments shown in panels A and B were repeated three times with comparable results.

Figure 2: Immunoblot of PAO1 and PAO6598 cells with polyclonal anti-FpvAI antibodies.

Figure 3 : Effect of DTT and H₂O₂ on PVDI-⁵⁵Fe uptake. A. *P. aeruginosa* cells at an OD₆₀₀ of 1 were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) during 10 min before transport assays were started by adding 100 nM PVDI-⁵⁵Fe. Aliquots (100μl) of the suspensions were removed at different times, filtered and the retained radioactivity was counted (PAO1, ○; PAO6598, □). The experiment was repeated in the presence of 2 mM DTT (PAO1, △; PAO6598, ◇; PAO*fpvA*, ▽) and also at 0°C in the presence of 200 μM CCCP (PAO1, ● ; PAO6598, ■) or 200 μM CCCP plus 2 mM DTT (PAO1, ▲; PAO6598, ◆; PAO*fpvA*, ▼). **B.** PVDI-⁵⁵Fe uptake in PAO1 cells was carried out as in panel A, in the absence or presence of 2 mM DTT or 2 mM H₂O₂ (PAO1, ○; PAO1 with DTT, △; PAO1 with H₂O₂, ◇). The uptake assays were repeated in the presence of 200 μM CCCP at 0°C (PAO1, ●; PAO1 with DTT, ▲; PAO1 with H₂O₂, ◆). All the experiments shown in panels A and B were repeated three times with comparable results.

Figure 4: Dissociation of PVDI-Fe *in vitro*. **A.** 0.2 mM PVDI-Fe in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) was incubated in the absence (○) or presence of 2 mM ferrozine (□), 2 mM DTT (◆), 2 mM ferrozine plus 2 mM DTT (●). The change in fluorescence (excitation set at 400 nm) was monitored by measuring the emission of fluorescence at 447 nm, every second, for 60 minutes. As a control, the experiment was repeated with ferrozine alone in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (◇). **B.** 0.2 mM PVDI-Fe in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) was incubated in the absence (○) or presence of 2 mM ferrozine (□), 2 mM DTT (◆), 2 mM ferrozine plus 2 mM DTT (●). The change in absorbance at 563 nm was monitored every second, for 60 minutes. As a control, the experiment was repeated with ferrozine alone in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (◇). **C.** 0.2 mM PVDI-Fe was incubated in the presence of 2 mM ferrozine and 2 mM DTT in a 200 mM sodium phosphate buffer set at pH8 (●), pH 7 (◆), pH 6.4 (■), and pH 5.8 (▲). The change in fluorescence (excitation set at 400 nm) was monitored by measuring the emission of fluorescence at 447 nm, every second, for 60 minutes. As a control, the four kinetics were repeated in the absence of DTT (pH 8.0, ○; pH 7.0, ◇; pH 6.4, □; pH 5.8, △).

D. 0.2 mM PVDI-Fe in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) was incubated in the absence (○) or presence of 2 mM ferrozine (□), 2 mM ascorbic acid (■), 2 mM ferrozine plus 2 mM DTT (▲). The change in fluorescence (excitation set at 400 nm) was monitored by measuring the emission of fluorescence at 447 nm, every second, for 60 minutes. As a control, the experiment was repeated with ferrozine alone in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (◇).

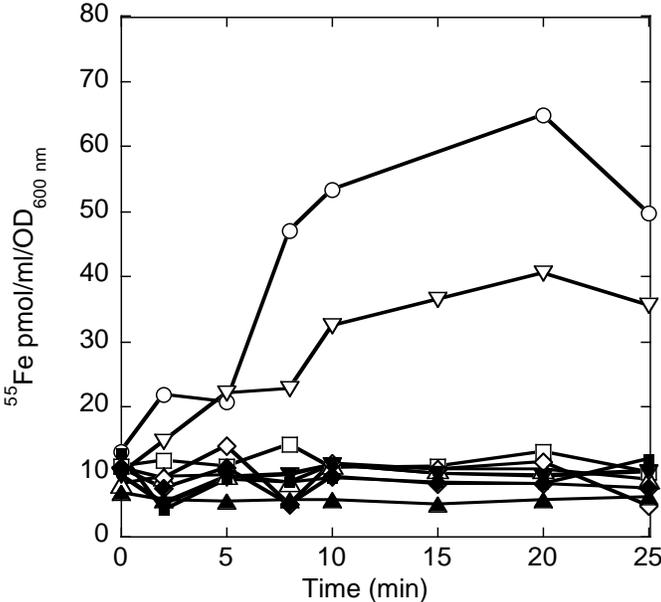
For panels A, C and D, F₀ = fluorescence at time t₀ and F = fluorescence at time t. For panel B, A₀ = absorbance at time t₀ and A = absorbance at time t.

Figure 5 : PVDI-Fe dissociation kinetics monitored by direct excitation of PVDI. Cells were washed and resuspended to an OD_{600} of 1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and incubated at 29°C. Fluorescence at 447 nm under excitation at 400 nm was monitored. Addition of 300 nM PVDI-Fe to the cells is shown by an arrow. **A.** PVDI-Fe dissociation kinetics were monitored in PAO6382 cells (red lines), PAO6662 (green lines) and PAO*pvdFfpvA* (blue lines) in the absence of DTT (○). The experiment was repeated for all cells in the presence of 150 μM DTT (□) and as a control in the absence of both PVDI-Fe and DTT (△). PVDI-Fe dissociation was also monitored without cells, in the presence of 300 nM PVDI-Fe and 150 μM DTT (black line, ○). **B.** PVDI-Fe dissociation kinetics were monitored in PAO6662 complemented with the *fpvCDEF* genes on plasmid (pLJ74) (red lines) and in PAO6382 cells (black line) in the absence (○) and in the presence of 150 μM DTT (□). As a control, the experiment was repeated in the absence of both PVDI-Fe and DTT (△). For panel A, C and D, F_0 = fluorescence at time t_0 and F = fluorescence at time t .

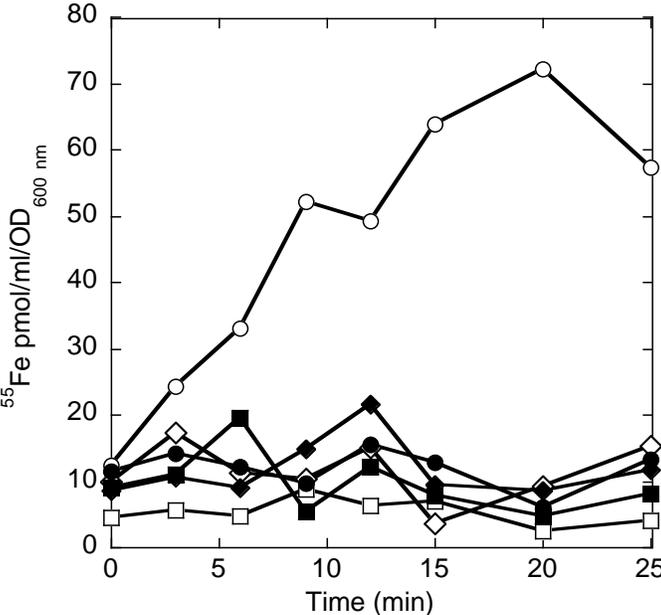
Figure 6: Cellular accumulation of apoPVDI visualised by epifluorescence microscopy. The experiment was carried out with *P. aeruginosa* cells following incubation for 45 min with 10 μM PVDI-Fe and in the presence or absence of DTT prior to mounting onto S750-agarose coated slides. Pictures on the right were taken with Ex 425-445HQ, Ex 400-440, Em 470, Dc 455 (filter specification), those on the left with light microscopy (White bar = 2 μm).

Figure 7 : PVDI recycling in PAO6662 is restored by DTT. PAO6382 (○) and PAO6662 (□) cells at an OD_{600} of 1 were incubated in the presence of 3 μM PVDI-Fe. At different times, cell from 1 mL aliquots were removed, and the fluorescence of the culture supernatant was monitored ($\lambda_{exc} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 447$ nm). The experiment was repeated in the presence of 2 mM DTT (PAO6382 (●) and PAO6662 (■)).

Figure 1



A.



B.

Figure 2

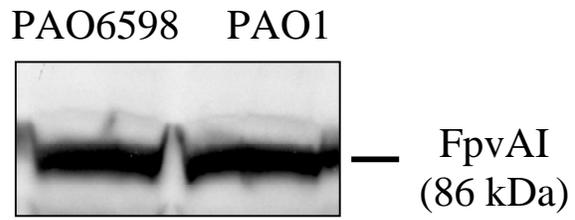
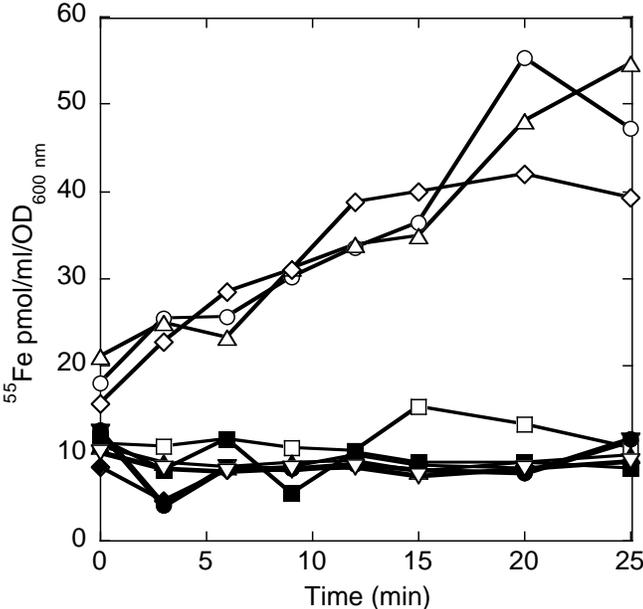
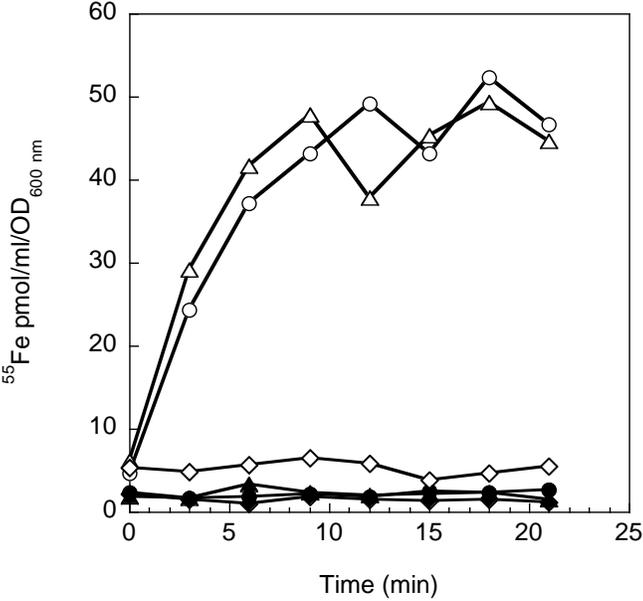


Figure 3



A.



B.

Figure 4

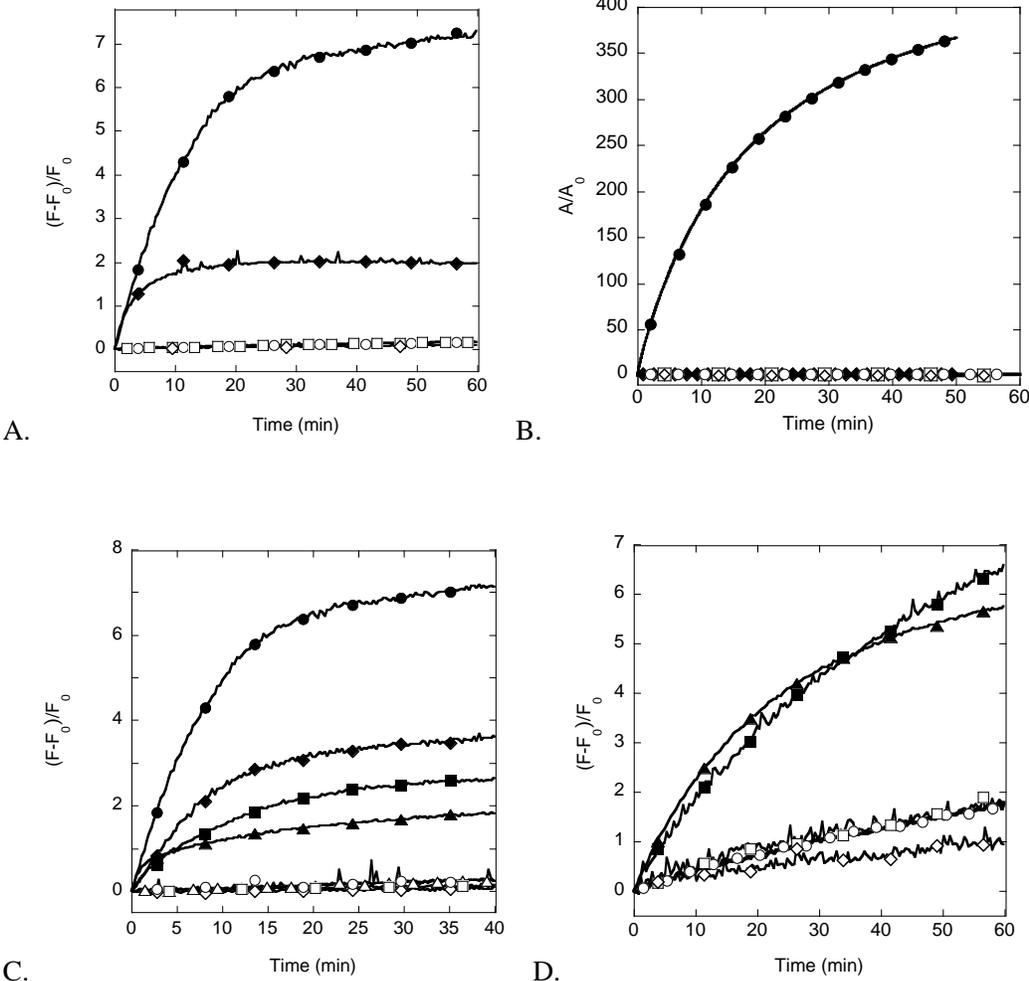
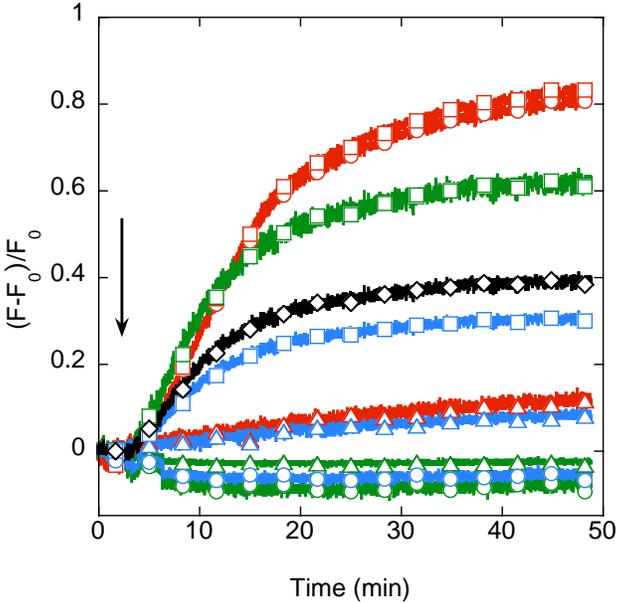
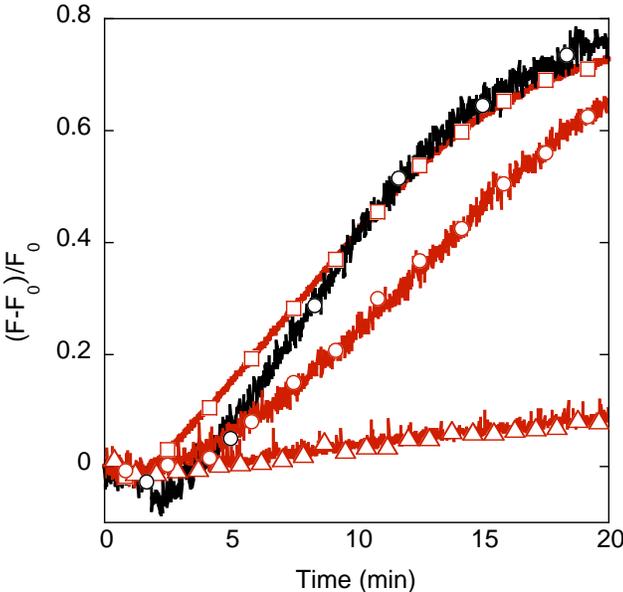


Figure 5



A.



B.

Figure 6

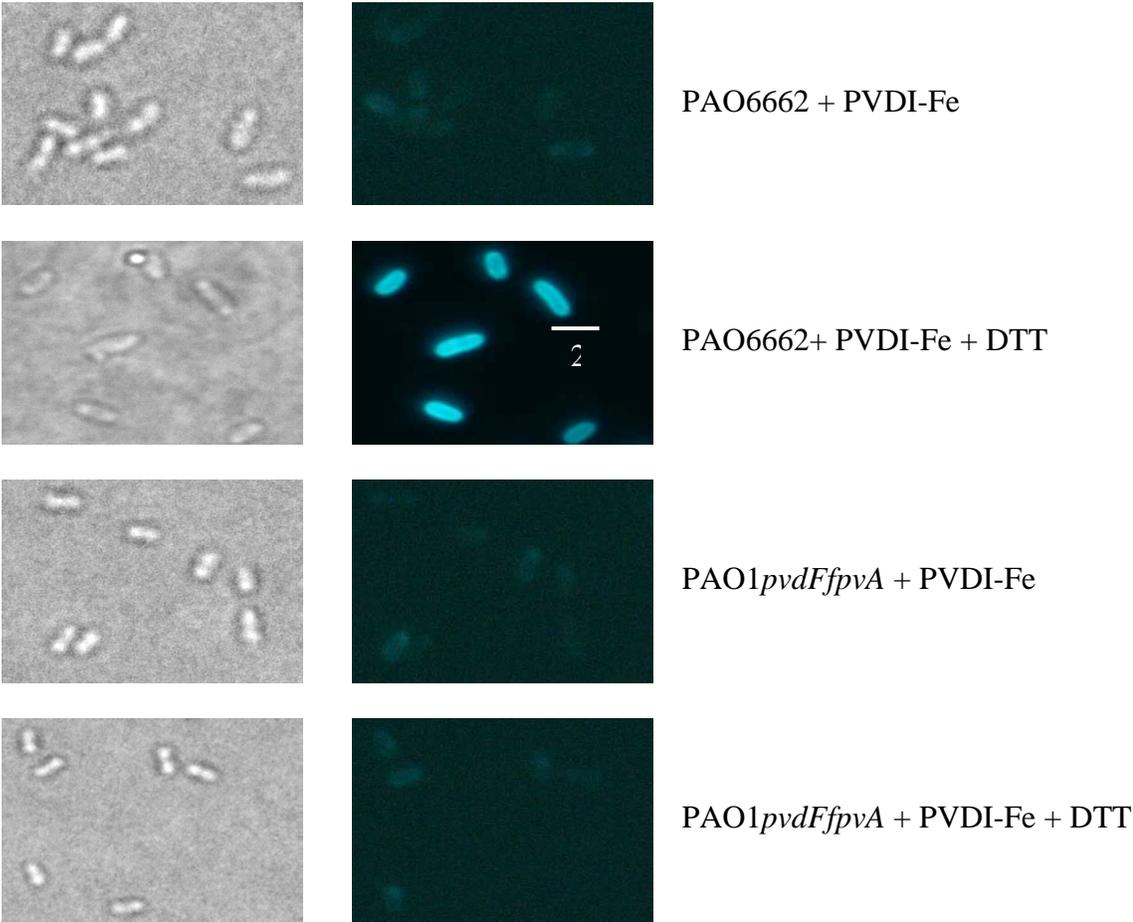
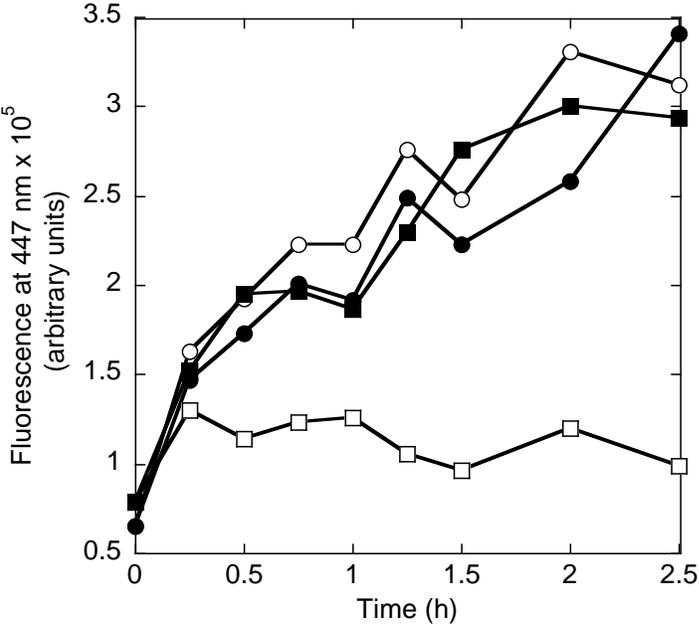


Figure 7



VI.2. Caractérisation fonctionnelle du transporteur ABC FpvGHJK

Discussion des résultats

Chez *P. aeruginosa*, rien n'est connu du mécanisme et des protéines impliquées dans le transport du fer à travers la membrane interne pour la voie Pvd. L'opéron *fvpGHJK*, faisant partie du cluster *fvpCDEFGHJK*, coderait pour un transporteur ABC potentiel à fer/métal et pourrait être un candidat pour cette étape du transport du fer. FpvG (PA2407) correspondrait à une première protéine périplasmique affine (PBP1) d'environ 30 kDa contenant 279 acides aminés, FpvH (PA2408) aux sous-unités ATPase, FpvJ (PA2409) à la perméase et FpvK (PA2410) pourrait correspondre à une seconde protéine périplasmique affine (PBP2).

La protéine FpvG a été clonée au laboratoire par le Dr H. Adams. Nous l'avons surexprimée en milieu riche dans *E. coli* BL21 (DE3) et purifiée à partir d'une préparation périplasmique. Des anticorps poly-clonaux dirigés contre cette protéine ont été produits. Ils nous ont permis, entre autres, de montrer par immuno-blot que l'expression de FpvG était augmentée dans les conditions de carence en fer, comme c'est le cas, classiquement, de toutes les protéines impliquées dans l'assimilation du fer.

Un mutant pour lequel tout le transporteur ABC est délété ($\Delta fvpGHJK$) a été construit au laboratoire par le Dr L. Journet. Dans les conditions de carence en fer, la croissance de ce mutant, sa capacité à produire de la Pvd et d'exprimer le récepteur FpvA n'ont pas été affectés. La liaison de la ferri-pyoverdine au récepteur FpvA, son incorporation et sa dissociation périplasmique ainsi que le recyclage de la Pvd dans le milieu extracellulaire n'ont pas, non plus, été affectés dans le mutant $\Delta fvpGHJK$, suggérant que ce transporteur ne serait pas essentiel au transport du fer par la voie Pvd ou pourrait être remplacé par un autre transporteur.

Différents domaines solubles des protéines du système Pvd ont été clonés, au laboratoire, par le Dr M. Nader et purifiés par moi-même. Nous avons effectué une étude systématique *in vitro*, par pontage chimique au formaldéhyde et par co-purification, de l'interaction de ces différents domaines solubles avec la protéine FpvG. Cette approche nous a permis de montrer une interaction entre le domaine périplasmique du récepteur FpvA, constitué du domaine de signalisation et de la boîte TonB (FpvA₄₄₋₁₃₉-(His)₆), et la protéine FpvG. L'utilisation de la technique du Biacore nous a permis de montrer une interaction entre les protéines FpvA et FpvG. L'existence de telles interactions est en faveur d'un rôle pour la protéine FpvG, et pour le transporteur ABC, dans l'assimilation du fer par la Pvd. La protéine FpvG surexprimée en milieu riche a été analysée par spectrométrie de masse dans les conditions natives et dénaturantes (en collaboration avec le Dr N. Potier, Institut de Science et

d'Ingénierie Supramoléculaires, Université de Strasbourg). Dans les deux cas, cette analyse a permis d'obtenir la masse de la protéine FpvG et celle d'une molécule de 59 Da qui pourrait correspondre au fer. Des analyses par spectrométrie de flamme ont confirmé la présence de fer dans les échantillons de la protéine FpvG.

Conclusion et perspectives

Ces résultats sont en faveur de l'implication de la protéine FpvG dans l'acquisition du fer par la Pvd. L'état actuel des connaissances, concernant la voie Pvd, nous conduit à supposer que la protéine FpvG pourrait prendre en charge le fer après dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine. L'absence de phénotype concernant l'acquisition du fer par la voie Pvd du mutant $\Delta fpvGHJK$ suggère qu'un autre transporteur pourrait être utilisé par la bactérie en son absence.

Comme suite à ce travail, il faudrait d'abord valider, *in vivo*, les interactions observées, *in vitro*, entre le RTBD FpvA et la PBP FpvG. Ensuite, il est également essentiel d'identifier la forme, ferrique ou ferreuse, du fer lié à FpvG. Ceci pourra être effectué en utilisant la spectroscopie RPE (Résonance Paramagnétique Electronique), ce type de spectroscopie permettant de visualiser uniquement la forme ferrique du fer et non la forme ferreuse.

Il serait également intéressant de continuer à étudier le mécanisme de dissociation de la ferri-pyoverdine *in vitro* en présence de DTT et de la protéine FpvG en suivant la formation de l'apo Pvd par fluorescence. Si la présence de FpvG active la dissociation de la ferri-pyoverdine comme c'est le cas pour la ferrozine, nous pourrions conclure quant à son implication dans le processus de dissociation du fer de son sidérophore selon le mécanisme proposé pour la ferrioxamine (Mies *et al.*, 2006). Par ailleurs, le gène *fpvK* semble coder pour une seconde protéine périplasmique, FpvK. Il faudrait surexprimer et purifier cette protéine et étudier ses interactions avec le fer, l'apo Pvd et la ferri-pyoverdine et aussi son éventuel rôle dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine.

Il a été montré récemment au laboratoire, que l'apo Pvd, après avoir libéré le fer dans le périplasma, interagissait avec une protéine périplasmique. Du FRET a été observé *in vivo* entre l'apo Pvd et une protéine du périplasma. La protéine FpvG ne possède pas de Trp dans sa séquence permettant d'effectuer du FRET avec la Pvd, mais FpvK en possède 3 et constitue de ce fait candidat pouvant lier la Pvd et effectuer du FRET.

L'absence d'expression des gènes *fpvGHJK* ne montre pas de phénotype caractéristique concernant le transport du fer par la voie Pvd. Il serait donc intéressant de muter d'autres transporteur ABC à métaux et vérifier ainsi leur implication dans le transport du fer où du moins la possibilité qu'ils puissent prendre le relais en l'absence de FpvGHJK. Enfin, il serait intéressant de cristalliser et résoudre la structure des protéines FpvG et FpvK. La connaissance de ces structures pourrait apporter une aide importante à la connaissance du fonctionnement du transporteur FpvGHJK et son rôle exact dans la voie d'acquisition du fer par la Pvd chez *P. aeruginosa*.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, nous permet de suggérer un modèle de transport de fer dans lequel les protéines FpvCDEF seraient impliquées dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce dernier ayant une affinité plus faible pour la Pvd que la forme ferrique. Aucune de ces 4 protéines ne possède de domaines à activité oxydo-réductrice, mais il est raisonnable de penser qu'elles pourraient recruter de tels domaines et intervenir ainsi indirectement dans la dissociation de la ferri-pyoverdine. Après dissociation de la ferri-pyoverdine, l'ion Fe^{2+} serait pris en charge par la protéine FpvG, pour éviter les dommages dus à son accumulation, avant d'être transporté à travers la membrane interne *via* FpvJ en utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP par FpvH. La protéine FpvG pourrait également être impliquée dans la dissociation de la ferri-pyoverdine en jouant le même rôle que celui de la ferrozine *in vitro*. En effet ce chélateur du fer ferreux active la dissociation de la ferri-pyoverdine. Ce mécanisme pourrait impliquer la formation rapide d'un complexe, ferri-pyoverdine-FpvG, similaire à celui qui a été décrit pour la ferrioxamine B d'*E. coli*. Dans ce cas, un complexe se forme entre ferrioxamine B et un chélateur du fer ferreux, facilitant la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et la formation du complexe chélateur- Fe^{2+} au détriment du complexe sidérophore- Fe^{3+} (Mies *et al.*, 2006). L'implication de FpvG et FpvK dans ce type de mécanisme pour la dissociation de la ferri-pyoverdine reste à déterminer. Nous ignorons, également, si FpvG récupère la ferri-pyoverdine directement du RTBD FpvA, ou si elle la complexe dans le périplasme après son internalisation par FpvA.

Après dissociation de la ferri-pyoverdine, la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par une pompe à efflux ((Imperi *et al.*, 2009) (Yeterian *et al.*, in press)). Dans le milieu extracellulaire, la Pvd recyclée est capable de lier de nouveau le fer et de le transporter dans le périplasme de la bactérie (Schalk *et al.*, 2002).

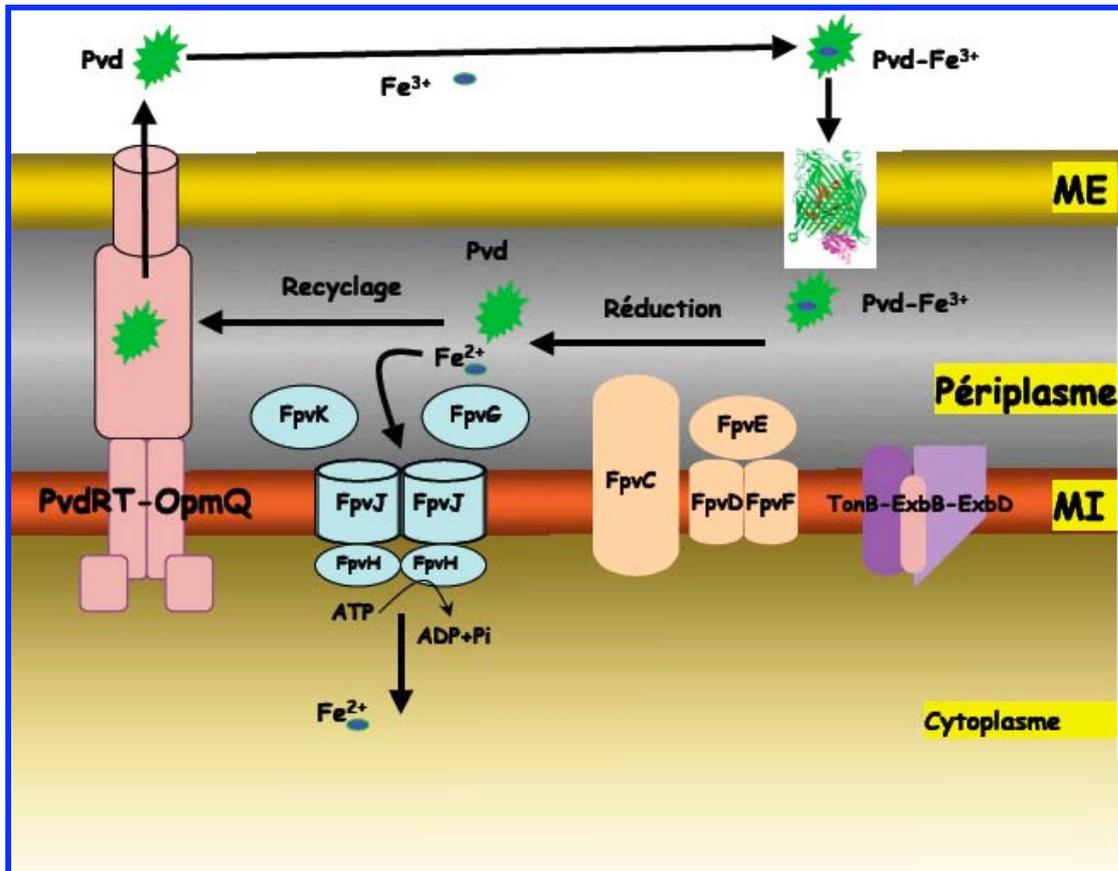


Figure 41 : Devenir périplasmique de la ferri-pyoverdine chez *P. aeruginosa*

La ferri-pyoverdine est importée à travers la membrane externe par le RTBD FpvA. Cette étape requiert de l'énergie apportée par le système TonB de la membrane interne. Dans le périplasm, les protéines du cluster FpvCDEF seraient impliquées dans la dissociation de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Le Fe^{2+} est probablement pris en charge par la protéine affine FpvG, faisant partie du transporteur ABC. Les autres éléments de ce transporteur peuvent assurer le transport à travers la membrane interne et l'internalisation du Fe^{2+} . La Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ et est capable de lier le Fe^{3+} et d'effectuer un nouveau cycle de transport.

Article V (en préparation)

Ahmed Meksem, Hendrick Adams, Françoise Hoegy, Isabelle J. Schalk* and Laure Journet

Involvement of FpvG in iron uptake through pyoverdine

Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. FRE 3211 CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

*To whom correspondence should be addressed:

Isabelle J. Schalk

Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications.

FRE 3211 CNRS-Université de Strasbourg-ESBS

Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

Blvd Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

Tel: 33 3 68 85 47 45; Fax: 33 3 68 85 48 29; E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

INVOLVEMENT OF FPG IN IRON UPTAKE THROUGH PYOVERDINE

Ahmed Meksem, Hendrick Adams, Françoise Hoegy, Isabelle J. Schalk*, Laure Journet

Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications. IREBS, FRE3211, CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

*To whom correspondence should be addressed:

Isabelle J. Schalk

Métaux et Microorganismes : Chimie, Biologie et Applications.

FRE 3211 CNRS-Université de Strasbourg-ESBS

Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg

Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

Blvd Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

Tel: 33 3 68 85 47 45; Fax: 33 3 68 85 48 29; E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa secretes a fluorescent siderophore called pyoverdine (PVD). PVD then chelates free iron and shuttles it into the cells via the specific outer membrane transporter, FpvA. In Gram negative bacteria, the ferric-siderophores are then translocated across the cytoplasmic membrane by a specific ABC transporter, and the iron is dissociated from the siderophore in the cytoplasm. Previous studies showed that the dissociation of PVD-Fe occurs in the periplasm, through iron reduction and a ligand exchange for iron. But what catalyses the reduction of Fe(III) and what protein or transporter is involved in the capture of iron released from PVD are still unknown. A cluster of four genes located in the pyoverdine biosynthesis locus are likely to correspond to two periplasmic binding proteins (FpvG and FpvK), the permease (FpvJ) and the ABC cassette subunits of an ABC transporter (FpvH). The modelisation of FpvG and the analysis of the purified protein by mass spectrometry suggest that the FpvG is an iron transporter. We found that FpvG interacts with the N-terminal domain of FpvA receptor, confirming its involvement in iron uptake through pyoverdine. Iron uptake studied with radiolabeled ferric-pyoverdine in a mutant deleted of the whole transporter (*ΔfpvGHJK*) showed that iron

was still imported in this mutant. This suggests that FpvGHJK transporter may be involved in iron uptake via PVD, but that it can be replaced by another transporter in its absence suggesting some redundancy at the level of the inner membrane transport.

INTRODUCTION

Iron is an essential element for all living organisms. Despite its abundance in the Earth's crust, the availability of iron is severely limited by the very high insolubility of iron(III) at physiological pH. In the presence of oxygen, iron(II) is rapidly oxidized to iron(III) which precipitates as a polymeric oxyhydroxide. The solubility of ferric hydroxide is extremely low (10^{-38} M) such that, at physiological pH, the concentration of free iron(III) is less than 10^{-18} M. In order to gain access to iron, bacteria have developed several strategies. One of the most common methods of iron acquisition involves the synthesis and the secretion of low molecular weight iron ligands that are called siderophores. Siderophores are important for the survival and growth of bacteria in the soil and in aqueous environments (reviewed in(13)) and are essential for the virulence of many pathogens in animal models of disease (reviewed in (26)). After secretion, siderophores chelate iron in the extracellular environment with high affinity and transport it back into the bacteria. The uptake of ferric-siderophores into Gram-negative bacteria involves a specific outer membrane transporter.

The proton motive force of the inner membrane drives OMT-mediated transport across the outer membrane by means of an inner membrane complex comprising TonB, ExbB, and ExbD proteins (12, 23). The subsequent uptake of ferric siderophores across the inner membrane is generally done by a transporter belonging to the family of periplasmic binding protein-dependent ABC transporters (16). This is the case in *E. coli* where transport of ferric siderophores and vitamin B12 is sustained by a specific ABC transporter for each siderophore: FhuBC for ferrichrome and ferrioxamine (18, 19), FecCDE for citrate (4, 31), FepCDG for enterobactine (6) and BtuCD for vitamin B12. The whole ferrisiderophore complex may be transported in the cytoplasm, where iron is released from the siderophore by mechanisms involving iron reduction or siderophore hydrolysis (17).

Pseudomonas aeruginosa is a Gram negative opportunistic human pathogen. To acquire iron necessary for its growth and its virulence, *P. aeruginosa* secretes a major fluorescent siderophore called pyoverdine. The most studied is PVDI secreted by *P. aeruginosa* PAO1. Pyoverdine then chelates free iron and the resulting ferric-pyoverdine complexes are taken up back into the periplasm through the FpvAI specific outer membrane receptor. Previous studies suggested that the dissociation of PVDI-Fe occurs in the periplasm, and involves iron reduction and a ligand exchange for iron, with PVDI being recycled to the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ efflux pump (12, 15, 28, 36) allowing a new cycle of iron uptake. But the molecular elements involved in this step and what leads to iron uptake in the cytoplasm is unknown. If the ABC transporters involved in ferric siderophores uptake are well known in *E. coli*, little is known in *P. aeruginosa*, and the situation appears to be much more complicated. *P. aeruginosa* does not only synthesize and utilize different types of pyoverdine together with their specific receptor proteins, but it is also able to take up heterologous siderophores of bacterial or fungal origin. This is reflected by the high number of siderophore receptors in the genome (32). Analysis of the genome suggested the presence of 32 putative TonB dependent receptors (7), 12 of them potentially involved in iron uptake. Only a FepCBDG (PA4158-

4159-4160-4161) homolog of the FepCDG from *E. coli* can be found in the genome. But there is no readily identifiable periplasmic and cytoplasmic membrane transport components for ferric siderophores. Instead, permeases of other families could be involved in this step. To date, three permease or inner membrane proteins have been shown to be necessary for siderophore utilization in *P. aeruginosa*. FptX, a permease of the Major Facilitator Superfamily (MFS) was shown to be necessary for iron uptake through pyochelin (8). A permease from the Nucleobase Cation Symporter - 1 (NCS-1) family, called FiuB (PA0476) was recently shown to be necessary for ferrichrome utilization in *P. aeruginosa* (14). A third inner membrane protein, FoxB, was also shown to be involved in ferrichrome and ferrioxamine B utilization, but it remains to determine whether it functions in the transport or in the release of iron from these siderophores (9). FoxB is predicted to be an inner membrane protein with two predicted PepSY_TM associated helices domains of unknown function. For the PVD pathway, a periplasmic binding protein-dependent ABC transporter is present in the Pvd locus (PA2407 to PA2410), but its mutation doesn't seem to affect iron uptake or PVD production (24). PA2407 to PA2410 is part of the PA2403-PA2410 gene cluster, located in the Pvd locus (27). This cluster is conserved as a whole in most *Pseudomonas* species, except the non fluorescent *P. stutzeri* et *P. mendocina*. The expression of PA2403-10 is iron and PvdS regulated (24, 27) and also regulated by two other ECF factors. This PA2403-10 gene cluster is predicted to be arranged in two operons (PA2403-6 and PA2407-10) separated by 32 bp (21). PA2407-10 is predicted to encode an ABC-type metal transporter (21). As PVDI-Fe dissociation takes place in the periplasm, one can expect that only iron would be transported across the inner membrane by a transporter still to be identified.

In the present work, we investigated the involvement of PA2407-10 genes, called here *fpvGHJK*, in iron uptake through PVDI. Deletion of *fpvGHJK* did not affect iron uptake through PVDI. However, FpvG was shown to bind iron and to interact with FpvA periplasmic domain, suggesting a role for this transporter in iron uptake through PVDI.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. PVDI and PVDI-Fe were prepared as described previously (2).

Bacterial Strains and Plasmids. The strains and plasmids used in this study are described in Table 1. All enzymes for DNA manipulation were purchased from Fermentas and used according to the manufacturer's instructions. *Escherichia coli* strain TOP10 (Invitrogen) was used as a host strain for all plasmid constructions. FpvA periplasmic domain (aa 44-139) was cloned into the pET20b(+) vector for expression and purification in *E. coli*. The oligonucleotides were designed to allow the insertion in frame with the *pelB* signal sequence of the pET20(b+) vector and in frame with the C-terminal 6-histidine. The fragment encoding the signaling domain and the TonB box of FpvA (aa 44-139) was amplified from pPVR2 by PCR using *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) using oligonucleotides FpvA1 (5'GATCCCATGGCCCAGGAAGTCGAGTTC 3') and FpvA2 (5'GTCACTCGAGGGTGCCCAACTGGTTG 3') introducing *NcoI* and *XhoI* respectively. The PCR fragment was inserted in pET20b(+) vector digested with *NcoI* and *XhoI* giving plasmid pLJ50. Construction of PA2407 to 10 deletion mutant was done as follow: Deletion of PA2407-PA2408-PA2409-10 flanked by 700 bp on each side was generated by overlap extension using oligos n°100 (GATCGGATCCCTCGACCCTGACCTTCAAG, introducing a *BamHI* site), 103 (GTCATCTAGAAGCCTGGCGCAGCAACTGG, introducing a *XbaI* site), oligo 101 (CAGCATGGAAAACGCCTTCT) and 102 (AGGCGTTTTTCCATGCTGTTCCCTGGCCG GTAAGGGCTGAGC). This fragment was ligated into the pJet-blunt vector. The DNA fragment encoding the deletion of PA2407-PA2408-PA2409-PA2410 flanked by 700 bp on each side was amplified by PCR from pLJ68 using oligos 145 (GATCGAATTCCTCGACCCTGACCTTCAAG) and 142 (GTCAAAGCTTAGCCTGGCGCAGCAACTGG) (introducing *EcoRI* and *HindIII* restriction sites, respectively). This fragment was digested by *EcoRI* and *HindIII* and ligated into the suicide plasmid pME3088 (33) opened with the same sites to create pLJ76 mutator. To create the PA2407 to 10 genes deletion of *P.*

aeruginosa, pLJ76 was mobilized to PAO1 strain by triparental conjugation using helper plasmid pME497 and chromosomally integrated with selection for tetracycline resistance. Excision of the vector via a second crossing over was obtained by enrichment for tetracycline-sensitive cells (35). Gene deletion was checked by PCR and Western blot analysis (data not shown).

Growth, media and PVDI production. The strains were grown overnight in succinate medium (10) at 30°C. The iron-deficient succinate minimal medium used in these studies has been described elsewhere (composition in g/L is : K₂HPO₄, 6.0; KH₂PO₄, 3.0; (NH₄)₂SO₄, 1.0; MgSO₄·7H₂O, 0.2; sodium succinate, 4.0 and the pH was adjusted to 7.0 by addition of NaOH). LB broth (Lennox) and LB broth agar medium were used as rich medium in all experiments; both were purchased from Difco. All media were supplemented with the relevant antibiotics at the following concentrations: Kanamycin (50 µg/mL), and ampicillin (100 µg /mL), carbenicillin (150 µg /mL). The amount of PVDI produced was estimated by monitoring absorbance at 400 nm in the extracellular medium, using the extinction coefficient of PVDI ($\epsilon = 19000 \text{ M}^{-1}$).

ICP-AES measurement. The purified FpvG protein at 21 µM (HEPES 20 mM, NaCl 300mM, pH7,4) was analysed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). The volume was brought to 10 ml with HEPES 20 mM, NaCl 300 mM, pH7,4, and samples were filtered on a 0.45-µm-pore-size membrane and acidified with HNO₃ 1% and analyzed with an ICP-AES apparatus (Jobin-Yvon, Ultima) at the following wavelengths (in nm): 396.152 for Al³⁺, 238.892 for Co²⁺, 206.149 for Cr²⁺, 259.94 for Fe³⁺, 257.61 for Mn²⁺, and 213.856 for Zn²⁺.

The concentrations of the metals in the samples were determined :: 0.00 µM for Al³⁺, 0.019 µM for Co²⁺, 0.00 µM for Cr²⁺, 6.68 µM for Fe³⁺, 0.111 µM for Mn²⁺, and 0.488 µM for Zn²⁺.

⁵⁵Fe uptake assay. The iron uptake assays were carried up as described previously (29). Cells at an OD_{600nm} of 1 preincubated or not in the presence of 100 µM CCCP were incubated in the presence of 100 nM siderophore-⁵⁵Fe complexes. At different times, aliquots were removed, filtrated and the radioactivity counted.

Purification of FpvG. FpvG protein was expressed from BL21(DE3) pET23-PA2407-8-9 cells and purified from its periplasmic fraction. 6 mL of an overnight culture of BL21(DE3) pET23-PA2407-8-9 cells in LB were used to inoculate 2L of LB-broth containing 100 µg/ml ampicillin at 37°C. Cells were harvested after overnight growth (OD_{600nm} of 3) and resuspended by centrifugation for 20 min at 2650g. Cell pellet was resuspended in 2 mL per g of pellet in Tris-sucrose buffer (Tris HCl 200mM, EDTA 1mM, sucrose 20% (p/v), pH8) and further treated with 1mg/mL lysozyme (Sigma) for 2 min at room temperature. Cold water (3 mL/g of pellet) was added and incubation on ice continued for 10 min. After a 10 min centrifugation at 4350g at 4°C, the supernatant corresponding to the periplasmic fraction was adjusted to pH7 and filtered through a 0.2µm Millipore filter. This fraction was applied to a 6mL ResourceS column (Pharmacia Biotech) equilibrated with HEPES 20mM pH6.5. The column was washed with HEPES buffer. FpvG was eluted from the column with a linear gradient of NaCl (0-1M NaCl). The eluates were collected and the purity of the different fractions were assessed by SDS-PAGE (12%). The fractions corresponding to elution with 300mM NaCl were pooled. The concentration of the resulting preparation was among 7 mg/mL as determined by a Bradford test (Biorad Protein Assay).

Expression and purification of FpvA_{44-139-His6}. BL21 (DE3) *E. coli* cells were transformed with pLJ50. A single colony from freshly transformed cells was used to inoculate 5 mL of LB-broth containing 100 µg/ml ampicillin. The culture was shaken at 220 rpm, 37 °C overnight and used to inoculate 2 L of LB broth with 100 µg/ml ampicillin. At an optical density at 600 nm of approximately 0.6, 1 mM isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) was added for induction. The culture was further shaken at 37 °C for 2 hours and harvested by centrifugation at 3200g for 20 min. The periplasmic fraction was prepared as described above. Complete protease inhibitor tablets EDTA free (Roche) were added to the solution. The proteins were purified by nickel affinity chromatography using a (Ni-NTA) column (Amersham) equilibrated in a 20 mM sodium phosphate buffer containing 10mM imidazole

pH 7.5. Proteins specifically bound to the column material were eluted with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7,5) containing 500 mM imidazole. The fractions were collected and analyzed by SDS PAGE (12%). The His-tagged TonBpp protein was expressed and purified as described previously (1).

In vitro cross-linking with formaldehyde. *In vitro* cross-linking experiments were performed with formaldehyde (Merck). Purified proteins were mixed in a 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) at a concentration of 10 µM and incubated for 15 min at room temperature. Formaldehyde (1%) was added, and the mixture was further incubated for 20 min at room temperature. The cross-link was stopped by addition of Laemmli loading buffer and analysed by SDS-PAGE (12%) and Western blot.

In vitro co-precipitations experiments. Co-precipitations were performed by ion metal affinity chromatography. 1mL of 10µM of His-tagged FpvA_{44-139-His6} were immobilized on 25µL of Ni-NTA agarose beads (Amersham) for 1 hour. After three washing steps with sodium phosphate buffer (NaPi 200mM, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM), beads were incubated (or not) with 1 mL of 10µM FpvG for 1 hour. After three washings with the washing buffer, proteins were eluted with 500mM imidazole containing buffer (NaPi 200mM, NaCl 500 mM, Imidazole 500 mM) prior to analysis by SDS PAGE (12%) and Coomassie blue staining.

Immunoblot analysis. The equivalent of 2.10^8 bacteria ($OD_{600nm} = 0,2$) were loaded on SDS PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a blot apparatus (Bio-Rad). The nitrocellulose membranes were blocked by 1 hour incubation in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6, 10% dried skim milk) and then incubated in blocking buffer with primary anti-FpvA antibody (34), or anti-FpvG antibodies followed by a second incubation in blocking buffer with horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma, dilution 1/10000). Blots were developed using the enhanced chemiluminescence protocol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat, Pierce). The polyclonal antiserum directed against FpvG was prepared from the purified FpvG protein. New Zealand rabbits were immunized with 200 µg of protein in 1 ml of phosphate-buffered saline and Freund's complete adjuvant V.

RESULTS AND DISCUSSION

PA2407-10 is an iron transporter. PA2407 to PA2410 is part of the PA2403-PA2410 gene cluster, located in the Pvd locus (21, 27). PA2407-8-9-10 is predicted to be an operon encoding a periplasmic binding protein dependent ABC transporter. PA2408 encodes a probable ATP-binding component and PA2409 encodes a probable permease of an ABC transporter. PA2407 and PA2410 are predicted to encode for periplasmic binding component of an ABC-type transport system.

Pfam analysis of PA2407 revealed the presence of SBP_bac_9 domain (periplasmic binding protein, PF01297), a family of ABC transporter metal-binding lipoproteins (11). This family includes periplasmic solute binding proteins such as TroA that interacts with an ATP-binding cassette transport system in *Treponema pallidum* (20) and function as binding proteins in ABC transport of metal ions like Zn^{2+} or Mn^{2+} in many eubacterial species. PA2410 could belong as well to the TroA superfamily of periplasmic metal binding protein. However, when analysed by Conserved domain search (CD search) at the NCBI,

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html) (22) both proteins belong to the cl00262 TroA-like superfamily, but the E-value for PA2410 is very high compared to the one of PA2407 ($6 \cdot 10^{-8}$ vs $1.2 \cdot 10^{-72}$), and the sequence doesn't match the full length of the CD extent. We thus decided to focus our study on PA2407, that we will call from now FpvG.

The nucleotide sequence of FpvG (PA2407) predicts a 317 amino acid periplasmic protein of 34,3 kDa (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). It is predicted to have a signal sequence, with a putative cleavage site between residues 37 and 38, as predicted by SignalP (3). The expected molecular mass of the mature form of the protein, from its amino acids composition, would then be 30457,7 Da (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

FpvG protein was expressed in rich medium and purified from *E. coli* periplasm. The purified protein was analysed by mass spectrometry. Denaturing conditions showed two pics, one pic corresponding to the expected mass of the mature FpvG (Molecular mass ([M+H]⁺): 30457.32, Standard deviation

0.40658) and a second pic of 59Da, that could correspond to iron. In native conditions, one single pic was observed at a mass corresponding to the sum of the mass of the mature PA2407 plus 59 Da (Molecular mass ([M+H]⁺): 30514.14, Standard deviation 0.82107). The presence of iron in the sample was confirmed by ICP-AES: we found 0.3 moles Fe/mole of FpvG. The presence of other metals in the sample was also checked, and traces of other metals were also found: 0.023 moles Zn/moles of FpvG, 0.05 moles Mn/moles of FpvG, 0.9 mmoles Co/moles of FpvG but no Cr or Al could be detected. The fact that only one third of the samples were loaded with iron could be due to its purification from *E. coli*. In this case FpvG probably gets iron from the medium. Attempts to purify FpvG from *P. aeruginosa* were until now unsuccessful due to overproduction toxicity.

For the PVDI iron uptake pathway in *P. aeruginosa*, the iron is released from the siderophore in the periplasm by a mechanism involving probably iron reduction (12). This implies that iron, and not a PVDI-Fe complex is transported to the cytoplasm. FpvGHJK seems to be a good candidate for such a transporter, as it is predicted to be a ABC-type metal transporter. Bioinformatic analysis of FpvG and the fact that FpvG is associated to iron when purified from *E. coli* suggest that this transporter only binds iron. Further experiments will be needed to show whether it binds ferrous or ferric iron. The protein was analysed by EPR, and no EPR signal could be detected, indicating that the iron bound to the protein could be Fe^{2+} .

Iron transport via Pvd is not affected in the *fvpGHJK* deletion mutant. Under low iron conditions, the expression levels of known iron-transport associated genes generally increase. PA2407-10 was shown to be iron and PvdS regulated in a Gene ship assay (24). The purified FpvG was used to produce polyclonal antibodies directed against FpvG and the expression of FpvG in *P. aeruginosa* cells was followed by immunoblot. As shown in Figure 1A, FpvG is expressed in *P. aeruginosa* PA01 cells and its expression is enhanced in low iron containing medium. We constructed a mutant in which the whole putative transporter (PA2407 to PA2410, called FpvGHJK from now) was deleted. The PA01 $\Delta fvpGHJK$ mutant was not affected for growth in succinate medium, and its PVDI production was not impaired neither (Figure 2A and data not shown). This is consistent with the observations of Ochsner

et al. who previously showed that a PA2407 mutant was neither affected for PVDI production nor for growth in iron restricted medium (24).

Iron uptake ability of the PA01 *AfpvGHJK* was further checked directly by following its ability to transport and accumulate iron through PVDI using a PVDI- ⁵⁵Fe uptake assay. As shown in Figure 2B, iron uptake is not affected in the PA01 *AfpvGHJK* mutant.

PA2407 (FpvG) is expressed and part of the PA2403-10 cluster, but the deletion of the PA2407-10 transporter doesn't impair iron uptake through PVDI. In *E. coli*, mutation of the ABC transporter FhuBCD abolishes ferrichrome uptake. The absence of phenotype of a *fpvGHJK* mutant is thus puzzling and suggest that its function could be redundant. It may be that another transporter could replace it in its absence, especially if it only transports iron and not the PVDI-Fe. Other metal binding ABC transporter can be found in PA01 genome. Particularly, Blast analysis showed that the closest protein from PA2407 is the protein encoded by PA5498 (59% similar to ZnuA from *E. coli*), a periplasmic binding protein found at the vicinity of an ABC transporter (PA5500-5501) homolog to the ZnuCD ABC Zinc transporter from *E. coli*. We constructed a *znuC fpvGHJK* double mutant (in which *znuC*, encoding the putative ATP binding cassette of the ABC transporter was disrupted). Iron uptake through PVDI was followed by a PVDI- ⁵⁵Fe uptake assay and showed that iron uptake was not impaired in the *znuC fpvGHJK* mutant.

FpvG interacts with the periplasmic domain of FpvA. If FpvG is involved in iron uptake through PVDI, one can expect an interaction between this protein and other proteins of the system. Indeed, in the ferrichrome pathway in *E. coli*, an interaction between the periplasmic binding protein FhuD and TonB has been shown (5). In an attempt to detect all the interactions between FpvG and the other protein of the system, different proteins or protein domains were purified and their interactions were analysed *in vitro* cross-linking.

The FpvA receptor and the periplasmic domain of TonB (TonBpp) were purified as described previously (1, 30). The periplasmic domain of FpvA (FpvA_{44-139-His6}) corresponding to the signaling domain and the TonB box tagged

with 6 Histidines and FpvG were purified from *E. coli* periplasm.

The purified FpvG protein (30 kDa) was cross-linked with formaldehyde in the presence or not of the purified FpvA_{44-139-His6}. As revealed by anti-FpvA antiserum, FpvA_{44-139-His6} alone forms multimers (dimers, trimers, and tetramers, Figure 3A). A 64 kDa band migrating as a doublet, was detected by anti-FpvA antibodies when both protein were mixed (Figure 3A). Its molecular mass suggests it could correspond to a FpvA_{44-139-His6} dimer-FpvG complex. We could not detect any interaction between FpvG and TonBpp, or between FpvG and FpvA with this technique (data not shown).

To confirm this interaction we performed co-precipitation experiment. Purified FpvA_{44-139-His6}, FpvG, and a mix of both proteins were loaded on Ni-NTA agarose beads. After three washing steps the proteins were eluted with Imidazole containing buffer and analysed by SDS-PAGE. As shown in Figure 3B, FpvG specifically co-eluted with FpvA_{44-139-His6}.

In conclusion, FpvG interacts with the region 44 to 139 of FpvA corresponding to the signalling domain and the TonB box of FpvA is sufficient for this interaction.

We recently showed that the first genes of the PA2403-10 cluster, *fpvCDEF* were essential for iron uptake, likely in the step of iron release from the siderophore (Meksem *et al.*, manuscript in preparation). As we showed in this study, FpvG interacts with the N-terminal periplasmic part of FpvA, suggesting that FpvG could go the the receptor to catch iron released from PVDI by FpvCDEF.

TABLE 1

Strains or plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i> strains PAO1	Wild-type strain	(32)
PAO1 Δ <i>fpvGHJK</i>	Derivative of PAO1 Δ PA2407-10	This study
<i>E. coli</i> strains TOP10	<i>supE44 DlacU169 (ϕ80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (λ DE3)</i>	Novagen
Plasmids		
pPVR2	<i>fpvA</i>	(25)
pME3088	Suicide vector; Tc ^R ; ColE1 replicon ; <i>EcoRI KpnI DraII XhoI HindIII</i> polylinker	(33)
pME497	Mobilizing plasmid, ApR	(33)
pJET1/blunt vector	rep (pMB1), <i>bla</i> (Ap ^R), <i>eco47IR</i> , PlacUV5	Fermentas
pLJ68	pJET1/blunt carrying <i>EcoRI-HindIII</i> fragment containing the 700bp upstream PA2407 and the 700 pb downstream PA2410.	This study
pLJ76	pME30888 carrying <i>EcoRI-HindIII</i> fragment containing the 700bp upstream PA2407 and the 700 pb downstream PA2410.	This study
pLJ50	pET20 (b+) carrying a 285-pb <i>XhoI-NcoI</i> fragment containing <i>fpvA</i> signaling domain and TonB box.	This study
pET23-PA2407-8-9	pET23 carrying a fragment containing the PA2407-8-9 genes	This study

LEGENDS

Figure 1:

Expression of FpvG in *P. aeruginosa* cells

Cell extracts of *P. aeruginosa* wild type cells (PAO1) grown at 30°C in succinate medium supplemented (+) or not (-) with 100µM FeSO₄ were loaded on a 12% SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using polyclonal anti-FpvG antibodies.

Figure 2:

A. Growth of wild type *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1(●) and PAO1ΔfpvGHJK (□) in succinate medium at 30°C.

B. Time-dependent uptake of PVDI-[⁵⁵Fe] in *P. aeruginosa* PAO1(●), PAO1ΔfpvGHJK (▲), PAO1+CCCP (■) and PAO1ΔfpvGHJK +CCCP (○),

Cells at an OD_{600nm} of 1 were incubated for 15 min in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at 37°C before initiation of transport assays by the addition of 100 nM PVDI-⁵⁵Fe. Samples (100 µL) of the suspension were removed at different times and filtered, and the radioactivity retained was counted. The results are expressed as picomoles of PVD-⁵⁵Fe transported per milliliter of cells at an OD_{600nm} of 1. The experiment was repeated with the protonophore CCCP at 200µM.

Figure 3:

In vitro interaction between FpvA_{44-139-His6} and FpvG.

A. *In vitro* chemical cross-linking of FpvA_{44-139-His6} and FpvG proteins.

Proteins were cross-linked in the presence (F) or not (C) of 1% of formaldehyde. Samples were analyzed on a 12% acrylamide gel, followed by electrotransfer on nitrocellulose membrane followed by immunoblot with anti-FpvA antibodies. The location of the formaldehyde-cross-linked complex between FpvG and FpvA_{44-139-His6} is indicated with an (*). The position of the FpvA_{44-139-His6} multimers is indicated on the right. The position of the molecular mass marker is indicated on the left.

B. Interaction of FpvG with FpvA_{44-139-His6} bound to Ni-NTA agarose

Purified FpvA_{44-139-His6}, FpvG, and a mix of both proteins were loaded on Ni-NTA agarose beads. The flow-through fractions were collected (FT). After three washing steps, the proteins were eluted with Imidazole containing buffer (Elutions).

Figure 1

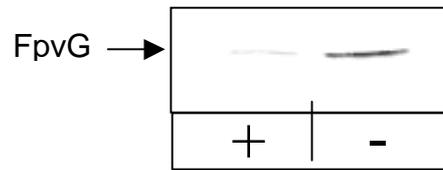
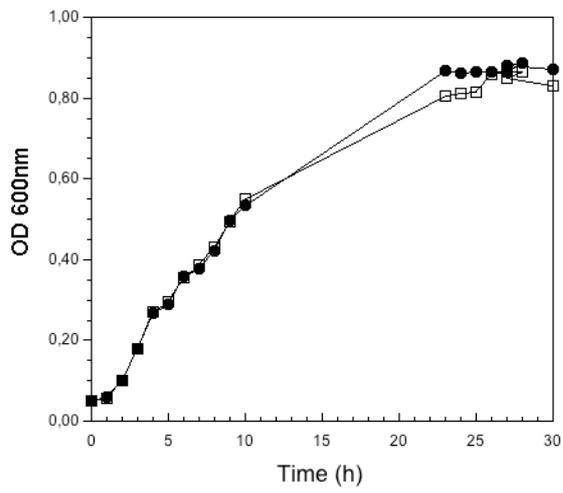


Figure 2

A



B

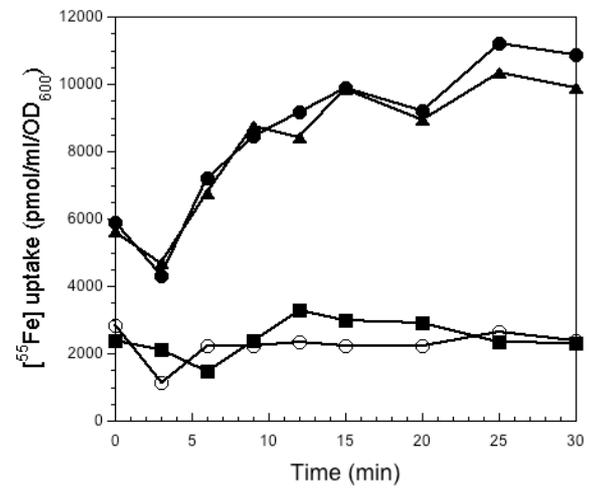
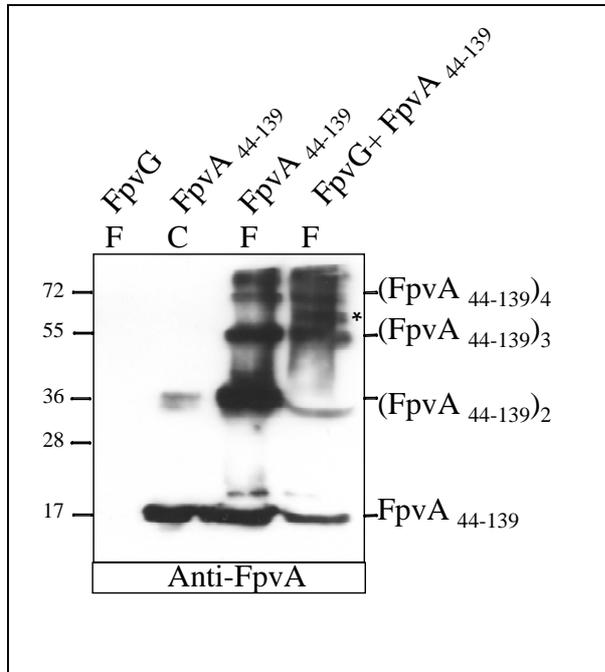
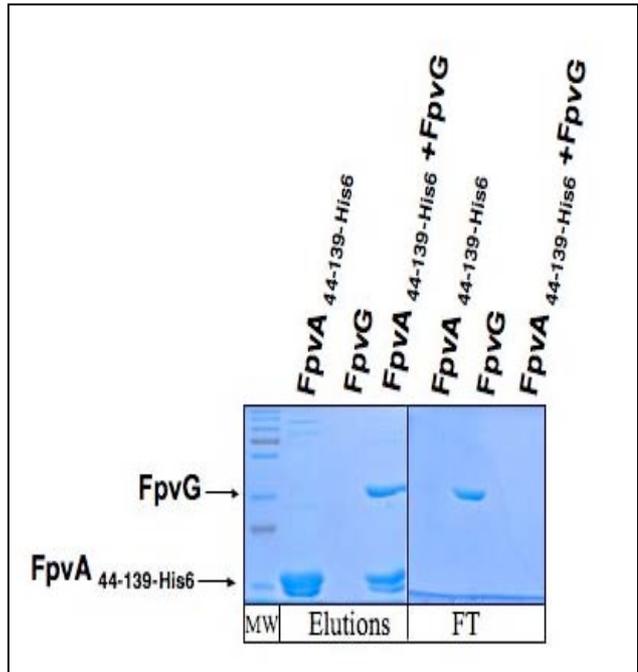


Figure 3 :

A



B



REFERENCES

1. **Adams, H., G. Zeder-Lutz, I. Schalk, F. Pattus, and H. Celia.** 2006. Interaction of TonB with the outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**:5752-61.
2. **Albrecht-Gary, A. M., S. Blanc, N. Rochel, A. Z. Ocacktan, and M. A. Abdallah.** 1994. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **33**:6391-6402.
3. **Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**:783-95.
4. **Braun, V., and C. Herrmann.** 2007. Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:6913-8.
5. **Carter, D. M., I. R. Miousse, J. N. Gagnon, E. Martinez, A. Clements, J. Lee, M. A. Hancock, H. Gagnon, P. D. Pawelek, and J. W. Coulton.** 2006. Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J Biol Chem* **281**:35413-24.
6. **Chenault, S. S., and C. F. Earhart.** 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol* **5**:1405-13.
7. **Cornelis, P., and S. Matthijs.** 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* **4**:787-98.
8. **Cuiv, P. O., P. Clarke, D. Lynch, and M. O'Connell.** 2004. Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *J Bacteriol* **186**:2996-3005.
9. **Cuiv, P. O., D. Keogh, P. Clarke, and M. O'Connell.** 2007. FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane. *J Bacteriol* **189**:284-7.
10. **Demange, P., S. Wendenbaum, C. Linget, C. Mertz, M. T. Cung, and A. Dell, Abdallah, M.A.** 1990. Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals* **3**:155-170.
11. **Finn, R. D., J. Mistry, J. Tate, P. Coggill, A. Heger, J. E. Pollington, O. L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, and A. Bateman.** 2010. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**:D211-22.
12. **Greenwald, J., F. Hoegy, M. Nader, L. Journet, G. L. Mislin, P. L. Graumann, and I. J. Schalk.** 2007. Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem* **282**:2987-95.
13. **Guerinot, M. L.** 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**:743-72.
14. **Hannauer, M., Y. Barda, G. L. Mislin, A. Shanzer, and I. J. Schalk.** 2010. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* **192**:1212-20.
15. **Imperi, F., F. Tiburzi, and P. Visca.** 2009. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:20440-5.
16. **Koster, W.** 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**:291-301.
17. **Köster, W.** 1997. Transport of iron(III) hydroxamates across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Trautwein A.X. (Ed.), *Biorganic Chemistry, Transition Metals in Biology and their Coordination Chemistry*, Wiley-VCH:56-68.
18. **Koster, W., and V. Braun.** 1986. Iron hydroxamate transport of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the *fhuB* gene and identification of the protein. *Mol Gen Genet* **204**:435-42.
19. **Koster, W., and V. Braun.** 1989. Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Mol Gen Genet* **217**:233-9.

20. **Lee, Y. H., R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, and C. A. Hasemann.** 1999. *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat Struct Biol* **6**:628-33.
21. **Llamas, M. A., M. J. Mooij, M. Sparrius, C. M. Vandenbroucke-Grauls, C. Ratledge, and W. Bitter.** 2008. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**:458-72.
22. **Marchler-Bauer, A., and S. H. Bryant.** 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**:W327-31.
23. **Moeck, G. S., and J. W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**:675-81.
24. **Ochsner, U. A., P. J. Wilderman, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 2002. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**:1277-87.
25. **Poole, K., S. Neshat, K. Krebes, and D. E. Heinrichs.** 1993. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**:4597-604.
26. **Ratledge, C., and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**:881-941.
27. **Ravel, J., and P. Cornelis.** 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* **11**:195-200.
28. **Schalk, I. J., M. A. Abdallah, F. Pattus, K. G. Held, and K. Postle.** 2002. A new mechanism for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Soc Trans* **30**:702-5.
29. **Schalk, I. J., C. Hennard, C. Dugave, K. Poole, M. A. Abdallah, and F. Pattus.** 2001. Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol Microbiol* **39**:351-60.
30. **Schalk, I. J., P. Kyslik, D. Prome, A. van Dorsselaer, K. Poole, M. A. Abdallah, and F. Pattus.** 1999. Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **38**:9357-65.
31. **Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun.** 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:2626-33.
32. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-64.
33. **Voisard, C., Bull, C., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., Défago, G., and Haas, D. .** 1994. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. O'gara, F., Dowling, D.N. and Boesten (eds). Weinheim, Germany: VCH.;pp. 67-89.
34. **Voulhoux, R., A. Filloux, and I. J. Schalk.** 2006. Role of the TAT System in the pyoverdine-mediated iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**:3317-3323.
35. **Ye, R. W., D. Haas, J. O. Ka, V. Krishnapillai, A. Zimmermann, C. Baird, and J. M. Tiedje.** 1995. Anaerobic activation of the entire denitrification pathway in *Pseudomonas aeruginosa* requires Anr, an analog of Fnr. *J Bacteriol* **177**:3606-9.
36. **Yeterian, E., L. W. Martin, I. L. Lamont, and I. J. Schalk.** 2009. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Report* **in press**.

PARTIE III

Conclusion générale

Les RTBDs sont situés au niveau de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Ils sont impliqués dans le transport actif de molécules peu abondantes dans le milieu extracellulaire et ne pouvant pas diffuser passivement à travers les porines, en raison de leur taille, comme les ferri-sidérophores, le saccharose et l'hème. En dépit d'une faible identité de séquences (moins de 40%), les RTBDs possèdent un repliement tridimensionnel commun. Ils sont tous constitués de deux ou trois domaines structuraux distincts : **un domaine C-terminal**, organisé en tonneau β constitué de 22 brins β antiparallèles enchâssés dans la membrane externe et reliés entre eux par des coudes périplasmiques et par de longues et flexibles boucles extracellulaires, et **un domaine N-terminal** appelé domaine « bouchon » contenant un feuillet mixte de 4 brins β qui scelle le tonneau en empêche la diffusion incontrôlée à travers la membrane externe *via* les RTBDs. Une séquence essentielle au transport des ligands est conservée en N-terminal : la boîte TonB. Les RTBDs transducteurs, comme FpvA, possèdent un domaine supplémentaire impliqué dans la cascade de signalisation et donc dans la régulation du système d'assimilation du fer. Le transport actif par les RTBDs nécessite de l'énergie, qui est fournie suite à l'interaction entre la boîte TonB et le domaine C-terminal de la protéine TonB de la membrane interne. Les structures tridimensionnelles de 10 RTBDs vides ou en complexe avec leurs ligands ont été résolues par cristallographie des rayons x. Malgré les nombreuses études cristallographiques et fonctionnelles, les modèles moléculaires décrivant le passage du ligand à travers les RTBDs restent toujours très spéculatifs. La résolution de nouvelles structures tridimensionnelles avec et sans ligands pourrait permettre une meilleure compréhension des bases structurales et moléculaires de la reconnaissance des ligands et du mécanisme de transport et de transduction du signal au travers de la membrane externe par les RTBDs. L'étude des mécanismes d'acquisition du fer par les RTBDs chez les pathogènes bactériens est en plein essor dans de nombreux laboratoires, elle suscite l'espoir de déterminer des étapes vulnérables du processus infectieux et de mettre au point de nouveaux médicaments ciblant les voies d'acquisition du fer par les RTBDs.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude structurale de 4 RTBDs de bactéries à Gram-négatif. Nous avons surexprimé les 4 récepteurs dans 2 systèmes d'expression différents, puis nous les avons purifiés en deux étapes et cristallisés en utilisant la technique de diffusion de vapeur en goutte assise. Plusieurs conditions de cristallisation ont été obtenues en utilisant différents détergents. La combinaison de 4 matrices d'échantillonnage et de 3 détergents et l'utilisation d'un système robotisé à

nano-goutte, nous a permis d'échantillonner un grand nombre de conditions de cristallisation avec un petit volume de protéine pure. Des jeux de données de diffraction ont été enregistrés pour les formes apo des 4 RTBDs. Les structures de FauA et de ShuA ont ainsi été résolues à 2,3 Å et 2,6 Å de résolution, respectivement. La structure de FetA est actuellement en cours d'affinement par le Dr D. Cobessi. Le problème de phase est à résoudre pour SuxA (article I).

La co-cristallisation, des formes native et sélénée de ShuA, avec les sels d'atomes lourds a permis d'améliorer la forme des cristaux et d'augmenter le pouvoir diffractant de ceux de ShuA. Les atomes lourds se mettent entre les molécules protéiques et permettent leur stabilisation dans le cristal. L'utilisation d'agents réducteurs (DTT ou acide ascorbique) et des chélateurs de métaux (EDTA) nous a permis de cristalliser la forme sélénée de ShuA dans des conditions proches de celles de la forme native et de résoudre le problème de phases grâce aux données collectées au seuil du sélénium en utilisant la méthode MAD.

En se basant sur l'analyse de la structure de la forme apo de ShuA et sur sa comparaison avec la structure de HasR-HasA-hème, nous avons proposé un mécanisme de fixation de l'hème, dans la région extracellulaire du récepteur, par ajustement induit. La coordination de l'hème par les His86 et 420, conservées chez les récepteurs de l'hème, perturberait des réseaux de liaisons hydrogène impliquant notamment l'His86 et la boîte TonB et induit des changements de conformation qui peuvent se propager pour atteindre la boîte TonB et permettre ainsi son interaction avec la partie C-terminale de la protéine TonB de la membrane interne et l'énergisation de ShuA. La densité électronique correspondant à la boîte TonB a été observée, suggérant la nécessité de la présence de l'hème et des changements conformationnels pour qu'elle interagisse avec la partie périplasmique de la protéine TonB de la membrane interne (articles II et III).

Pour les études fonctionnelles, nous nous sommes intéressés à des gènes de fonctions inconnues localisés dans le locus *pvd* de *P. aeruginosa*, et plus particulièrement aux gènes du cluster *fpvCDEFGHJK* (PA2403-10). Ce cluster, conservé chez toutes les espèces de *Pseudomonas* produisant la Pvd, est organisé en 2 opérons : *fpvCDEF* et *fpvGHJK*. Nous avons analysé l'implication de ces gènes dans le transport du fer par le système Pvd chez *P. aeruginosa*. Les gènes de l'opéron *fpvCDEF* coderaient pour des protéines de la membrane interne (FpvCDEF) à plusieurs segments transmembranaires. Les gènes de l'opéron *fpvGHJK* coderaient pour un transporteur ABC. FpvG correspondrait à la première protéine périplasmique affine, FpvH à l'ATPase, FpvJ à la perméase et FpvK correspondrait à une seconde protéine périplasmique affine. Durant cette thèse, nous avons montré que les protéines FpvCDEF sont essentielles au transport du fer par la Pvd.

La protéine FpvC et au moins une des trois autres protéines (FpvDEF) seraient impliquées dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Lorsque *fpvC* est muté, le transport de la ferri-pyoverdine est complètement aboli. Nous avons montré par des études *in vitro*, que la dissociation de ferri-pyoverdine peut s'effectuer en présence d'un réducteur comme le DTT et que l'efficacité de la dissociation est augmentée en présence d'un chélateur du fer ferreux comme la ferrozine. La caractérisation biochimique de la protéine FpvG a montré que son site de liaison était chargé en fer. Il est tentant de suggérer que FpvG puisse jouer, *in vivo*, le rôle joué par la ferrozine dans la dissociation de la ferri-pyoverdine *in vitro*. Ainsi, FpvG pourrait prendre en charge le fer dans le périplasma après dissociation du complexe Pvd-Fe par FpvC. Les autres éléments du transporteur ABC seraient impliqués dans le transport du fer à travers la membrane interne (articles IV et V).

Enfin, il est important de remarquer que la localisation cellulaire dans le périplasma de la dissociation du complexe ferri-pyoverdine par réduction constitue une des particularités de la voie Pvd chez *P. aeruginosa* qu'on ne retrouve pas chez les voies de transport du fer utilisant des sidérophores chez *E. coli* (Schalk, 2008) (**figure 41**). Chez cette bactérie, pour la voie ferrichrome et entérobactine, la dissociation des ferri-sidérophores s'effectue dans le cytoplasme bactérien et non dans le périplasma. Les résultats obtenus durant cette thèse indiquent que les mécanismes de transport du fer mis en évidence chez *E. coli* sont loin d'être généraux et qu'il existe probablement des mécanismes spécifiques aux différentes voies de transport chez les bactéries.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abdallah, M. A. & Pattus, F. (2000). Siderophores and Iron-transport in Microorganisms. *J. Chin Chem Soc* **47**, 1-20.

Abdallah, M. A., Hennard, C., Linget, C. & Ocaktan, A. (1991). [Iron transport and role of pyoverdines in infectivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Therapeutic incidences]. *Pathol Biol (Paris)* **39**, 600-605.

Adams, H., Zeder-Lutz, G., Schalk, I., Pattus, F. & Celia, H. (2006). Interaction of TonB with the outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 5752-5761.

Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1999). Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **38(19)**, 6248-6260.

Ahmer, B. M., Thomas, M. G., Larsen, R. A. & Postle, K. (1995). Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J Bacteriol* **177**, 4742-4747.

Aisen, P. & Listowsky, I. (1980). Iron transport and storage proteins. *Annual Reviews of Biochemistry* **49**.

Aisen, P. & Harris, D. C. (1989). Physical biochemistry of the transferrins. *In: Loehr T, ed. Iron Carriers and Iron Proteins, Vol 5. New York: VCH Publishers: 241-251.*

Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S. R., N., Ocaktan, A. Z. & 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. (1998). Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol*. **40**, 281-351.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.

Arnoux, P., Haser, R., Izadi, N., Lecroisey, A., Delepierre, M., Wandersman, C. & Czjzek, M. (1999). The crystal structure of HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*. *Nat Struct Biol* **6**, 516-520.

-B-

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

Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol*. **184**, 5826-5832.

- Baker, E. N. (1994).** Structure and reactivity of transferrins. *Adv. Inorg. Chem.* **41**, 389–463.
- Bennish, M. L. & Wojtyniak, B. J. (1991).** Mortality due to shigellosis : Community and hospital data. *Rev. Infect. Dis.* **13 (Suppl)**, S245-S251.
- Beri, R. & Chandra, R. (1993).** Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev.* **25**, 49-152.
- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. & Sarma, V. R. (1965).** Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* **22**, 757-761.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E. & Arlat, M. (2007).** Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS One.* **2**, e224.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M., A., R., D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997).** The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science.* **5**, 1453-1462.
- Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975).** Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* **67(3)**, 835-851.
- Borths, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T. & Rees, D. C. (2002).** The structure of Escherichia coli BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16642-16647.
- Bosch, D., Voorhout, W. & Tommassen, J. (1988).** Export and localization of N-terminally truncated derivatives of Escherichia coli K-12 outer membrane protein PhoE. *J. Biol. Chem.* **263**, 9952–9957.
- Boukhalfa, H. & Crumbliss, A. L. (2002).** Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**, 325-339.
- Boyd, D., Schierie, C. & Beckwith, J. (1998).** How many membrane proteins are there? *Protein Sci* **7**, 201–205.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. & Cellier, M. F. (2002).** Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infect Immun.* **70**, 6032-6042.
- Bracken, C. S., Baer, M. T., Abdur-Rashid, A., Helms, W. & Stojiljkovic, I. (1999).** Use of heme-protein complexes by the Yersinia enterocolitica HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol.* **181**, 6063-6072.

Bradbeer, C. (1993). The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 3146-3150.

Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol* **11**, 1079-1091.

Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G. L. A. & Schalk, I. J. (in press). Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports*.

Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**, 67-79.

Braun, V. & Braun, M. (2002a). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**, 78.

Braun, V. & Braun, M. (2002b). Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr Opin Microbiol* **5**, 194-201.

Braun, V., Gaisser, S., Herrmann, C., Kampfenkel, K., Killmann, H. & Traub, I. (1996). Energy-coupled transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: ExbB binds ExbD and TonB in vitro, and leucine 132 in the periplasmic region and aspartate 25 in the transmembrane region are important for ExbD activity. *J Bacteriol* **178**, 2836-2845.

Brigitgan, B. E., Roeder, T. L., Rasmussen, G. T., Shasby, D. M., McCormick, M. L. & Cox, C. D. (1992). Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa*. Secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells. Implications for *Pseudomonas*-associated tissue injury. *J.I. Clin Invest* **90**, 2187-2196.

Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimann, C. & Cobessi, D. (2009). Use of an in-house approach to study the three-dimensional structures of various outer membrane proteins: structure of the alcaligin outer membrane transporter FauA from *Bordetella pertussis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **65(Pt 4)**, 326-331.

Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F. & Cobessi, D. (2007). A beta strand lock exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure* **15**, 1383-1391.

Brinkman, K. K. & Larsen, R. A. (2007). Interactions of the energy transducer TonB with non-cognate energy-harvesting complexes. *J Bacteriol*.

Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**, 56-63.

Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Rev* **10**, 209-228.

Budzikiewicz, H. (2004). Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* **87**, 81-237.

Bullen, J. J. (1981). The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis.* **3**, 1127-1138.

Burkhard, K. A. & Wilks, A. (2008). Functional characterization of the *Shigella dysenteriae* heme ABC transporter. *Biochemistry.* **5**, 7977-7979.

-C-

Cao, Z. & Klebba, P. E. (2002). Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie* **84**, 399-412.

Carrondo, M. A. (2003). Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *EMBO J.* **22**, 1959-1968. Review.

Cascales, E., Lloubes, R. & Sturgis, J. N. (2001). The TolQ-TolR proteins energize TolA and share homologies with the flagellar motor proteins MotA-MotB. *Mol Microbiol* **42**, 795-807.

Cascales, E., Buchanan, S. K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 158-229.

Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N. & Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes,. *Science* **285**, 2095-2104.

Cescau, S., Cwerman, H., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. & Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals.* **20**, 603-613.

Chang, C., Mooser, A., Pluckthun, A. & Wlodawer, A. (2001). Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J Biol Chem* **276**, 27535-27540.

Chimento, D. P., Kadner, R. J. & Wiener, M. C. (2005). Comparative structural analysis of TonB-dependent outer membrane transporters: implications for the transport cycle. *Proteins* **59**, 240-251.

Clément, E., Mesini, P. J., Pattus, F., Abdallah, M. A. & Schalk, I. J. (2004). The binding mechanism of pyoverdinin with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* **43**, 7954-7965.

Cobessi, D., Celia, H. & Pattus, F. (2005a). Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **352**, 893-904.

Cobessi, D., Meksem, A. & Brillet, K. (2010). Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism. *Proteins*. **78**(2).

Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A. & Pattus, F. (2005b). The crystal structure of the pyoverdinin outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J Mol Biol* **34**, 121-134.

Cope, L. D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1995). A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemoexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol*. **177**, 2644-2653.

Cornelis, P. & Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdins. *Environ Microbiol* **4**, 787-798.

Cornelis, P., Hohnadel, D. & Meyer, J. M. (1989). Evidence for different pyoverdinin-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infect Immun* **57**, 3491-3497.

Cornelissen, C. N. (2003). Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci*. **1**, 836-847.

Coves, J., Niviere, V., Eschenbrenner, M. & Fontecave, M. (1993). NADPH-sulfite reductase from *Escherichia coli*. A flavin reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **268**, 18604-18609.

Cuiv, P. O., Clarke, P. & O'Connell, M. (2006). Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **152**, 945-954.

Cuiv, P. O., Keogh, D., Clarke, P. & O'Connell, M. (2007). FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane. *J Bacteriol* **189**, 284-287.

-D-

Dawson, J. H. (1988). Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* **22**, 433-439.

de Cock, H., Struyvé, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T. & Tommassen, J. (1997). Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol*. **269**(4), 473-478.

Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985). X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol*. **5**, 385-398.

Deneer, H. G., Healey, V. & Boychuk, I. (1995). Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria* spp. *Microbiology*. **141**, 1985-1992.

Deniau, C., Gilli, R., Izadi-Pruneyre, N., Létouffé, S., Delepierre, M., Wandersman, C., Briand, C. & Lecroisey, A. (2003). Thermodynamics of heme binding to the HasA(SM) hemophore: effect of mutations at three key residues for heme uptake. *Biochemistry* **42**, 10627-10633.

Dorrestein, P. C., Poole, K. & Begley, T. P. (2003). Formation of the chromophore of the pyoverdine siderophores by an oxidative cascade. *Org Lett* **5**, 2215-2217.

Dougherty, M. J. & Downs, D. M. (2006). A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*. *Microbiology*. **152**, 2345-2353.

Drechsel, H. & Jung, G. (1998). Peptide siderophores. *J Pept Sci*. **4**, 147-181.

Drew, D. (2003). Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escheria coli*., *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 3–10.

Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A. & Nagy, E. (2003). Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol Microbiol*. **49**, 37-53.

-E-

Eakanunkul, S., Lukat-Rodgers, G. S., Sumithran, S., Ghosh, A., Rodgers, K. R., Dawson, J. H. & A., W. (2005). Characterization of the periplasmic heme-binding protein shut from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae*. *Biochemistry*. **44**, 13179-13191.

Elkins, C., Chen, C. J. & Thomas, C. E. (1995). Characterization of the hgbA locus encoding a hemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun*. **63**, 2194-2200.

Endriss, F. & Braun, V. (2004). Loop Deletions Indicate Regions Important for FhuA Transport and Receptor Functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 4818-4823.

Evans, J. S., Levine, B. A., Trayer, I. P., Dorman, C. J. & Higgins, C. F. (1986). Sequence-imposed structural constraints in the TonB protein of *E. coli*. *FEBS Lett* **208**, 211-216.

Ewing, W. H. (1986). The genus *Shigella*., *In Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed., Elsevier Publishing Co., New York.*, 135-172.

Expert, D., Enard, C. & Masclaux, C. (1996). The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*. **4**, 232-237.

-F-

Faraldo-Gomez, J. D. & Sansom, M. S. (2003). Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 105-116.

Faraldo-Gomez, J. D., Smith, G. R. & Sansom, M. S. (2003). Molecular dynamics simulations of the bacterial outer membrane protein FhuA: a comparative study of the ferrichrome-free and bound states. *Biophys J* **85**, 1406-1420.

Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 318-332.

Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2004). Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**, 15-24.

Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (1998a). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**, 2215-2220.

Ferguson, A. D., Breed, J., Diederichs, K., Welte, W. & Coulton, J. W. (1998b). An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from *Escherichia coli* K-12. *Protein Sci* **7**, 1636-1638.

Ferguson, A. D., Braun, V., Fiedler, H. P., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (2000). Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci* **9**, 956-963.

Ferguson, A. D., Chakraborty, R., Smith, B. S., Esser, L., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (2002a). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295**, 1715-1719.

Ferguson, A. D., Welte, W., Hofmann, E., Lindner, B., Holst, O., Coulton, J. W. & Diederichs, K. (2002b). A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins. *Structure*. **15**, 585-592.

Ferguson, A. D., Amezcua, C. A., Halabi, N. M., Chelliah, Y., Rosen, M. K., Ranganathan, R. & Deisenhofer, J. (2007). Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 513-518.

Ferguson, A. D., Koding, J., Walker, G., Bos, C., Coulton, J. W., Diederichs, K., Braun, V. & Welte, W. (2001). Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. *Structure* **9**, 707-716.

Fontcave, M., Coves, J. & Pierre, J. L. (1994). Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals* **7**, 3-8.

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

-G-

Garcia-Herrero, A. & Vogel, H. J. (2005). Nuclear magnetic resonance solution structure of the periplasmic signalling domain of the TonB-dependent outer membrane transporter FecA from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **58**, 1226-1237.

Garcia-Herrero, A., Peacock, R. S., Howard, S. P. & Vogel, H. J. (2007). The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Mol Microbiol* **66**, 872-889.

Gattoni, M., Boffi, A., Sarti, P. & Chiancone, E. (1996). Stability of the heme-globin linkage in alphabeta dimers and isolated chains of human hemoglobin. A study of the heme transfer reaction from the immobilized proteins to albumin. *J Biol Chem.* **26**, 10130-10136.

Genco, C. A. & Dixon, D. W. (2001). Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol.* **39**, 1-11.

Ghosh, J. & Postle, K. (2004). Evidence for dynamic clustering of carboxy-terminal aromatic amino acids in TonB-dependent energy transduction. *Mol Microbiol* **51**, 203-213.

Ghysels, B., Dieu, B. T., 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.

Goldberg, J. B. (2000). *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol* **8**, 55-57.

Goldberg, J. B., Hancock, R. E., Parales, R. E., Loper, J. & Cornelis, P. (2008). *Pseudomonas* 2007. *J Bacteriol.* **190**, 2649-2662.

Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L., Graumann, P. L. & Schalk, I. J. (2007). Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *J Biol Chem* **282**, 2987-2995.

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. *Mol Microbiol* **72**, 1246-1259.

Guerinot, M. L. (1994). Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**, 743-772.

Gumbart, J., Wiener, M. C. & Tajkhorshid, E. (2007). Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophys J* **93**, 496-504.

-H-

Hanson, M. S., Pelzel, S. E., Latimer, J., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1992). Identification of a genetic locus of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1**, 1973-1977.

- Hantke, K. (2001).** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-177.
- Hantke, K. (2003).** Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends in Microbiology* **11**, 192-195.
- Hardalo, C. & Edberg, S. C. (1997).** Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* **23**, 47-75.
- Hennard, C., Truong, Q. C., Desnottes, J. F., Paris, J. M., Moreau, N. J. & Abdallah, M. A. (2001).** Synthesis and activities of pyoverdinin-quinolone adducts: a prospective approach to a specific Therapy against Pseudomonas aeruginosa. *J Med Chem* **44**, 2139-2151.
- Higgs, P. I., Myers, P. S. & Postle, K. (1998).** Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J Bacteriol* **180**, 6031-6038.
- Ho, W. W., Li, H., Eakanunkul, S., Tong, Y., Wilks, A., Guo, M. & Poulos, T. L. (2007).** Holo- and Apo-bound Structures of Bacterial Periplasmic Heme-binding Proteins*. *J Biol Chem.* **7**, 35796-35802.
- Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G. L., Vincent, M., Gallay, J. & Schalk, I. J. (2005).** Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **280**, 20222-20230.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. & Locher, K. P. (2007).** Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **17**, 412-418.
- Hornung, J. M., Jones, H. A. & Perry, R. D. (1996).** The hmu locus of Yersinia pestis is essential for utilization of free haemin and haem--protein complexes as iron sources. *Mol Microbiol.* **20**, 725-739.
- Howard, S. P., Herrmann, C., Stratilo, C. W. & Braun, V. (2001).** In vivo synthesis of the periplasmic domain of TonB inhibits transport through the FecA and FhuA iron siderophore transporters of Escherichia coli. *J Bacteriol* **183**, 5885-5895.
- Huang, B., Ru, K., Yuan, Z., Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (2004).** tonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J Bacteriol* **186**, 4387-4389.
- Hvorup, R. N., Goetz, B. A., Niederer, M., Hollenstein, K., Perozo, E. & Locher, K. P. (2007).** Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* **317**, 1387-1390.
- Idei, A., Kawai, E., Akatsuka, H. & Omori, K. (1999).** Cloning and characterization of the Pseudomonas fluorescens ATP-binding cassette exporter, HasDEF, for the heme acquisition protein HasA. *J Bacteriol* **181**, 7545-7551.

-I-

Imbert, M. & Blondeau, R. (1998). On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol.* **37(1)**, 64-66.

Imperi, F., Tiburzi, F. & Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 20440-20445.

Imperi, F., Mettrick, K. A., Shirley, M., Tiburzi, F., Draper, R. C., Visca, P. & Lamont, I. L. (2008). Iron Transport and Signaling in Pseudomonads. *Pseudomonas Chapter 6*, p 129-165).

-J-

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (1998). X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 2564-2571.

James, H. E., Beare, P. A., Martin, L. W. & Lamont, I. L. (2005). Mutational analysis of a bifunctional ferrisiderophore receptor and signal-transducing protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 4514-4520.

Jaskula, J. C., Letain, T. E., Roof, S. K., Skare, J. T. & Postle, K. (1994). Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. *J Bacteriol* **176**, 2326-2338.

-K-

Kammler, M., Schön, C. & Hantke, K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 6212-6219.

Kampfenkel, K. & Braun, V. (1992). Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J Bacteriol* **174**, 5485-5487.

Kampfenkel, K. & Braun, V. (1993). Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**, 6050-6057.

Karlsson, M., Hannavy, K. & Higgins, C. F. (1993a). A sequence-specific function for the N-terminal signal-like sequence of the TonB protein. *Mol Microbiol* **8**, 379-388.

Karlsson, M., Hannavy, K. & Higgins, C. F. (1993b). ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Mol Microbiol* **8**, 389-396.

Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C. & Shore, V. C. (1960). Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature.* **13**, 422-427.

Khursigara, C. M., De Crescenzo, G., Pawelek, P. D. & Coulton, J. W. (2005). Kinetic analyses reveal multiple steps in forming TonB-FhuA complexes from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**, 3441-3453.

Koebnik, R. (2005). TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol* **13**, 343-347.

Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**, 239-253.

Koedding, J., Howard, P., Kaufmann, L., Polzer, P., Lustig, A. & Welte, W. (2004). Dimerization of TonB is not essential for its binding to the outer membrane siderophore receptor FhuA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**, 9978-9986.

Koster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**, 291-301.

Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. (2007). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta* **27**, 215-237.

Krieg, S., Huche, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lecroisey, A., Wandersman, C., Delepelaire, P. & Welte, W. (2009). Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1045-1050.

-L-

Lamont, I. L., Konings, A. F. & Reid, D. W. (2009). Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Biometals* **22**, 53-60.

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7072-7077.

Langman, L., Young, I. G., Frost, G. E., Rosenberg, H. & Gibson, F. (1972). Enterochelin system of iron transport in *Escherichia coli*: mutations affecting ferric-enterochelin esterase. *J Bacteriol* **112**, 1142-1149.

Lansky, I. B., Lukat-Rodgers, G. S., Block, D., Rodgers, K. R., Ratliff, M. & Wilks, A. (2006). The cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) from the heme uptake system of *Pseudomonas aeruginosa* is an intracellular heme-trafficking protein to the delta-regioselective heme oxygenase. *J Biol Chem.* **281**, 13652-13662.

Larsen, R. A., Wood, G. E. & Postle, K. (1993). The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol Microbiol* **10**, 943-953.

Larsen, R. A., Foster-Hartnett, D., McIntosh, M. A. & Postle, K. (1997). Regions of Escherichia coli TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *J Bacteriol* **179**, 3213-3221.

Larsen, R. A., Myers, P. S., Skare, J. T., Seachord, C. L., Darveau, R. P. & Postle, K. (1996). Identification of TonB homologs in the family Enterobacteriaceae and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J Bacteriol* **178**, 1363-1373.

Lavrrar, J. L., Christoffersen, C. A. & McIntosh, M. A. (2002). Fur-DNA interactions at the bi-directional fecDGC-entS promotor region in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **322**.

le Maire, M., Champeil, P. & Møller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 86-111.

Letain, T. E. & Postle, K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **24**, 271-283.

Letoffe, S., Ghigo, J. M. & Wandersman, C. (1994). Secretion of the Serratia marcescens HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol* **176**, 5372-5377.

Letoffe, S., Redeker, V. & Wandersman, C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from Pseudomonas aeruginosa that shares function and sequence similarities with the Serratia marcescens HasA haemophore. *Mol Microbiol* **28**, 1223-1234.

Letoffe, S., Nato, F., Goldberg, M. E. & Wandersman, C. (1999). Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol* **33**, 546-555.

Létoffé, S., Heuck, G., Delepelaire, P., Lange, N. & Wandersman, C. (2009). Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **14**, (28):11719-11724.

Lewenza, S., Gardy, J. L., Brinkman, F. S. & Hancock, R. E. (2005). Genome-wide identification of Pseudomonas aeruginosa exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen. *Genome Res* **15**, 321-329.

Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C. & Bitter, W. (2006). The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol* **188**, 1882-1891.

Llamas, M. A., Mooij, M. J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Ratledge, C. & Bitter, W. (2008). Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**, 458-472.

Locher, K. P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **27**, (1514):1239-1545. Review.

Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P. & Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**, 771-778.

Loomis, L. & Raymond, K. N. (1991). Solution equilibria of enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* **30**, 906-911.

-M-

Ma, L., Kaserer, W. A., Annamalai, R., Scott, D. C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massia, L. M., Ferreira, L. C., Newton, S. M. & Klebba, P. E. (2006). Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *J Biol Chem.*

Maines, M. D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 517-554.

Maresso, A. W., Garufi, G. & Schneewind, O. (2008). Bacillus anthracis secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog.* **22**, 1000132.

Marlovits, T. C., Haase, W., Herrmann, C., Aller, S. G. & Unger, V. M. (2002). The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 16243-16248.

Matzanke, B. F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A. X. & Hantke, K. (2004). FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry.* **10**, 386-392.

McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. & Andrews, S. C. (2003a). Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 29478-29486.

McHugh, J. P., Rodríguez-Quinoñes, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. & Andrews, S. C. (2003b). Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem.* **8**, :29478-29486.

McMorran, B. J., Merriman, M. E., Rombel, I. T. & Lamont, I. L. (1996). Characterisation of the pvdE gene which is required for pyoverdine synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Gene* **176**, 55-59.

Mettrick, K. A. & Lamont, I. L. (2009). Different roles for anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol.* **74**, 1257-1271.

Meyer, J.-M. & Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties,. *J. Gen. Microbiol.* **107**.

Meyer, J.-M. & Hornspreger, J. (1978). Role of pyoverdinePf, the iron binding fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens iron transport,. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 329-331.

- Meyer, J. M. (2000).** Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* **174**, 135-142.
- Meyer, J. M., Stintzi, A. & Poole, K. (1999).** The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525. *FEMS Microbiol Lett* **170**, 145-150.
- Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M. & Budzikiewicz, H. (2008).** Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* **21**, 259-271.
- Mies, K. A., Wirgau, J. I. & Crumbliss, A. L. (2006).** Ternary complex formation facilitates a redox mechanism for iron release from a siderophore. *Biometals* **19**.
- Miethke, M. & Marahiel, M. A. (2007).** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**, 413-451.
- Mills, M. & Payne, S. M. (1995).** Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **177(11)**, 3004–3009.
- Mills, M. & Payne, S. M. (1997).** Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant. *Infect Immun*, 5358–5363.
- Mirus, O., Strauss, S., Nicolaisen, K., von Haeseler, A. & Schleiff, E. (2009).** TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biol.* **12**.
- Mislin, G. L., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D. & Schalk, I. J. (2006).** Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.*
- Morgan, W. T., Muster, P., Tatum, F. M., McConnell, J., Conway, T. P., Hensley, P. & A., S. (1988).** Use of hemopexin domains and monoclonal antibodies to hemopexin to probe the molecular determinants of hemopexin-mediated heme transport. *J Biol Chem.* **15**, 8220-8225.
- Morton, D. J., Whitby, P. W., Jin, H., Ren, Z. & Stull, T. L. (1999).** Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun.* **67**, 2729-2739.
- Morton, D. J., Seale, T. W., Madore, L. L., VanWagoner, T. M., Whitby, P. W. & Stull, T. L. (2007).** The haem-haemopexin utilization gene cluster (*hxcBA*) as a virulence factor of *Haemophilus influenzae*. *Microbiology.* **153**, 215-224.
- Müller, G. (2000).** Towards 3D structures of G protein-coupled receptors: a multidisciplinary approach. *Curr Med Chem.* **7(9)**, 861-888.

Murphy, E. R., Sacco, R. E., Dickenson, A., Metzger, D. J., Hu, Y., Orndorff, P. E. & Connell, T. D. (2002). BhuR, a virulence-associated outer membrane protein of *Bordetella avium*, is required for the acquisition of iron from heme and hemoproteins. *Infect Immun.* **70**, 5390-5403.

-N-

Nader, M., Dobbelaere, W., Vincent, M., Journet, L., Adams, H., Cobessi, D., Gallay, J. & Schalk, I. J. (2007). Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **46**, 11707-11717.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723-26726.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**, 593-656.

Niyogi, S. K. (2005). Shigellosis. *J Microbiol.* **43**, 133-143.

-O-

Ochsner, U. A., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (1995). Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J Bacteriol* **177**, 7194-7201.

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. *Mol Microbiol* **45**, 1277-1287.

Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. & Hassett, D. J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *J Bacteriol* **182**, 4533-4544.

Odeh, R. & Quinn, J. P. (2000). Problem pulmonary pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*. *Semin Respir Crit Care Med.* **21**, 331-339.

Ogierman, M. & Braun, V. (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *J Bacteriol* **185**, 1870-1885.

Okamura, M. Y., Isaacson, R. A. & Feher, G. (1975). Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**, :3491-3495.

Olczak, T., Simpson, W., Liu, X. & Genco, C. A. (2005). Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 119-144.

Ostermeier, C. (2003). Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins., pp. 73-86.

Ostermeier, C. & Michel, H. (1997). Crystallization of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **7(5)**, 697-701.

-P-

Panek, H. & O'Brian, M. R. (2000). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology.* **148**, 2273-2282.

Paoli, M., Anderson, B. F., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A. & Baker, E. N. (1999). Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct Biol.* **6**, 926-931.

Pawelek, P. D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C. M., Moiseeva, N., Allaire, M. & Coulton, J. W. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, E. coli outer membrane receptor. *Science* **312**, 1399-1402.

Payne, M. A., Igo, J. D., Cao, Z., Foster, S. B., Newton, S. M. & Klebba, P. E. (1997). Biphasic binding kinetics between FepA and its ligands. *J Biol Chem* **272**, 21950-21955.

Payne, S. M., Wyckoff, E. E., Murphy, E. R., Oglesby, A. G., Boulette, M. L. & Davies, N. M. (2006). Iron and pathogenesis of Shigella: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals.* **19(2)**, 173-180.

Perutz, M. F. (1962). Relation between structure and sequence of haemoglobin. *Nature* **9**, 914-917.

Pitt, T. L. (1986). Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis. *J R Soc Med.* **79 Suppl**, 13-18.

Poole, K., Neshat, S. & Heinrichs, D. (1991). Pyoverdine-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 1-5.

Poole, K., Neshat, S., Krebs, 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* **2**, 1651-1653.

Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J. & Gherardini, F. C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **149**, 10887-10892.

Postle, K. & Kadner, R. J. (2003). Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* **49**, 869-882.

Postle, K. & Larsen, R. A. (2004). The TonB, ExbB and ExbD proteins,. *Iron transport in bacteria.* ASM Press, Washington, D.C.

Postle, K. & Larsen, R. A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*.

Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L. & Braun, V. (1988). Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**.

-R-

Rakin, A., Noelting, C., Schubert, S. & Heesemann, J. (1999). Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **67**, 5265-5274.

Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000a). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.

Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000b). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* **54**, 881-941.

Rauscher, L., Expert, D., Matzanke, B. F. & Trautwein, A. X. (2002). Chrysobactin-dependent iron acquisition in *Erwinia chrysanthemi*. Functional study of a homolog of the *Escherichia coli* ferric enterobactin esterase. *J Biol Chem.* **277**, 2385-2395.

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

Redly, 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.

Redly, G. A. & Poole, K. (2005). FpvIR control of fpvA ferric pyoverdine receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of an interaction between FpvI and FpvR and identification of mutations in each compromising this interaction. *J Bacteriol* **187**, 5648-5657.

Robert, V., Volokhina, E. B., Senf, F., Bos, M. P., Van Gelder, P. & Tommassen, J. (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol* **4**, e377.

Roof, S. K., Allard, J. D., Bertrand, K. P. & Postle, K. (1991). Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology by use of PhoA fusions. *J Bacteriol* **173**, 5554-5557.

Rosenberg, M. F., Mao, Q., Holzenburg, A., Ford, R. C., Deeley, R. G. & Cole, S. P. (2001). The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem* **276**, 16076-16082.

Rossi, M. S., Fetherston, J. D., Létoffé, S., Carniel, E., Perry, R. D. & Ghigo, J. M. (2001). Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* **69**, 6707-6717.

Rouault, T. A. (2004). Microbiology. Pathogenic bacteria prefer heme. *Science*. **305**, 1577-1578.

Runyen-Janecky, L. J., Reeves, S. A., Gonzales, E. G. & Payne, S. M. (2003). Contribution of the Shigella flexneri Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun* **71**, 1919–1928.

-S-

Saken, E., Rakin, A. & Heesemann, J. (2000). Molecular characterization of a novel siderophore-independent iron transport system in Yersinia. *Int J Med Microbiol* **290**.

Sansonetti, P. J. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **280(3)**, G319-323.

Sansonetti, P. J. (2006). Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella: the yin and yang of innate immunity. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**, 117–119.

Sauter, A. & Braun, V. (2004). Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **186**, 5303-5310.

Sauter, A., Howard, S. P. & Braun, V. (2003). In vivo evidence for TonB dimerization. *J Bacteriol* **185**, 5747-5754.

Schäfer, G., Purschke, W. G., Gleissner, M. & Schmidt, C. L. (1996). Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochim Biophys Acta*. **1275(1-2)**, 16-20.

Schalk, I. J. (2008). Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* **102**, 1159-1169.

Schalk, I. J., Abdallah, M. A. & Pattus, F. (2002). Recycling of Pyoverdin on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdin Uptake and Dissociation in Pseudomonas aeruginosa. *Biochemistry* **41**, 1663-1671.

Schalk, I. J., Yue, W. W. & Buchanan, S. K. (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transports. *Mol. microbiol.* **submitted**.

Schalk, I. J., Lamont, I. L. & Cobessi, D. (2009). Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from Pseudomonas aeruginosa. *Biometals*.

Schalk, I. J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorselaer, A., Poole, K., Abdallah, M. A. & Pattus, F. (1999). Copurification of the FpvA ferric pyoverdin receptor of Pseudomonas aeruginosa with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **38**, 9357-9365.

- Schauer, K., Rodionov, D. A. & de Reuse, H. (2008).** New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci.* **33**, 330-338.
- Schons, V., Atkinson, R. A., Dugave, C., Graff, R., Mislin, G. L., Rochet, L., Hennard, C., Kieffer, B., Abdallah, M. A. & Schalk, I. J. (2005).** The structure-activity relationship of ferric pyoverdine bound to its outer membrane transporter: implications for the mechanism of iron uptake. *Biochemistry* **44**, 14069-14079.
- Sean Peacock, R., Weljie, A. M., Peter Howard, S., Price, F. D. & Vogel, H. J. (2005).** The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *J Mol Biol* **345**, 1185-1197.
- Seddon, A. M., Curnow, P. & Booth, P. J. (2004).** Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* **1666**, 105-117.
- Shen, J., Meldrum, A. & Poole, K. (2002).** FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 3268-3275.
- Shirley, M. & Lamont, I. L. (2009).** Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*
- Skare, J. T., Ahmer, B. M., Seachord, C. L., Darveau, R. P. & Postle, K. (1993).** Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**, 16302-16308.
- Smith, E. E., Sims, E. H., Spencer, D. H., Kaul, R. & Olson, M. V. (2005).** Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 2138-2147.
- Sritharan, M. (2006).** Iron and bacterial virulence. *Indian J Med Microbiol.* **24**, 163-164.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N.J., and Doudoroff, M. (1966).** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**, 159-271.
- Stojiljkovic, I. & Hantke, K. (1992).** Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359-4367.
- Stojiljkovic, I. & Perkins-Balding, D. (2002).** Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol.* **21**, 281-295.
- Storz, G. & Imlay, J. A. (1999).** Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**, 188-194.
- Struyvé, M., Moons, M. & Tommassen, J. (1991).** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol.* **218**, 141-148.
- Stull, T. L. (1987).** Protein sources of heme for *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* **55**, 148-153.

-T-

Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Ichinose, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J Bacteriol* **192**, 117–126.

Takase, H., Nitandai, H., Hoshino, K. & Otani, T. (2000a). Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun* **68**, 4498-4504.

Takase, H., Nitandai, H., Hoshino, K. & Otani, T. (2000b). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* **68**, 1834-1839.

Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J., van der Helm, D., Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E. & Philpott, C. C. (1981). Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* **20**, 6446-6457.

Tong, Y. & Guo, M. (2007). Cloning and characterization of a novel periplasmic heme-transport protein from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Inorg Chem* **12**, 735-750.

Tong, Y. & Guo, M. (2009). Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch Biochem Biophys.* **1**, 1-15.

Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys.* **1**, 1-6. Review.

Tsukihara, T. & Lee, S. J. (1999). Membrane proteins: structure and function. *J. Synchrotron Rad.* **6**, 918-927.

-UVW-

Usher, K. C., Ozkan, E., Gardner, K. H. & Deisenhofer, J. (2001). The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from *Escherichia coli*, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10676-10681.

Vanderpool, C. K. & Armstrong, S. K. (2001). The *Bordetella bhui* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol.* **183**, 4278-4287.

Velayudhan, J., Hughes, N. J., McColm, A. A., Bagshaw, J., Clayton, C. L., Andrews, S. C. & Kelly, D. J. (2000). Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol.* **37**, 274-286.

Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **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*. *Mol Microbiol* **45**, 1177-1190.
- Wagner, V. E. & Iglewski, B. H. (2008).** *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* **35**, 124-134.
- Wallin, E. & von Heijne, G. (1998).** Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacteria, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029–1038.
- Wandersman, C. & Stojiljkovic, I. (2000).** Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**, 215-220.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004).** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611-647.
- Wang, D. N., Safferling, M., Lemieux, M. J., Griffith, H., Chen, Y. & Li, X. D. (2003).** Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochim Biophys Acta.* **1610**, 23-36.
- Wiener, M. C. (2005).** TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 394-400.
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., Wilson, M. J., Cunliffe, H. E., Lamont, I. L. & Vasil, M. L. (2001).** Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**, 5385-5394.
- Wilks, A. (2001).** The ShuS protein of *Shigella dysenteriae* is a heme-sequestering protein that also binds DNA. *Arch Biochem Biophys* **387**, 37–142.
- Wilks, A. (2002).** Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Signal.* **4(4)**, 603-614.
- Wilks, A. & Burkhard, K. A. (2007).** Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat Prod Rep.* **24**, 511-522.
- Wilson, M. J. & Lamont, I. L. (2000).** Characterization of an ECF sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 578-583.
- Winkelmann, G. (2002).** Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans.* **30**, 691-696.
- Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F. & Cobessi, D. (2007).** From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. *J Mol Biol* **368**, 398-406.
- Wyckoff, E. E., Duncan, D., Torres, A. G., Mills, M., Maase, K. & Payne, S. M. (1998).** Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **28**, 1139-1152.

-YZ-

Yamamoto, M., Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1982). Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthase in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 985-990.

Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. N. & Schalk, I. J. (in press). An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* **In press**.

Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L. & Schalk, I. J. (2009). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*. **29**. [Epub ahead of print].

You, S. A. & Wang, Q. (2005). Ferritin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. **357**, 1-16.

Yue, W. W., Grizot, S. & Buchanan, S. K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol Biol* **332**, 353-368.

Zamocky, M., Furtmüller, P. G. & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*. **10**, 1527-1548.

Zhao, Q. & Poole, K. (2000). A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**, 127-132.

Études structurales et fonctionnelles des récepteurs TonB-dépendants de bactéries à Gram-négatif

RESUME

Le fer est un élément important de plusieurs métabolismes et fonctions physiologiques. Il possède la propriété de gagner ou de perdre facilement un électron, passant ainsi de la forme ferreuse (Fe^{2+}) à la forme ferrique (Fe^{3+}), et inversement. C'est cette propriété qui lui confère un rôle primordial dans les phénomènes d'oxydations et de réductions biologiques. Bien qu'il soit très abondant dans la croûte terrestre, le fer est très peu soluble en milieu aérobie et à pH physiologique et est de ce fait très peu biodisponible. La concentration de Fe^{3+} libre dans l'environnement est d'environ 10^{-18} M, bien trop basse pour les bactéries pathogènes qui exigent une concentration de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} M pour établir et maintenir une infection. Pour contourner le problème de la faible disponibilité de fer, les bactéries ont développé différents mécanismes d'acquisition de ce métal. Le mécanisme le plus répandu implique la synthèse et la sécrétion des sidérophores, ayant une très forte affinité pour le Fe^{3+} . Après leur sécrétion, les sidérophores chélatent le Fe^{3+} dans le milieu extracellulaire et le transportent au travers de la membrane externe *via* les récepteurs TonB-dépendants (RTBDs). Les RTBDs sont également impliqués dans le transport d'autres molécules comme l'hème. Durant cette thèse nous nous sommes intéressés à l'étude structurale des RTBDs de différentes bactéries à Gram-négatif et aussi au devenir, au niveau du périplasma, de la ferri-pyoverdine, après son transport à travers la membrane externe *via* le RTBD FpvA chez *P. aeruginosa*.

Pour les **études structurales**, nous nous sommes intéressés à 4 RTBDs (ShuA, SuxA, FauA et FetA). Nous avons défini et optimisé un protocole de surexpression, de purification et de cristallisation pour les RTBDs. Le protocole mis en place est rapide, efficace et reproductible. Il nous a permis de purifier, de cristalliser rapidement et de collecter des données de diffraction pour 4 RTBDs. La structure de ShuA a ensuite été résolue à 2,6 Å, celle de FauA à 2,3 Å de résolution par le Dr D. Cobessi. Celle de FetA est actuellement en cours d'affinement à 3,2 Å.

Pour les **études fonctionnelles**, nous nous sommes intéressés à l'implication des gènes du cluster *fpvCDEFGHJK* dans l'acquisition du fer par la voie Pvd chez *P. aeruginosa*. Ce cluster est conservé chez toutes les espèces de *Pseudomonas* produisant la Pvd, il est organisé en 2 opérons, *fpvCDEF* et *fpvGHJK*, séparés par 32 paires de bases. Les résultats obtenus pendant cette thèse, suggèrent l'implication des protéines FpvCDEF dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . En effet, la mutation de ces gènes abolie complètement le transport du fer par la Pvd. Le phénotype sauvage a été restauré par l'addition du DTT, suggérant l'implication de ses protéines dans la dissociation périplasmique de la ferri-pyoverdine par réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Nous avons également montré que la protéine FpvG est une protéine périplasmique dont l'expression est régulée par les niveaux de fer. Les études de spectrométrie de masse et de dosage des métaux ont montré que cette protéine était également capable de lier directement le fer. Enfin, l'étude des interactions protéine-protéine a montré une interaction entre les protéines FpvG et FpvA, confirmant l'implication de la protéine FpvG dans le transport du fer par la Pvd. FpvG serait probablement impliquée dans la prise en charge du fer dans le périplasma après sa dissociation de la Pvd et assurant ensuite son transport vers le cytoplasme *via* le transporteur ABC FpvHJ. L'ensemble de ces résultats a permis également de montrer que le transport du fer *via* la Pvd implique des mécanismes très différents de ceux qui sont décrits précédemment pour les sidérophores utilisés par *E. coli*.

Mots clés : fer, ferri-pyoverdine, RTBDs, études structurales, études fonctionnelles, *P. aeruginosa*