



# THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

**Emilie Yétérian**

le 17 juin 2010 à Strasbourg

Bases moléculaires de la  
maturation et de la sécrétion de la  
pyoverdine chez  
*Pseudomonas aeruginosa*

Membres du jury :

Pr. Bruno Kieffer  
Dr. Philippe Delepelaire  
Pr. Philippe Lemanceau  
Pr. Marc Fontecave  
Dr. Catherine Llanes  
Dr. Isabelle Schalk

Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse

# THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

**Emilie Yétérian**

le 17 juin 2010 à Strasbourg

Bases moléculaires de la  
maturation et de la sécrétion de la  
pyoverdine chez  
*Pseudomonas aeruginosa*

Membres du jury :

Pr. Bruno Kieffer  
Dr. Philippe Delepelaire  
Pr. Philippe Lemanceau  
Pr. Marc Fontecave  
Dr. Catherine Llanes  
Dr. Isabelle Schalk

Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Isabelle de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et d'avoir dirigé ce travail de thèse. Merci de la confiance et de la liberté que tu as su m'accorder et pour tout ce que tu m'as appris. Merci également à tous les membres du laboratoire pour ce qu'ils m'ont apporté.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces années de thèse et avec qui j'ai pu échanger de science ou de toutes autres choses. Merci grandement à tous ceux qui, par leurs qualités humaines, leur gentillesse, leur bonne humeur et leur efficacité, ont rendu le quotidien tellement plus agréable.

Je remercie les ingénieurs de la plate-forme de microscopie de l'IGBMC pour leurs conseils avisés et leur aide technique à la mise au point du projet de microscopie de fluorescence.

Je remercie aussi tous les membres du bureau de l'ADDAL et je les encourage dans la poursuite de leur action en faveur des doctorants. Merci à Eve et à Cécile pour leur écoute et leurs conseils.

Je remercie particulièrement Jean-Paul, qui a su me guider vers une réflexion plus critique et plus éclairée de la science et de la vie en général.

Enfin, un grand merci à tous mes amis et à ma famille qui, de près ou de loin géographiquement, m'ont encouragée et soutenue pendant ces années de doctorat.

Merci à vous, mes parents, pour l'éducation que vous m'avez offerte et les valeurs que vous m'avez transmises. Merci infiniment à toi, Maman, d'avoir toujours été présente et d'avoir toujours fait pour le mieux.

Merci à toi Laurent, pour ton engagement à mes côtés.



# Sommaire

<b>Présentation du manuscrit .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>Première partie .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>I. Introduction générale .....</b>	<b>- 11 -</b>
A. Généralités sur l'organisme d'étude, <i>P. aeruginosa</i> .....	- 11 -
B. Le fer : quelle importance ?.....	- 13 -
C. L'homéostasie du fer.....	- 15 -
<b>II. Les sidérophores.....</b>	<b>- 21 -</b>
A. Définition - Généralités.....	- 21 -
B. Classification des sidérophores - Structure .....	- 22 -
C. Les sidérophores chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 24 -
<b>III. L'acquisition du fer via la pyoverdine et sa régulation chez <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>- 29 -</b>
A. Le transport du fer par la pyoverdine .....	- 30 -
B. Le système de régulation de la pyoverdine.....	- 44 -
<b>IV. Biosynthèse et maturation de la pyoverdine .....</b>	<b>- 49 -</b>
A. Les NRPS.....	- 49 -
B. La synthèse du squelette carboné de la pyoverdine .....	- 51 -
C. Les enzymes de modification.....	- 53 -
D. Les étapes de maturation.....	- 54 -
E. Organisation génomique : le « locus <i>pvd</i> ».....	- 55 -
<b>V. Sécrétion de la pyoverdine .....</b>	<b>- 59 -</b>
A. L'export de la pyoverdine .....	- 59 -
B. L'export des autres sidérophores bactériens.....	- 60 -
C. Les différents systèmes d'efflux bactériens .....	- 62 -
<b>Deuxième partie .....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>- 73 -</b>
1.1 Introduction à l'article 1.....	- 73 -
1.2 Propriétés spectrales de la pyoverdine .....	- 74 -
1.3 Technique de microscopie de fluorescence .....	- 75 -
1.4 Résumé de l'article 1.....	- 76 -
1.5 Article 1.....	- 77 -
1.6 Discussion de l'article 1 .....	- 93 -
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>- 99 -</b>
2.1 Introduction du chapitre.....	- 99 -
2.2 Article 2 : Identification d'une pompe d'efflux impliquée dans le recyclage de la pyoverdine vers le milieu extracellulaire .....	- 101 -
2.2.1 Introduction à l'article 2 .....	- 101 -
2.2.2 Résumé de l'article 2 .....	- 101 -
2.2.3 Article 2.....	- 102 -

2.2.4	Discussion de l'article 2 .....	- 111 -
2.3	Article 3 : Implication de la pompe PvdRT-OmpQ dans la sécrétion de la pyoverdine nouvellement synthétisée .....	- 114 -
2.3.1	Introduction à l'article 3 .....	- 114 -
2.3.2	Résumé de l'article 3 .....	- 115 -
2.3.3	Article 3.....	- 116 -
2.3.4	Discussion de l'article 3 .....	- 145 -
<b>Troisième partie .....</b>		<b>- 149 -</b>
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>		<b>- 151 -</b>
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>- 159 -</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>- 161 -</b>

## Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADP : Adénosine Di-Phosphate  
Arg : Arginine  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
CCCP : Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenylhydrazone  
CFP : Cyan Fluorescent Protein  
Da : Dalton  
Dab : Di-aminobutyrate  
DO : Densité Optique  
ECF : ExtraCyttoplasmic Fonction  
EDDHA : EthyleneDiamine-N,N'-bis(Di-Hydroxyphenylacetic Acid)  
Fes : Ferric Enterobactin Esterase  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert  
FUR : Ferric Uptake Regulator  
Glu : Glutamate  
IS : Iron Starvation  
Kb : Kilobase  
Lys : Lysine  
MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion  
MFP : Membrane Fusion Protein  
MFS : Major Facilitator Superfamily  
MDR : Multi Drug Resistance  
NRPS : Non Ribosomal Peptide Synthetase  
OMF : Outer Membrane Factor  
Orn : Ornithine  
PBP : Periplasmic Binding Protein  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
Pro : Proline  
Pvd : Pyoverdine  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RND : Resistance Nodulation cell Division  
SMR : Small Multidrug Resistance  
Ser : Sérine  
TAT : Twin-Arginine Translocase  
TCA : TriCarboxylic Acid  
Thr : Thréonine  
Tyr : Tyrosine



## Présentation du manuscrit

Le fer est un élément indispensable à la vie de tout organisme vivant. Il joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, comme la synthèse d'ADN, la respiration ou la photosynthèse. Malgré la grande abondance de ce métal dans la couche terrestre, la concentration en fer libre disponible dans les biotopes colonisés est largement trop basse pour une acquisition par diffusion passive du fer au travers des parois bactériennes et permettre la croissance de micro-organismes en conditions aérobies (Guerinot, 1994; Ratledge and Dover, 2000). En conséquence, les bactéries ont développé de nombreuses stratégies très efficaces pour acquérir ce métal de différentes sources (Guerinot, 1994).

Un premier mécanisme implique la réduction dans le milieu extracellulaire des ions ferriques insolubles en ions ferreux, très solubles, qui peuvent alors diffuser librement à travers les porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le fer est ensuite transporté dans le cytoplasme par des systèmes de type FeoB, un transporteur ABC du fer ferreux conservé dans de nombreuses espèces (Kammler et al., 1993; Koster, 2005).

Tous les autres mécanismes d'assimilation du fer impliquent un transport actif via des voies d'acquisition spécifiques. Chez les bactéries à Gram négatif, ces différentes voies incluent toujours un récepteur spécifique de membrane externe, le complexe TonB-ExbB-ExbD ancré dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire au transport à travers la membrane externe et un transporteur ABC ou une perméase pour le passage de la membrane interne. Dans les bactéries pathogènes, on retrouve ce type de mécanisme pour l'acquisition du fer complexé aux protéines de stockage (transferrine et lactoferrine) ou à l'hème de l'organisme hôte (Cescau et al., 2007; Cornelissen, 2003). Cependant, ce schéma de transport actif est plus largement utilisé par les bactéries pour acquérir du fer dans l'environnement par l'intermédiaire de sidérophores.

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire (200 à 2000 Da) ayant une très forte affinité pour le fer ferrique et qui sont synthétisés et sécrétés par les bactéries en condition de carence en fer (Miethke and Marahiel, 2007). Le transport du fer via les sidérophores représente probablement la forme la plus commune d'acquisition du fer parmi les bactéries, ce qui explique certainement la diversité de sidérophores produit par les microorganismes. A ce jour, plus de 500 sidérophores de structure chimique différentes ont été répertoriés.

Durant ma thèse, je me suis intéressée au principal sidérophore produit par *Pseudomonas aeruginosa*, la pyoverdine. Cette molécule, de nature peptidique, possède une structure relativement complexe, avec la présence d'un chromophore (Meyer, 2000). Le processus de biosynthèse de la pyoverdine implique plusieurs étapes et fait intervenir de nombreuses enzymes (Visca et al., 2007).

Ces 30 dernières années, les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport des complexes ferrisidérophores du milieu extracellulaire vers le cytoplasme des bactéries Gram-négatives ont bénéficié de beaucoup plus d'attention que la biosynthèse et la sécrétion des sidérophore dans le milieu extracellulaire.

Je me suis donc plus particulièrement penchée sur les dernières étapes de synthèse de la pyoverdine, encore peu comprises, mais aussi sur la voie impliquée dans la sécrétion de ce sidérophore, sujet sur lequel rien n'était connu à mon arrivée au laboratoire. Ce travail a été effectué, pour la partie biologie moléculaire, en collaboration avec le laboratoire du professeur Iain Lamont de l'Université d'Otago en Nouvelle-Zélande.

La première partie de ce manuscrit est une introduction bibliographique décrivant les sidérophores et plus particulièrement la pyoverdine produites par *P. aeruginosa*. La biosynthèse de ce sidérophore, la régulation de sa production, ainsi que les mécanismes de transport du complexe ferripyoverdine y sont décrits.

Dans la deuxième partie sont exposés les travaux réalisés et les résultats obtenus durant cette thèse. Le chapitre 1 porte sur l'export d'un précurseur de la pyoverdine à travers la membrane interne et les étapes de maturation tardives de ce précurseur dans le périplasme de la bactérie. Le chapitre 2 concerne l'identification de la pompe à efflux impliquée dans la sécrétion et le recyclage de la pyoverdine vers le milieu extracellulaire.

L'ensemble des résultats obtenus seront discutés dans la troisième partie et des perspectives à ce projet seront proposées. En conclusion, un schéma récapitulera les différents apports à l'avancement du domaine.

# **Première partie**

## **Introduction bibliographique**



# I. Introduction générale

## A. Généralités sur l'organisme d'étude, *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa*, autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie versatile et ubiquitaire dans l'environnement. Elle est communément trouvée dans le sol et l'eau (eaux douces et marines) et sur les surfaces en contact avec ces milieux. Etymologiquement, le mot issu du grec *pseudo* (= 'simili' ou 'imitation') et *monas* (= 'unité') désignait les « germes » du début de la microbiologie. Le mot *aeruginosa*, qui signifie vert-de-gris en latin, fait référence au pigment contenu par la bactérie, qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. *P. aeruginosa* est l'espèce type du groupe *Pseudomonas*, également composé de 12 autres membres.

### 1. Caractéristiques morphologiques et fonctionnelles

*P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, aérobic strict, oxydase positif, lactose négatif. Morphologiquement, cette bactérie est un germe non sporulé, en forme de bâtonnet de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'une longueur de 1,5 à 3  $\mu\text{m}$ . Pratiquement toutes les souches sont mobiles grâce à un flagelle polaire unique.

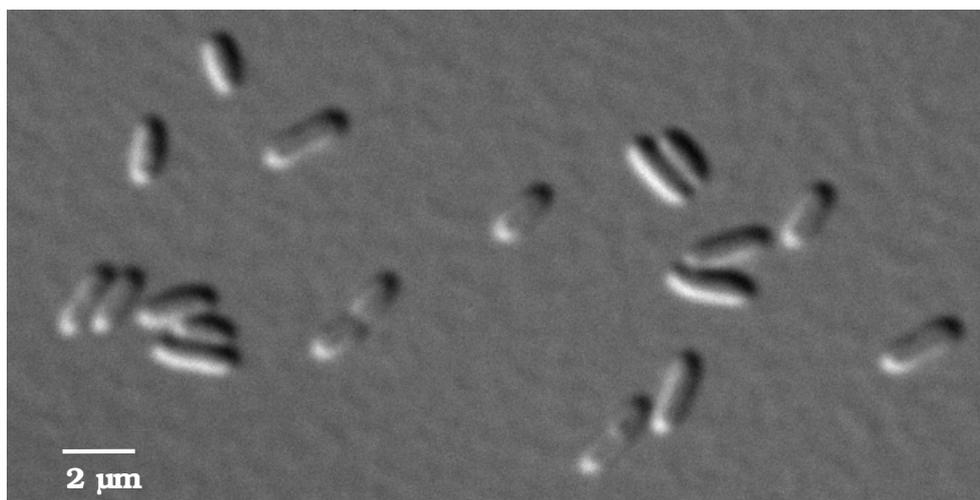


Figure 1 : Bacilles de *P. aeruginosa* de la souche PAO1 vues en microscopie de contraste interférentiel différentiel.

Dans l'environnement, les bactéries *Pseudomonas* typiques sont retrouvées soit sous forme planctonique, comme un organisme unicellulaire, nageant activement grâce

à son flagelle, soit dans un biofilm qu'elles secrètent, attaché à une surface ou un substrat. *P. aeruginosa* requiert des nutriments très simples et a des besoins nutritionnels minimums. Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. Cependant, la bactérie est capable de pousser jusqu'à une température de 42°C.

*P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de composés qui vont augmenter sa virulence et sa pathogénicité, notamment :

- des enzymes extracellulaires de type oxydase, comme des élastases et des protéases, qui vont avoir une activité au stade invasif de l'infection. Associées, l'élastase et la protéase alcaline peuvent détruire l'intégrité des tissus de l'hôte en dégradant des protéines telles que l'élastine, le collagène et les transférines (Aumercier et al., 1990; Kawaharajo et al., 1975),

- des toxines protéiques extracellulaires, l'exoenzyme S et l'exotoxine A. L'exoenzyme S a une activité ADP-ribosyl transférase nécrosante. L'exotoxine A entraîne une ribosylation de l'ADP du facteur d'élongation 2 eucaryote, entraînant une inhibition de la synthèse protéique dans les cellules affectées (Iglewski et al., 1978),

- la pyoverdine et la pyochéline, des sidérophores sécrétés par la bactérie en condition de carence en fer, qui agiraient comme des toxines pour l'hôte en séquestrant le fer de l'hôte (Meyer et al., 1996; Takase et al., 2000a),

- la pyocyanine, un pigment soluble bleu-vert, qui serait aussi associé à la virulence du pathogène. Cette toxine de faible poids moléculaire peut facilement traverser les membranes biologiques et affecterait différentes fonctions dans la cellule hôte, telles que l'inhibition de la respiration cellulaire, de la fonction ciliaire ou de la croissance des cellules épidermiques (Lau et al., 2004).

## **2. Caractéristiques génomiques**

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé à la fin des années 1990 (Stover et al., 2000). Il s'agit de l'un des plus gros génomes bactériens complètement séquencé, avec environ 6,25 millions de paires de bases, ce qui représente plus de 5500 gènes (5570 cadres de lecture ouverts (ORFs) annotés ou prédits). Cette importance quantitative génique rapproche *P. aeruginosa* de la complexité du génome de l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*, qui code pour environ 6200 protéines. *P. aeruginosa* contient une grande proportion de gènes régulateurs, ce qui est en adéquation avec sa grande taille génomique et avec sa capacité d'adaptation environnementale.

A l'heure actuelle, un site internet dédié à l'organisme *Pseudomonas*, <http://www.pseudomonas.com/>, compile tous les gènes séquencés, ainsi que leurs différentes caractéristiques.

### **3. Un problème de santé publique**

*P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste, qui exploite les failles des défenses de l'hôte pour initier une infection. Chez l'homme, cette bactérie va s'attaquer aux personnes immunodéprimées (grands brûlés, malades du SIDA ou du cancer) ou atteintes de mucoviscidose et causer des infections opportunistes variées. Le taux de mortalité chez les patients immunodéprimés atteint 50%.

L'un des facteurs majeurs de sa prédominance comme pathogène est sa résistance intrinsèque aux antibiotiques et aux antiseptiques, qui la classe parmi les bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. En effet, *P. aeruginosa* possède d'une part une membrane externe très peu perméable en comparaison d'autres membranes bactériennes et d'autre part des mécanismes de résistance secondaire, tels que des pompes d'efflux, qui permettent à la bactérie de se détoxifier de tout élément délétère pour elle (Hancock, 1998). *P. aeruginosa* maintient aussi des plasmides de résistance aux antibiotiques, les R-factors et RTFs (de l'anglais Resistance Transfert Factors), qu'elle est capable de transmettre par des transferts de gène horizontaux, principalement transduction et conjugaison (Tenover, 2006). Enfin, cette bactérie a tendance à coloniser les surfaces sous forme de biofilm. Lors d'une infection, la couche d'alginate formant la matrice du biofilm permet d'ancrer les cellules à leur environnement et de les protéger des défenses de l'hôte (Parsek and Singh, 2003). Pour toutes ces raisons, *P. aeruginosa* pose un problème de santé publique très important.

### **B. Le fer : quelle importance ?**

Parmi les métaux de transition ayant une relevance biologique (fer, zinc, cuivre, manganèse, cobalt, nickel, molybdène et tungstène), le fer est probablement le plus important des métaux impliqué dans le métabolisme cellulaire. Cette prédominance peut être expliquée par la grande réactivité chimique de cet élément.

Dans les systèmes biologiques, incorporé dans les protéines, le fer aura principalement un rôle de biocatalyseur (ou centre catalyseur) ou de donneur d'électron.

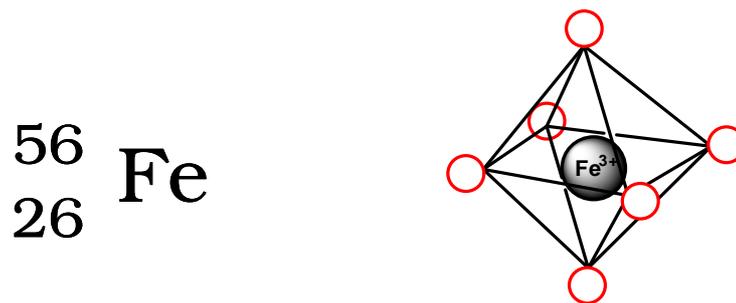
#### **1. Propriétés chimiques**

Le fer est le 4<sup>e</sup> élément le plus abondant dans la croûte terrestre (5 % de sa masse). Avec un nombre de charge de 26, le fer possède une sous couche électronique « d » incomplète et se classe donc dans la catégorie des métaux de transition. La structure électronique de l'atome de fer en fait un élément très réactif chimiquement,

qui peut subir des changements réversibles dans son état d'oxydation. Le fer possède trois degrés d'oxydation et peut se retrouver sous les formes Fe, Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>. Le potentiel redox standard des couples (Fe<sup>2+</sup>/Fe) et (Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>) est de - 0,44 V et de + 0,77 V, respectivement.

Sous conditions aérobie, l'ion ferreux est instable. En effet, en présence d'oxygène et à pH neutre, les ions ferreux sont rapidement oxydés en ions ferriques, qui précipitent sous la forme d'oxy-hydroxydes polymériques insolubles (Ratledge and Dover, 2000). La solubilité de cet hydroxyde ferrique est alors extrêmement basse (de l'ordre de 10<sup>-18</sup> M). De ce fait, bien que le fer soit quantitativement très important dans la nature, sa biodisponibilité est très limitée par la haute insolubilité du Fe<sup>3+</sup> à pH physiologique.

Les ions ferriques possèdent 6 sites de coordination, qui permettent la formation de complexes Fe<sup>3+</sup> octaédriques hexadentés. Le Fe<sup>3+</sup> aura une préférence, par ordre décroissant, pour les ligands oxygénés et azotés, tandis que le Fe<sup>2+</sup> sera plutôt thiophile puis azophile.



**Figure 2** : Caractéristiques chimiques du fer - Représentation symbolique du fer indiquant le numéro atomique et nombre de masse et représentation schématisée des 6 sites de coordination du Fe<sup>3+</sup>.

En conditions physiologiques, le fer existe principalement dans un des 2 états redox facilement convertibles, sa forme ferreuse réduite Fe<sup>2+</sup> ou sa forme ferrique oxydée Fe<sup>3+</sup>. Il peut aussi adopter différents états de spins (haut ou bas) dans les deux formes ferreux et ferrique, dépendant de son environnement ligand. La capacité de transfert d'électron de l'atome de fer est donc modifiée par l'environnement ligand dans lequel le fer est incorporé, exemplifiée par la large gamme de potentiels d'oxydoréduction des composants contenant du fer allant de + 300 mV à - 500 mV (Guerinot, 1994).

Ces propriétés font du fer un composant prosthétique extrêmement versatile, particulièrement utile dans les réactions biologiques.

## **2. Propriétés biologiques**

Le fer est un micronutriment indispensable pour pratiquement tous les organismes vivants (mis à part les bactéries lactiques pour lesquelles le manganèse et le cobalt sont utilisés à la place du fer (Weinberg, 1997)). En effet, le fer est un constituant essentiel d'enzymes, cruciales pour de nombreux processus biologiques majeurs, tels que la photosynthèse, la respiration, le transfert d'électron, le cycle du TCA (TriCarboxylic Acid), le transport et le métabolisme de l'oxygène, la régulation génique, la biosynthèse d'acides nucléiques (Andrews et al., 2003; Braun, 1997). Seul ou incorporé dans des clusters fer-soufre ou dans l'hème, le fer sert de centre catalytique ou de cofacteur essentiel d'enzymes pour des réactions redox.

Ainsi, il est communément admis que de nombreuses bactéries requièrent une concentration minimale de fer biodisponible, supérieure à  $10^{-6}$  M, pour avoir une croissance optimale (Guerinot, 1994). La concentration en fer libre dans les environnements terrestres et aqueux, en condition aérobie et pH neutre, sont estimés approximativement entre  $10^{-9}$ M et  $10^{-18}$  M selon les milieux (Chipperfield and Ratledge, 2000; Ratledge and Dover, 2000). Dans les systèmes biologiques infectés, le fer est généralement séquestré dans des protéines porteuses telles que la lactoferrine, la transferrine et les ferritines ou par liaison à l'anneau protoporphyrine dans les hémoprotéines (Wandersman and Delepelaire, 2004). A pH physiologique, les niveaux de  $Fe^{3+}$  libre dans les fluides corporels de l'hôte sont inférieurs à  $10^{-18}$ M. En conséquence, les concentrations environnementales ou cellulaires en ion ferrique sont trop basses pour que les microorganismes puissent survivre en utilisant seulement le fer libre. Pour récupérer le fer nécessaire à leur croissance, les bactéries ont donc développé de nombreuses stratégies pour acquérir le fer de différentes sources, notamment la réduction d'ions ferriques en ions ferreux, l'acquisition du fer des protéines de liaison au fer ou de l'hème de l'hôte colonisé, ou le transport du fer de l'environnement par des sidérophores (Wandersman and Delepelaire, 2004).

### **C. L'homéostasie du fer**

Bien que le fer soit essentiel, sa concentration doit être finement régulée au niveau intracellulaire de telle manière qu'il n'y ait virtuellement pas de fer libre dans les organismes vivants. En effet, si toutes les molécules de  $Fe^{2+}$  ne sont pas prises en charge par des protéines de stockage, une dismutation appelée réaction de Fenton, peut se produire. Cette réaction est causée par la capacité des ions ferreux à catalyser la

décomposition du peroxyde d'hydrogène, générant des radicaux hydroxyles hautement réactifs (Fenton, 1876) (Figure 3).



Figure 3 : La réaction de Fenton. Les radicaux hydroxyles ainsi produits sont hautement réactifs et attaquent notamment l'ADN et les membranes.

Ces radicaux libres peuvent alors causer des dommages oxydatifs ultimes aux macromolécules biologiques pouvant entraîner la mort de la cellule (Storz and Imlay, 1999). Le métabolisme du fer doit donc être finement équilibré en termes d'acquisition et de stockage.

L'expression de la machinerie homéostatique du fer est sujette à un contrôle global, dépendant du fer, s'assurant d'une part que l'acquisition, le stockage et la consommation sont adaptés à la disponibilité en fer et d'autre part que les niveaux intracellulaires du fer libre n'atteignent pas des niveaux toxiques (Andrews et al., 2003). A cette fin, il existe plusieurs systèmes de régulation à différents niveaux des processus biologiques chez les bactéries (figure 5) (Masse and Arguin, 2005).

## **1. La protéine FUR**

Chez les bactéries Gram négatif, le facteur de régulation Fur (de l'anglais Ferric Uptake Regulator) joue un rôle central dans le contrôle de l'acquisition du fer, par une régulation génique à la fois négative et positive (Hantke, 2001).

Lorsque le niveau de  $\text{Fe}^{2+}$  intracellulaire atteint un seuil trop élevé, Fur inhibe la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'acquisition du fer. En effet, la protéine Fur, liée à son co-répresseur  $\text{Fe}^{2+}$ , peut se fixer au niveau d'une séquence cible, la boîte Fur, située dans la région promotrice des gènes cibles et ainsi réprimer leur transcription (Escolar et al., 1999). Le fer ferreux est un cofacteur nécessaire à la dimérisation de Fur puis à sa liaison à l'ADN. Au contraire, lorsque les cellules sont privées de fer, la protéine Fur se retrouve majoritairement sous forme « apo » et ne peut plus dimériser. Cette forme perd sa capacité de fixation à l'ADN, permettant ainsi la transcription des gènes cibles. Par ce mécanisme, Fur peut moduler directement l'expression de nombreux gènes.

Fur va aussi pouvoir contrôler indirectement les systèmes d'assimilation du fer via la régulation de l'expression de certains facteurs sigma de fonction extracytoplasmiques ( $\sigma$ -ECF) ou d'autres régulateurs (par exemple régulateurs de type AraC) (Braun et al., 2006; Michel et al., 2005). Dans le génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, parmi les 19 gènes codants pour des facteurs  $\sigma$ -ECF (Llamas et al., 2008; Potvin et al., 2008), 10 sont prédits être régulés par Fur (van Oeffelen et al., 2008).

De nombreux gènes sont aussi régulés positivement par Fur par un contrôle post-transcriptionnel de leurs ARN messagers via des petits ARN non codants (Masse et al., 2003b).

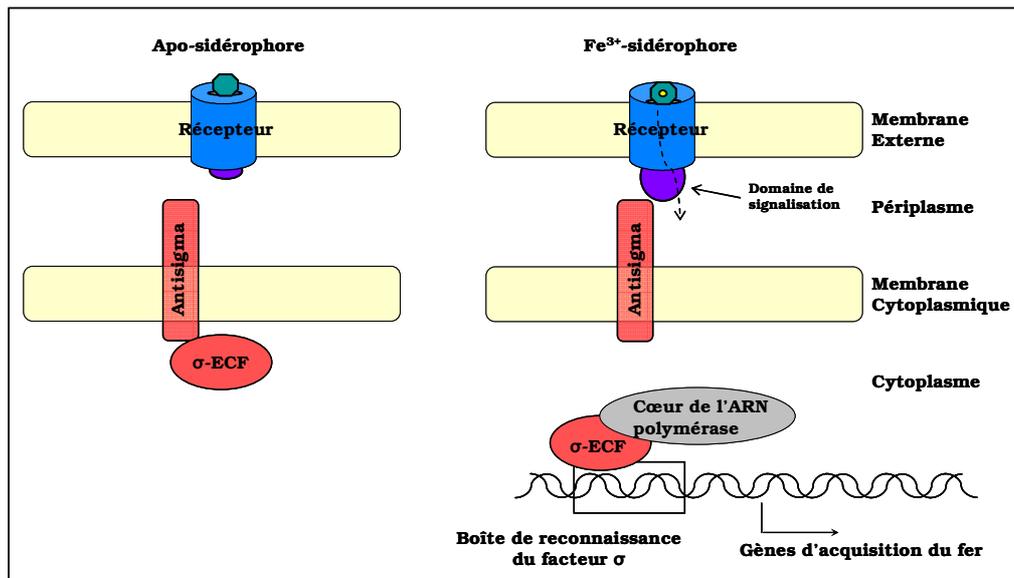
Enfin, *fur* est lui-même régulé par le stress oxydatif et possède un site de liaison pour la protéine répresseur cAMP-catabolite dans sa région promotrice (Storz and Imlay, 1999). Cela lie l'expression de Fur au métabolisme général de la cellule.

Le régulateur Fur est une protéine conservée dans différentes bactéries Gram-négatif, notamment dans les espèces *E.coli*, *Vibrio* ou *Yersinia*. Un homologue de *fur* est présent dans le génome de *P. aeruginosa* (Ravel and Cornelis, 2003). Ce gène *fur* est probablement essentiel chez *P.aeruginosa*, puisque aucun mutant de délétion de ce gène n'a pu être obtenu dans cette bactérie (Vasil and Ochsner, 1999). Un nouvel algorithme de recherche des sites de liaison à Fur dans *P. aeruginosa* a permis, non seulement de confirmer les données obtenues dans les études sur micro-puces (Ochsner et al., 2002b; Palma et al., 2003), mais aussi de prédire la régulation par Fur de gènes supplémentaires (van Oeffelen et al., 2008).

## **2. Les facteurs $\sigma$ -ECF**

Les facteurs  $\sigma$ -ECF sont des facteurs  $\sigma$  alternatifs, qui, en se liant au cœur de l'ARN polymérase bactérienne, fournissent un moyen de réguler la transcription d'un ensemble de gènes spécifiques, en réponse à différents changements extracellulaires (Helmann, 2002; Potvin et al., 2008).

Dans les bactéries Gram-négatif, la régulation des gènes de la biosynthèse de certains sidérophores et de leur acquisition est directement assurée par des facteurs  $\sigma$ -ECF, eux-mêmes contrôlés par un facteur anti- $\sigma$  membranaire. En conditions de carence en fer, la liaison du ferrisidérophore à son récepteur de membrane externe déclenche une cascade de signalisation, qui permet la dissociation des facteurs  $\sigma$ -ECF de leur facteur anti- $\sigma$  et l'activation des gènes requis pour la biosynthèse des sidérophores et leur acquisition. En condition riche en fer, la transcription des ces facteurs  $\sigma$ -ECF est réprimée par Fur.



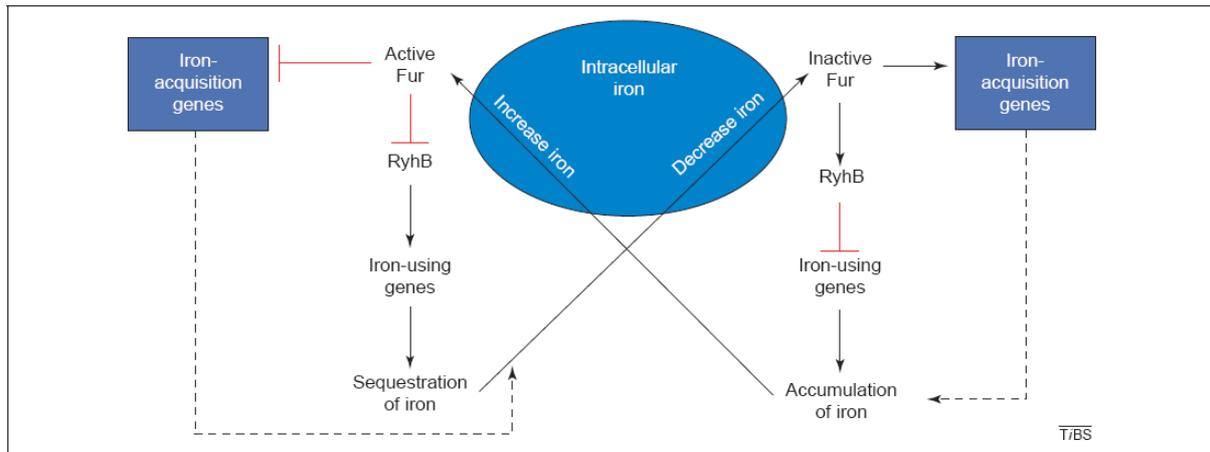
**Figure 4** : Schéma de la régulation par les facteurs  $\sigma$ -ECF des gènes d'acquisition du fer. Lorsque le récepteur de membrane externe n'est pas activé, le facteur  $\sigma$ -ECF est retenu par le facteur anti- $\sigma$ . La liaison et le transport du ferrisidérophore par le récepteur de membrane externe entraîne un changement de conformation d'un domaine de signalisation du récepteur. Celui-ci en contactant le facteur anti- $\sigma$ , permet la libération du facteur  $\sigma$ -ECF, qui se lie alors à l'ARN polymérase pour activer la transcription des gènes d'acquisition du fer.

### 3. Petits ARNs non codants

En plus des systèmes déjà décrits, de nouvelles voies de régulation génique ont plus récemment aussi été élucidées, permettant un contrôle du métabolisme du fer chez les bactéries (Masse et al., 2007). Ainsi, un petit ARN non codant régulateur, appelé *rhyB*, a été impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle de gènes de protéines utilisant le fer chez *E. coli* (Masse and Arguin, 2005; Masse et al., 2005). *rhyB* va s'apparier aux ARNm de gènes positivement régulés par Fur et empêcher leur traduction (Desnoyers et al., 2009; Masse et al., 2003a). Ce mécanisme permet d'assurer que, en condition de carence, les rares ressources en fer soient allouées aux fonctions cellulaires cruciales. *RhyB* permet aussi de moduler le fer libre intracellulaire dans *E.coli* (Jacques et al., 2006).

Aucune séquence homologue à *rhyB* n'a été retrouvée dans le génome de *P. aeruginosa*, bien qu'il y ait eu identification de gènes positivement régulés par l'homologue de Fur dans cet organisme. En effet, une approche bioinformatique a permis d'identifier deux tandems de petits ARN non codants, candidats pour être des homologues fonctionnels de *rhyB* (Wilderman et al., 2004). La transcription de ces 2

petits ARNs, nommés *PrrF1* et *PrrF2*, est elle-même contrôlée par Fur (Oglesby et al., 2008; Wilderman et al., 2004).



**Figure 5** : Schéma des inter-relations jouant dans la régulation de la concentration intracellulaire du fer et de son utilisation chez *E.coli* (tiré de (Masse and Arguin, 2005)). Lorsque la concentration intracellulaire en fer devient trop faible, la protéine Fur n'est plus active, ce qui entraîne la transcription du petit ARN RyhB et donc l'inhibition de l'expression des gènes utilisant le fer. L'inactivité de Fur permet aussi l'expression des gènes d'acquisition du fer. Ces 2 mécanismes contribuent à une augmentation de la concentration en fer intracellulaire. A un certain seuil, Fur redevient alors active, inhibant à la fois RyhB et les gènes d'acquisition du fer.

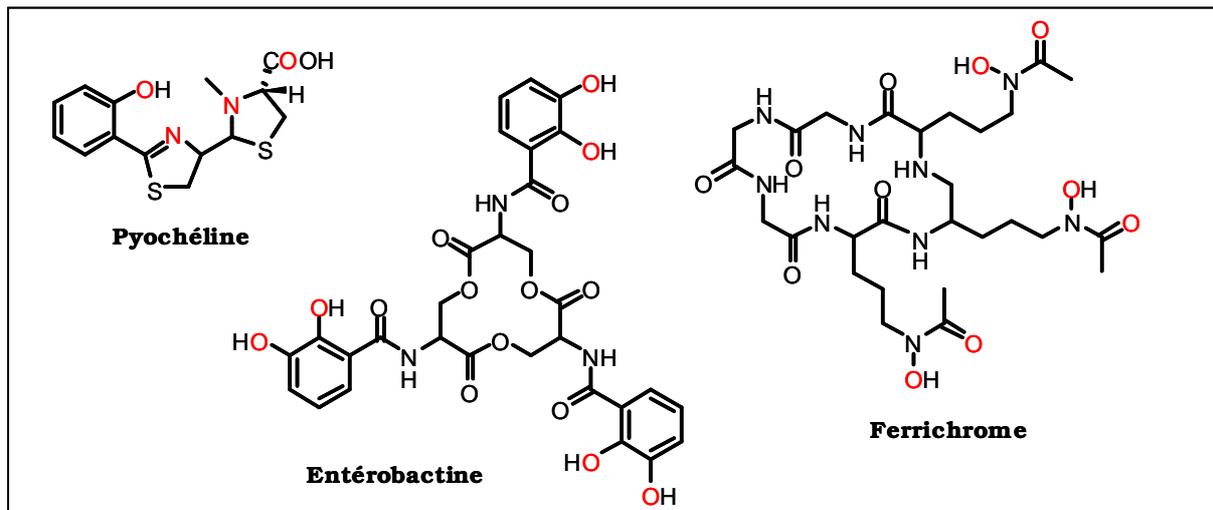


## II. Les sidérophores

Étymologiquement, le mot sidérophore, issu du grec, signifie « porteur de fer » (sidéros = fer, phore = porteur). L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des plus efficaces systèmes d'acquisition du fer. Cette efficacité explique probablement la diversité des systèmes d'acquisition du fer dépendants des sidérophores développés par les bactéries.

### A. Définition - Généralités

Les sidérophores sont des métabolites secondaires de bas poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 Da, dont le rôle est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer (III) de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Faraldo-Gomez and Sansom, 2003; Miethke and Marahiel, 2007; Neilands, 1995).



**Figure 6** : Exemples de structures de sidérophores produits et/ou utilisés par *P. aeruginosa*. Les atomes en rouge sont impliqués dans la chélation du fer.

La caractéristique majeure des sidérophores est leur très haute affinité pour les ions ferriques (avec une constante d'affinité pouvant aller jusqu'à  $10^{-49}$ M dans le cas de l'entérobactine) (Hay et al., 2001). L'affinité pour le gallium est aussi haute, tandis que l'attraction pour l'aluminium ou pour les ions divalents est substantiellement moindre. Cette chélation se fait par l'intermédiaire d'hétéroatomes, notamment oxygénés et

azotés, hautement électronégatifs, susceptibles d'entrer en interaction avec les ions métalliques (figure 7).

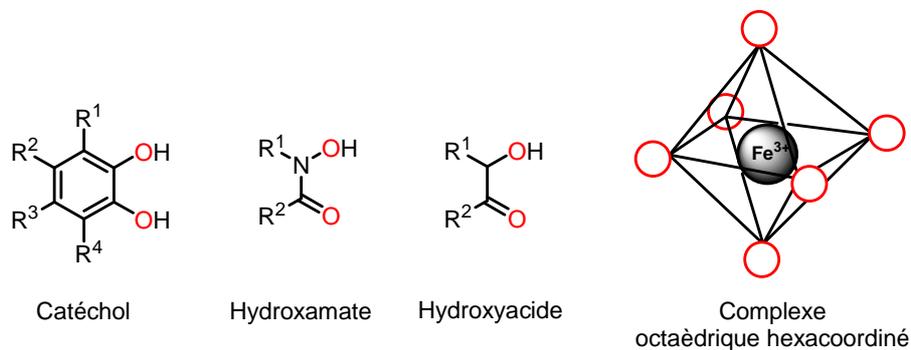


Figure 7 : Structure et organisation des groupes bidentates autour de l'ion Fe(III).

Les sidérophores sont synthétisés et sécrétés par des microorganismes aérobies, tels que les bactéries, certains champignons mais aussi quelques organismes supérieurs (certaines plantes monocotylédones) en réponse à des conditions de carence en fer (Ratledge and Dover, 2000).

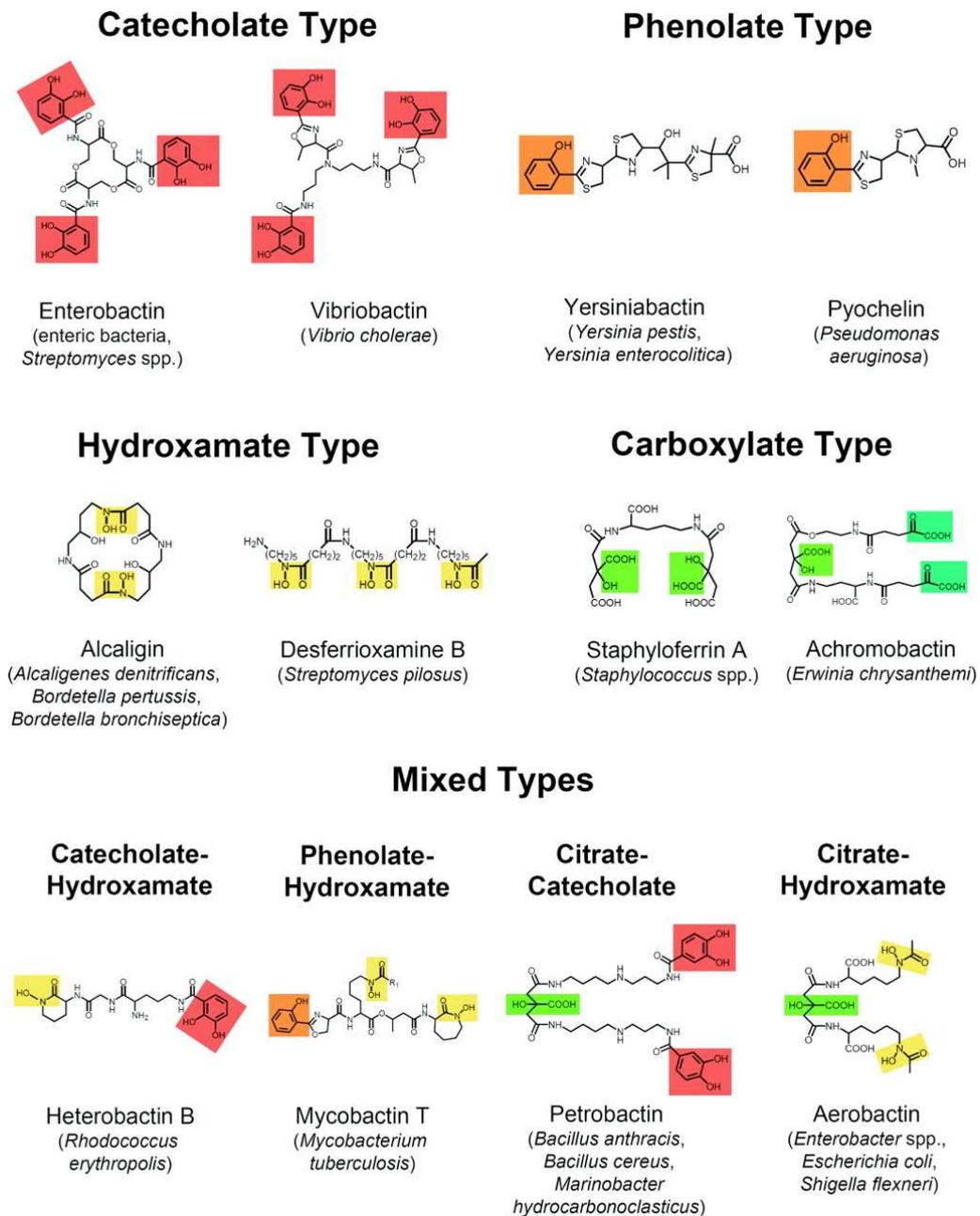
Les sidérophores sont très importants pour la survie et la croissance des bactéries dans le sol et les environnements aqueux (Guerinot, 1994). En culture, les sidérophores peuvent approcher de très hautes concentrations, supérieures à 200 mg.L<sup>-1</sup>. Dans la rhizosphère, les concentrations en sidérophores estimées sont de l'ordre de quelques micromolaires à quelques millimolaires (Hersman et al., 1995). Les sidérophores sont aussi essentiels pour la virulence de nombreux pathogènes dans les modèles animaux de maladies (Ratledge and Dover, 2000). Ils servent de molécules signal contrôlant l'expression de gènes pour la production du sidérophores lui-même, mais aussi pour la production d'autres facteurs de virulence (Lamont et al., 2002; Visca et al., 2002).

Après sécrétion par la bactérie, les sidérophores chélatent avec une forte affinité le fer dans l'environnement extracellulaire (de précipités ou des protéines hôtes) et le transportent dans le cytoplasme de la cellule via des voies d'assimilation spécifiques. Les mécanismes de transport, de biosynthèse et de sécrétion des sidérophores seront détaillés dans les paragraphes III, IV et V.

## **B. Classification des sidérophores - Structure**

A l'heure actuelle, plus de 500 composés de structures chimiques différentes ont été définis comme sidérophores. Ils sont toujours caractérisés par la présence de un,

deux ou trois groupes chélatants bidentés, généralement oxygénés, cruciaux pour la formation de complexes octaédriques hexacoordonnés très stables entre le sidérophore et le Fe(III), qui permettront de « capter » le fer. Si la structure générale des sidérophores peut être extrêmement diverse et complexe, la nature chimique des groupes chélatant le fer est assez restreinte (Winkelmann, 2002).



**Figure 8** : Exemples de sidérophores classés selon leur(s) groupement(s) fonctionnel(s) (tiré de (Miethke and Marahiel, 2007)). Les organismes produisant ces sidérophores sont également indiqués. Les parties impliquées dans la coordination du fer sont indiquées comme suit : les catécholates sont en rouge, les phénolates en orange, les hydroxamates en jaune pâle, les  $\alpha$ -hydroxy-carboxylates en vert clair et les  $\alpha$ -céto-carboxylates en bleu-vert.

Ainsi, les sidérophores peuvent être classifiés selon les groupes fonctionnels qu'ils utilisent comme ligands du fer (Carrano et al., 1996; Miethke and Marahiel, 2007; Winkelmann, 2002). Les groupes chélatants sont généralement (figure 8):

- des catécholates (exemple : l'entérobactine, la vibriobactine),
- des hydroxamates (exemple : la deferrioxamine B, le ferrichrome),
- des ( $\alpha$ -hydroxy) carboxylates (exemple : la staphyloferrine A, l'achromobactine),
- des phénolates (exemple : la pyochéline, la yersiniabactine),

Plus rarement, on trouve des hydroxyacides (exemple : la rhizobactine 1021), voire d'autres groupes bidentés.

Les sidérophores peuvent être composés de groupes chélatants identiques, mais sont plus fréquemment mixtes, c'est-à-dire composés de groupes chélatants différents (figure 8). La stœchiométrie sidérophore : fer est variable et est fonction du nombre de groupes chélatants portés par le sidérophore.

Du fait de la forte oxygénation des groupes chélatants, le fer (III), état du fer plus oxydé et plus oxophile que le fer (II), reste la forme du fer pour laquelle le sidérophore a généralement la plus grande affinité.

## **C. Les sidérophores chez *P. aeruginosa***

Comme de nombreuses bactéries, *P. aeruginosa* va synthétiser et sécréter ses propres sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline, et tout le système nécessaire à leur transport, mais va aussi pouvoir exprimer la machinerie nécessaire à l'utilisation de sidérophores produits par d'autres organismes. Ceci lui permet d'être particulièrement compétitive pour l'acquisition du fer.

### **1. Sidérophores endogènes produits par *P. aeruginosa***

#### **a) La pyoverdine**

La pyoverdine est un pigment de couleur jaune-vert, soluble dans l'eau, qui a été découvert en 1892 et nommé à l'époque « fluorescéine » à cause de ses propriétés de fluorescence. Son implication dans le transport du fer a été établie à la fin des années 1970 par J.M. Meyer et M. Abdallah (Meyer and Abdallah, 1978).

## **1) Structure générale des pyoverdines**

Les pyoverdines (parfois aussi appelées pseudobactines) forment un groupe de sidérophores structurellement reliés, caractéristiquement produits par toutes les espèces de *Pseudomonas* fluorescents et par *Azotobacter vinelandii* ((Cornelis and Matthijs, 2002; Meyer, 2000).

A ce jour, plus de 100 pyoverdines de structure différentes ont été identifiées. Toutes ces structures sont composées de 3 parties (Meyer, 2000) :

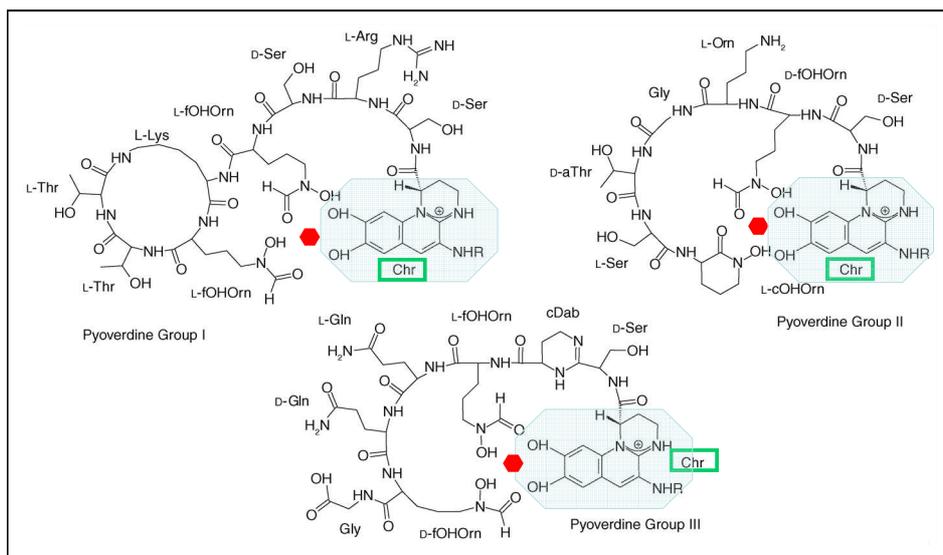
- un chromophore, dérivé de 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, fluorescent et conservé,
- une chaîne latérale acyle (généralement un acide dicarboxylique ou son monoamide) liée au groupe amine en position C3 du chromophore,
- une chaîne peptidique, de longueur et de composition variable, liée par un groupe amide lui-même attaché au C1 du groupe carboxyle du chromophore.

La partie peptidique est habituellement composée de 6 à 12 acides aminés et peut contenir un certain nombre d'acides aminés inhabituels (acides aminés des type D et L, Ornithines,...). Elle peut être linéaire ou partiellement ou entièrement cyclique. La nature exacte (composition et longueur) du peptide est souche ou espèce spécifique (Budzikiewicz, 1993; Meyer, 2000).

Plusieurs isoformes de pyoverdines sont généralement produites par une même souche : ces sidérophores ont alors tous le même peptide mais ils diffèrent dans la nature de leur groupement acyle (Meyer, 2000).

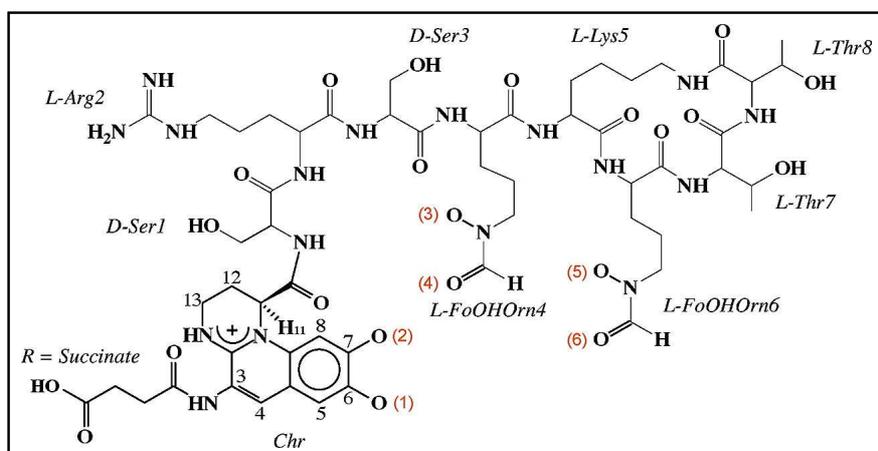
## **2) Structure de la pyoverdine produite par *P. aeruginosa***

Les souches de *P. aeruginosa* peuvent synthétiser 3 types de pyoverdines structurellement différentes, les pyoverdines de type I, II ou III, distinctes dans la composition de leur chaîne peptidique (Meyer et al., 1997) (figure 9). Chaque souche de *P. aeruginosa* va produire une de ces trois pyoverdines.



**Figure 9** : Représentation des trois types de pyoverdines produites par les différentes souches de *P. aeruginosa*. Ces trois types de pyoverdines varient au niveau de leur peptide. Le chromophore, toujours identique, est surligné en bleu-vert. Le groupement « R » représente la chaîne acyle latérale variable des différents isoformes : il s'agit d'un acide dicarboxylique ou d'un amide (habituellement, on retrouve un acide  $\alpha$ -cétoglutarique, un succinate ou un glutamate). Chacun des 6 atomes d'oxygène situés autour de l'hexagone rouge interviennent dans la chélation du fer (d'après (Visca et al., 2007)).

La souche PAO1 utilisée dans notre laboratoire produit la pyoverdine de type I (figure 10). Dans cette pyoverdine, le chromophore dihydroxyquinoline est lié en position C1 à un peptide partiellement cyclique de 8 résidus ( D-Ser-L-Arg-D-Ser-L-N<sub>5</sub>-OH-Orn-L-Lys-L-N<sub>5</sub>-OH-Orn-L-Thr-L-Thr) via la sérine N-terminale. Il existe deux isoformes de pyoverdine de type I. Dans la forme principale, un groupement succinate est attaché au chromophore en position C3.



**Figure 10** : Structure chimique de la pyoverdine de type I, objet de cette thèse, produite par la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (tiré de (Wasielewski et al., 2008)). Les sites de coordination du métal sont

numérotés en rouge de 1 à 6 en rouge. Deux formes de pyoverdines de type I, différant par la nature du groupe R attaché au C3 du chromophore, sont sécrétées. L'isoforme majoritairement produit possède un groupe succinate. La masse molaire de cette pyoverdine est de 1334 g.M<sup>-1</sup>.

L'affinité pour le fer de ce sidérophore est très haute, de l'ordre de 10<sup>32</sup>M<sup>-1</sup> (Albrecht-Gary et al., 1994). La complexation du Fe(III) est assurée par le groupement catéchol et les fonctions hydroxamates des deux hydroxyornithines (Albrecht-Gary et al., 1994). La stœchiométrie Pvd:Fe est donc de 1:1 dans le cas d'une complexation complète et efficace du Fe(III).

### **b) La pyochéline**

La pyochéline, sidérophore secondaire produit par *P. aeruginosa*, a une affinité pour le fer nettement plus faible que la pyoverdine, de l'ordre de 10<sup>-18</sup> M (résultats non publiés). Ce sidérophore est produit par toutes les souches de *Pseudomonas* et par de nombreuses souches de *Burkholderia cepacia*.

Structurellement, c'est une molécule assez simple (voir figure 6). La stœchiométrie de chélation est de deux molécules de pyochélines pour une molécule de fer (Tseng et al., 2006).

La présence d'un motif 2-hydroxyphényl-thiazoline procure également à cette molécule des propriétés de fluorescence, mais de bien moindre intensité que celles de la pyoverdine (Hoegy et al., 2005).

## **2. Xénosidérophores utilisés par *P. aeruginosa***

En plus des sidérophores endogènes, *P. aeruginosa* peut également utiliser un certain nombre de sidérophores hétérologues d'origine bactérienne ou fongique, tels que la pyoverdine issue d'autres *Pseudomonas*, l'entérobactine (produite par *E. coli*, voir structure figure 6) (Poole et al., 1990), la cépabactine (produite par *Burkholderia cepacia*) (Mislin et al., 2006), le ferrichrome (produits par les champignons des genres *Aspergillus*, *Ustilago* et *Penicillium*, voir structure figure 6) (Llamas et al., 2006), la deferrioxamine (produite par *Streptomyces pilosus*) (Llamas et al., 2006), ou le citrate (Cox, 1980; Harding and Royt, 1990).

Ceci implique que cette bactérie possède pour chacun de ces sidérophores la voie d'assimilation du fer correspondante. En effet, *P. aeruginosa* peut produire les récepteurs de membrane externe spécifiques à ces xénosidérophores et les protéines

nécessaires à leur acquisition, récupérant ainsi le fer de sidérophores synthétisés par d'autres organismes, ce qui lui procure un avantage adaptatif certain. De plus, ces différents transporteurs seront exprimés par la bactérie en fonction de la présence dudit sidérophore dans le milieu et de son efficacité de chélation (Poole and McKay, 2003).

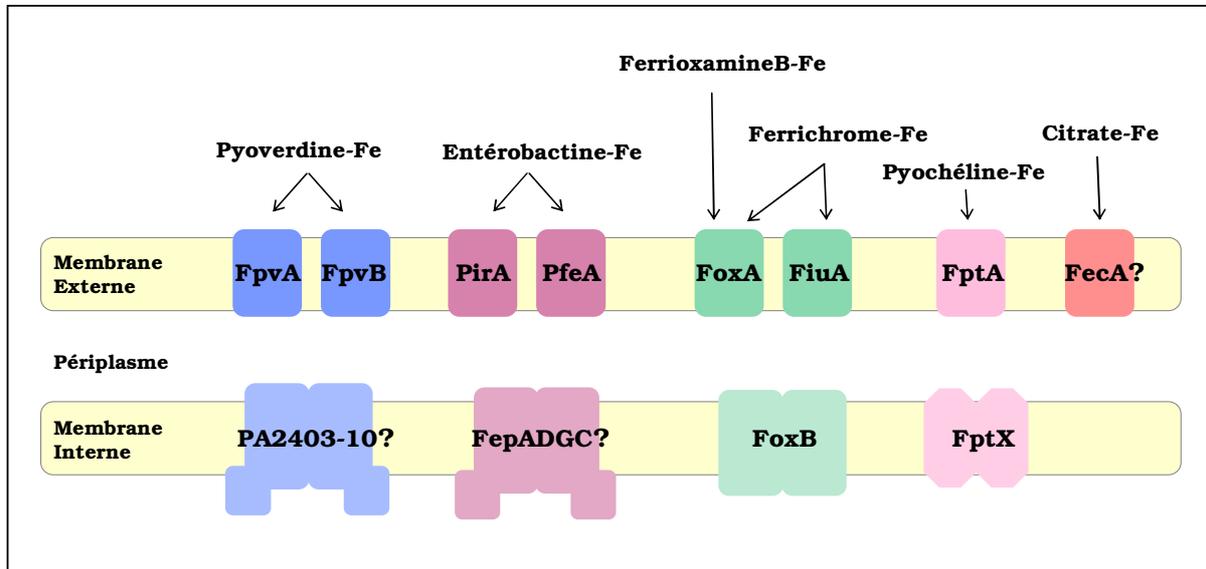


Figure 11 : Les différentes voies de transport du fer par les sidérophores chez *P. aeruginosa*. Dans ce schéma sont modélisés les protéines d'acquisition décrites et les systèmes putatifs (mentionnés par un « ? »), proposés en se basant sur l'analyse du génome et sur des données non publiées du laboratoire.

### III. L'acquisition du fer via la pyoverdine et sa régulation chez *P. aeruginosa*

Tous les mécanismes liés à la biosynthèse, à la sécrétion et au transport des sidérophores, ainsi qu'à leur régulation sont à replacer dans le contexte cellulaire spécifique aux bactéries : la présence d'une enveloppe, véritable barrière physique de perméabilité et de protection, à l'interface entre le milieu environnant et la cellule. L'enveloppe des bactéries à Gram-négatif est constituée de deux membranes phospholipidiques, séparées par un espace, le périplasma. Le périplasma peut constituer jusqu'à 40% du volume cellulaire et se compose d'un maillage de peptidoglycane, qui permet à la cellule de conserver sa forme en résistant à la pression osmotique. Son épaisseur est estimée entre 13 et 25 nm (Graham et al., 1991).

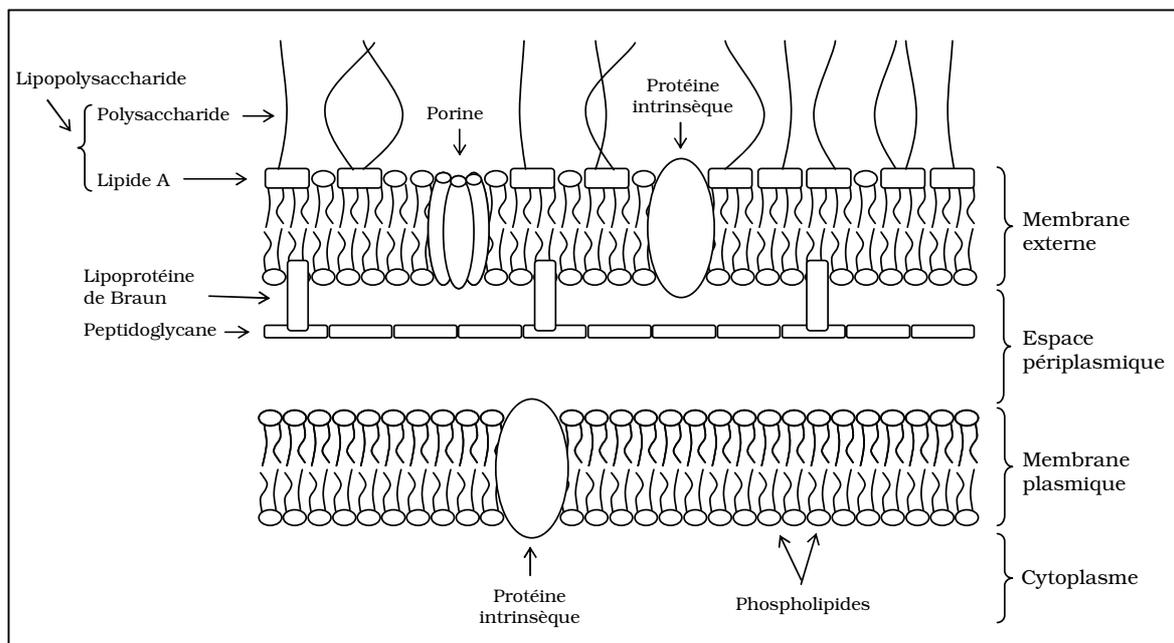


Figure 12 : Représentation schématique d'une paroi de bactérie à Gram négatif.

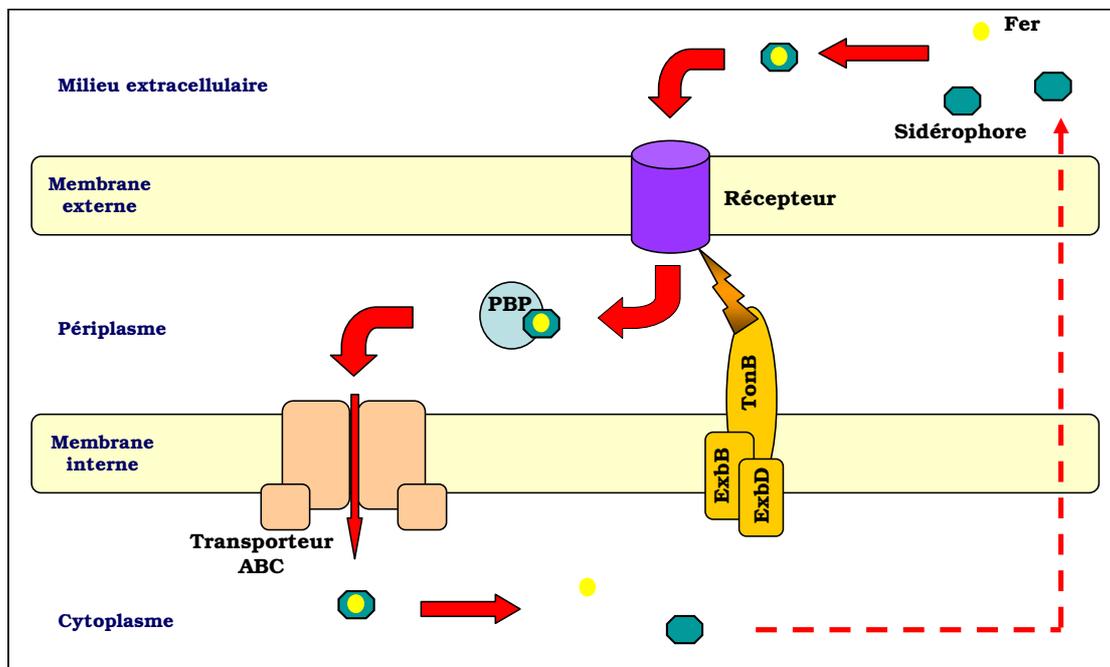
Pour tous ses échanges avec le milieu extracellulaire, les bactéries à Gram négatif ont donc développé des systèmes spécifiques permettant aux molécules échangées de traverser ces barrières physiques possédant chacune des propriétés chimiques et mécaniques très différentes.

## A. Le transport du fer par la pyoverdine

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport des ferrisidérophores ont été intensivement étudiés ces dernières années, en particulier chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (Braun, 2003; Klebba, 2003; Poole and McKay, 2003; Schalk, 2008).

Chez les bactéries à Gram-négatif, tous les mécanismes d'acquisition du fer via les sidérophores impliquent pour le passage de la membrane externe un transporteur, hautement spécifique à chaque sidérophore, de la famille des récepteurs TonB-dépendants (figure 13).

L'énergie requise pour cette translocation est procurée par la force proton motrice de la membrane interne et est transmise par le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD localisé dans la membrane interne (Postle and Larsen, 2007).



**Figure 13** : Schéma général du transport du fer dans une bactérie à Gram-négatif par un sidérophore tridentate. L'ion Fe<sup>3+</sup> (sphère jaune) chélaté par le sidérophore est reconnu puis transporté à travers la membrane externe par un récepteur spécifique. Ce transport requiert un transducteur d'énergie : le complexe TonB-ExbB-ExbD qui permet de coupler ce transport à la force proton motrice. Une protéine de liaison périplasmique (PBP) permet ensuite le transport à travers le périplasme jusqu'à un transporteur ABC, responsable de l'entrée du ferrisidérophore dans le cytoplasme où le complexe est dissocié.

Chez *E. coli*, le passage à travers la membrane interne implique pour tous les sidérophores utilisés, un transporteur de type ABC (de l'anglais, ATP Binding Cassette), qui utilise l'hydrolyse de l'ATP comme énergie (figure 13) (Koster, 2001).

Chez *P. aeruginosa*, cette étape pourrait aussi être assurée par un transporteur ABC pour la ferri-entérobactine. Pour les voies ferripyochéline, ferrichrome et ferrioxamine, le transport est réalisé au moyen de perméases (Cuiv et al., 2004; Cuiv et al., 2007; Hannauer et al.). Pour la voie pyoverdine, le fer est probablement dissocié du sidérophore dans le périplasma et seul le métal serait transporté dans le cytoplasme, probablement par un transporteur ABC ((Greenwald et al., 2007) et résultats non publiés).

## **1. Transport de la ferripyoverdine à travers la membrane externe**

La membrane externe des bactéries à Gram-négatif constitue une barrière de perméabilité pour une grande variété de molécules. Les complexes sidérophore-fer possèdent une taille supérieure à la limite d'exclusion par diffusion passive par les porines, généralement inférieure à 500 Da. Ils requièrent donc, pour franchir la membrane externe, un système de transport actif, capable d'assurer la translocation vers l'espace périplasmique.

Chez *P. aeruginosa*, le transport spécifique de la ferripyoverdine de type I à travers la membrane externe est assuré par le récepteur de membrane externe FpvAI (Poole et al., 1993b). Les récepteurs impliqués dans le transport des pyoverdines de type II et III chez *P. aeruginosa* ont également été identifiés (de Chial et al., 2003). Il existe aussi un récepteur alternatif à FpvAI, le récepteur FpvB (Ghysels et al., 2004). Cependant, sa mutation n'entraîne pas de baisse de transport de pyoverdine-Fe significative, suggérant que l'implication de ce récepteur dans l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* est minime dans les conditions de culture du laboratoire (résultats du laboratoire non publiés).

### **a) Le récepteur de membrane externe**

La structure aux rayons X de FpvAI sous différentes conformations (Brillet et al., 2007; Cobessi et al., 2005a; Wirth et al., 2007), ainsi que les structures d'autres récepteurs TonB-dépendant ont été déterminées au cours des 10 dernières années :

- FhuA (Ferguson et al., 1998; Locher et al., 1998), FecA (Ferguson et al., 2002; Yue et al., 2003), FepA (Buchanan et al., 1999) et BtuB (Chimento et al., 2003), récepteurs du ferrichrome, du ferricitrate, de la ferri-entérobactine et de la vitamine B12 respectivement, chez *E. coli*,

- FptA, récepteur de la ferripyochéline chez *P. aeruginosa* (Cobessi et al., 2005b),

- FauA, récepteur de l'alcaligine chez *Bordetella pertussis* (Brillet et al., 2009),
- HasR, récepteur de l'hème chez *Serratia marcescens* (Krieg et al., 2009),
- ShuA, récepteur de l'hème chez *Shigella dysenteriae* (Cobessi et al.).

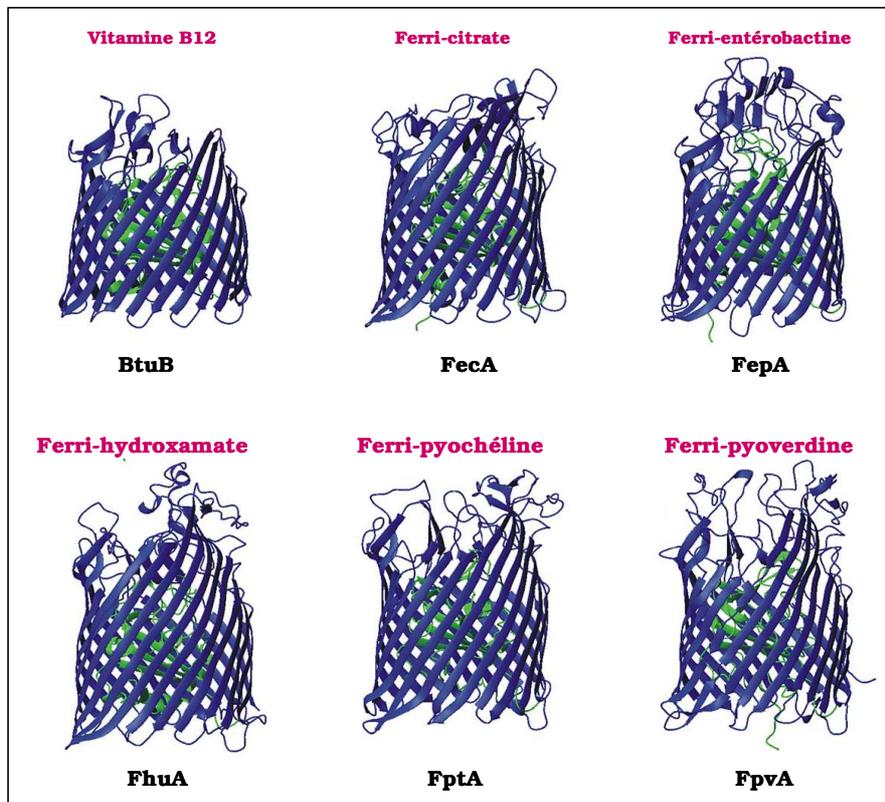


Figure 14 : Récepteurs de membrane externe d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*. La résolution des structures de ces différents récepteurs montre une structure secondaire similaire pour tous les récepteurs TonB dépendants (d'après (Krewulak and Vogel, 2007)).

Malgré une identité de séquence primaire de l'ordre de 20% entre ces différents récepteurs TonB dépendants, leurs structures secondaires sont fortement similaires (figure 13) (pour revue (Krewulak and Vogel, 2007)). En effet, pour chacun d'eux, on retrouve les 3 composants structuraux suivants (figure 14) :

- un **tonneau  $\beta$**  de 22 brins antiparallèles, inséré dans la membrane externe, avec 11 boucles extracellulaires (L1 à L11) de taille variable et 10 boucles périplasmiques courtes d'une longueur de 2 à 10 résidus. La séquence et la taille des boucles extracellulaires est spécifique à chaque récepteur de sidérophore. De plus, ces boucles sont très flexibles et jouent probablement un rôle dans la reconnaissance du sidérophore,

- un domaine N-terminal globulaire, appelé **bouchon**, localisé à l'intérieur du pore formé par le tonneau  $\beta$ , empêchant ainsi la libre diffusion de molécules (figure 15).

Ce domaine est exposé d'un côté au périplasma et de l'autre au milieu extracellulaire. Dans toutes les structures de récepteurs de sidérophore élucidées, le bouchon est composé d'un feuillet de 4 brins  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$ ,

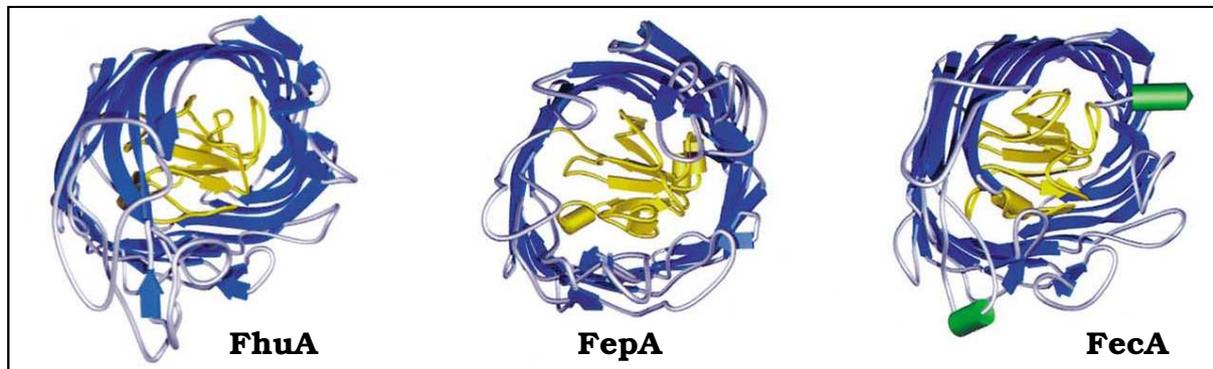


Figure 15 : Structure vue de dessus des récepteurs FhuA, FepA et FecA. Le tonneau  $\beta$  est représenté en bleu, le bouchon en jaune (tiré de (Braun and Braun, 2002)).

- la **boîte TonB**, une région de 7 acides aminés très conservée, située en N-terminal du bouchon, dans une queue flexible et extensible. Cette boîte est impliquée dans l'interaction entre les récepteurs de sidérophores et la partie périplasmique de la protéine TonB (Adams et al., 2006; Braun, 2006). L'interaction avec TonB est essentielle à la transmission de l'énergie nécessaire au mécanisme de translocation (Ogierman and Braun, 2003; Postle and Kadner, 2003).

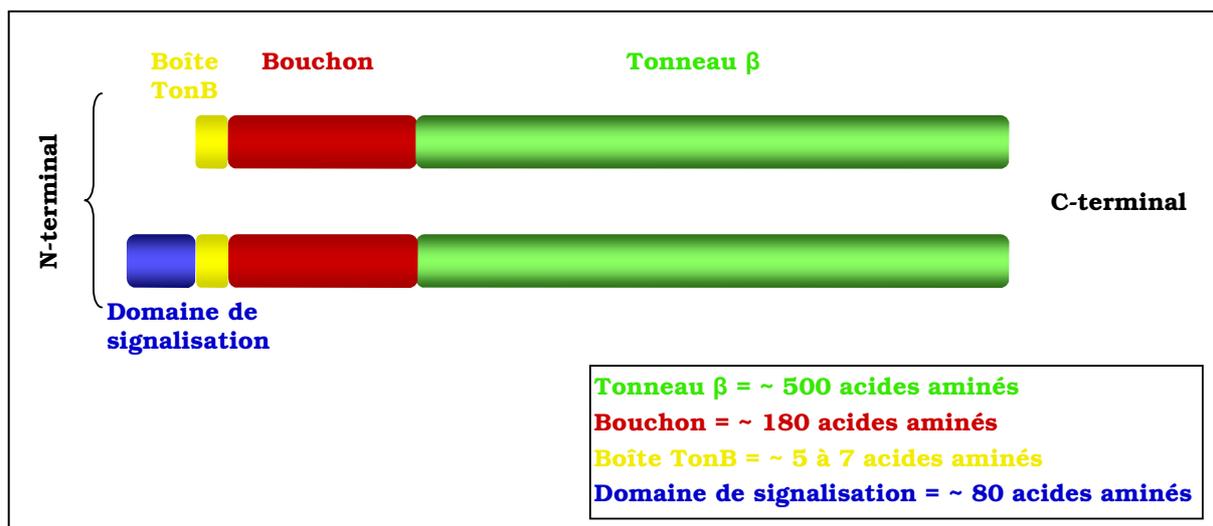


Figure 16 : Schéma des domaines structuraux composant les 2 types de récepteurs de membrane externe aux sidérophores.

En outre, certains récepteurs comme FpvA de *P. aeruginosa* et FecA de *E.coli* sont caractérisés par la présence d'un domaine additionnel de 80 résidus situé à

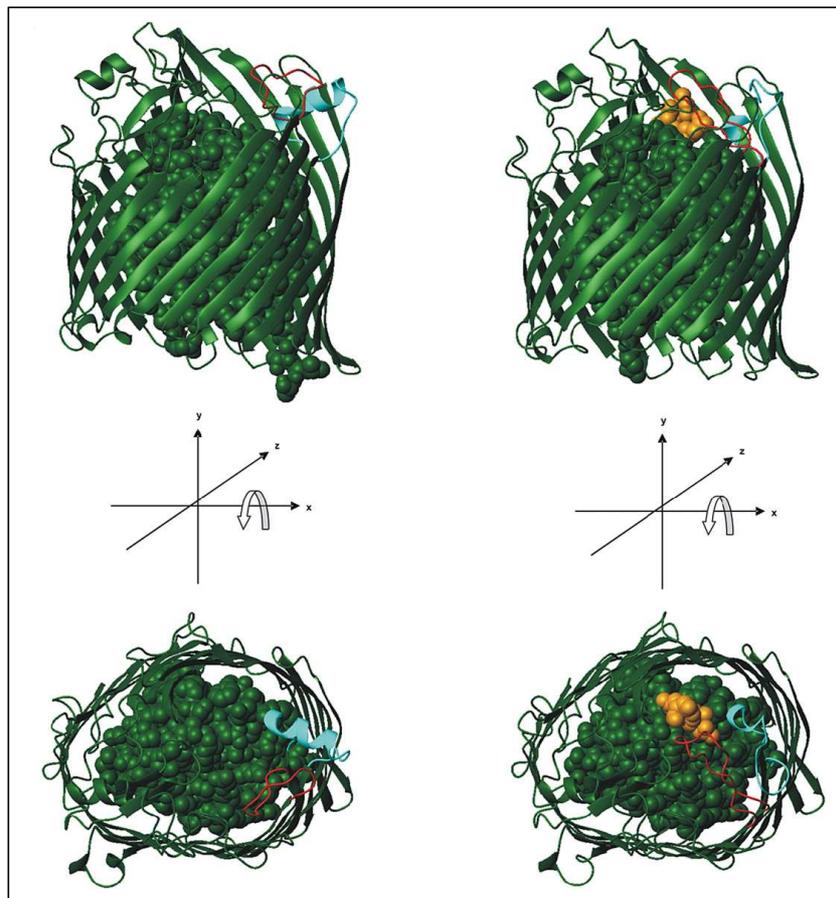
l'extrémité N-terminale du récepteur et localisé dans le périplasme (figure 16) (Garcia-Herrero and Vogel, 2005). Ce domaine, appelé **domaine de signalisation**, est indispensable à l'activation de la cascade de signalisation contrôlant la transcription des gènes de transport et de biosynthèse du sidérophore reconnu (James et al., 2005; Koebnik, 2005; Shen et al., 2002). FpvA est le seul récepteur de sidérophore dont la structure a été résolue avec le domaine de signalisation (figure 18) (Brillet et al., 2007; Wirth et al., 2007). Pour FecA, ce domaine a été cloné séparément du récepteur et la structure résolue par RMN (Garcia-Herrero and Vogel, 2005). Pour ces deux récepteurs, le domaine de signalisation est composé de 2 hélices  $\alpha$  en sandwich entre deux feuillets  $\beta$ , formant une structure globulaire (figure 18). Dans la structure de FpvA, le domaine de signalisation est relié au bouchon par une grande boucle périplasmique comprenant la boîte TonB (Brillet et al., 2007).

Le site de liaison du sidérophore est localisé sur la face extracellulaire du récepteur et est constitué de résidus appartenant à la fois au tonneau, aux boucles extracellulaires et au bouchon (Krewulak and Vogel, 2007). La nature des résidus de la poche de liaison est spécifique à chaque récepteur et dépend des propriétés biochimiques du sidérophore lié, permettant une haute sélectivité pour seulement un sidérophore donné. Par exemple, le site de liaison de FecA est composé de résidus chargés positivement permettant l'interaction avec le ferricitrate chargé négativement (Yue et al., 2003), tandis que le site de liaison de la pyoverdine sur FpvAI est lui composé d'acides aminés hydrophobes (Cobessi et al., 2005a; Greenwald et al., 2009; Wirth et al., 2007).

Les complexes ferrisidérophore interagissent avec leur récepteur avec une affinité en général de l'ordre du nanomolaire (Hoegy et al., 2005; Schalk et al., 2001; Schalk et al., 1999). FpvAI peut lier sur le même site de liaison les formes apo ou ferrique de la pyoverdine avec des affinité proches (Clement et al., 2004; Schalk et al., 2001). En milieu carencé en fer, le récepteur FpvAI est chargé en apo-pyoverdine (Clement et al., 2004). Ce complexe FpvAI-pyoverdine est extrêmement stable et sa dissociation est activée *in vivo* par la force proton motrice de la membrane interne via le complexe TonB-ExbB-ExbD (Clement et al., 2004).

La liaison du ferrisidérophore à son récepteur induit des changements de conformation au niveau des boucles extracellulaires, mais aussi au niveau de la région N-terminale du récepteur. La comparaison de la structure de FecA d'*E. coli* avec ou sans ferricitrate indique un changement de conformation important des boucles extracellulaires L7 et L8 (figure 17) (Ferguson et al., 2002; Yue et al., 2003). En absence de sidérophore, le site de liaison du transporteur est accessible du milieu extracellulaire.

Après liaison du ferricitrate, les boucles L7 et L8 se referment sur le ligand, le piégeant ainsi dans son site de liaison. L'élimination par mutagenèse de ces boucles abolit la liaison et le transport du ferricitrate par FecA, confirmant leur implication dans le transport du ferricitrate (Ferguson et al., 2007). Aucun changement de conformation de ce type n'a été vu dans la structure de FhuA d'*E. coli* chargé en ferrichrome, mais des simulations de la dynamique des boucles extracellulaires de ce transporteur suggèrent que la boucle L8 se referme également après liaison du ferrichrome à FhuA (Ferguson et al., 1998). La délétion des boucles extracellulaires L3 et L11 abolit la liaison et le transport du ferrichrome (Ferguson et al., 1998).



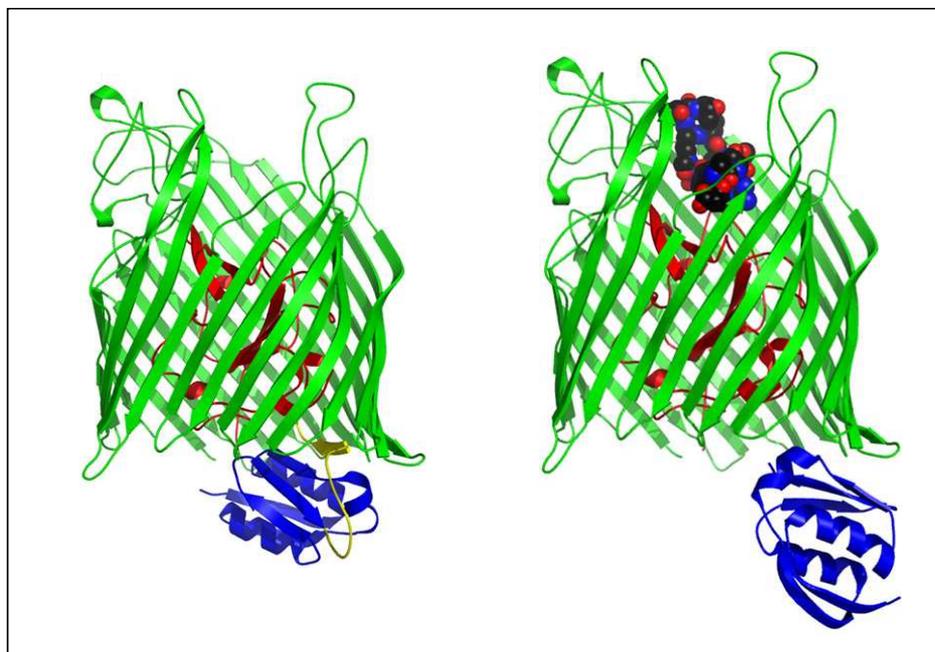
**Figure 17** : Représentations en ruban des structures de FecA sans ligand et de FecA lié au ferricitrate. Le tonneau  $\beta$  est représenté en rubans et le domaine bouchon en représentation dans l'espace. La liaison du ferricitrate (en orange) induit un changement conformationnel dans les boucles extracellulaires L7 (en bleu) et L8 (en rouge) (tiré de (Krewulak and Vogel, 2007)).

Dans le cas de FpvA chargé en ferripyoverdine, un changement de conformation de la boucle L7 a également été observé (Greenwald et al., 2009). Des études de mutagenèse sur des résidus des boucles extracellulaire de FpvA indiquent également une implication de certaines boucles dans la liaison de la ferripyoverdine (James et al.,

2005; Nader et al., 2007). La mutation de résidus appartenant aux boucles L1, L3 et L4 entraîne une perte de la liaison de l'apo-sidérophore sur FpvA, tandis que certaines mutations au niveau des boucles L4, L5, L7, L9 et L11 affectent le transport du complexe pyoverdine-Fe.

Ces changements de conformation au niveau du site de liaison, induits par la liaison de la ferripyoverdine, seraient stabilisés par un réseau de liaison hydrogènes et se propageraient d'une façon ou d'une autre vers le côté périplasmique du récepteur (Greenwald et al., 2009).

En effet, la liaison du ferrisidérophore entraîne également des changements de conformation au niveau de la boîte TonB localisée en N-terminal du récepteur, indiquant le statut chargé du récepteur au complexe TonB (Wiener, 2005). En absence de cette boîte TonB ou de la protéine TonB, le récepteur est incapable de transporter le ferrisidérophore (Postle and Kadner, 2003). La liaison du ferrisidérophore aux récepteurs FhuA et FecA entraîne un déroulement de l'hélice  $\alpha$  localisée à l'entrée du bouchon, après la boîte TonB, alors que seuls très faibles changements de conformation sont détectés au niveau du bouchon (Ferguson et al., 2002; Ferguson et al., 1998; Yue et al., 2003). Dans la structure de FpvAI lié à la ferripyoverdine, la boîte TonB déstructurée n'est ainsi plus visible (figure 18) (Brillet et al., 2007; Wirth et al., 2007).



**Figure 18** : Vues en ruban de la structure tridimensionnelle du récepteur FpvA de la pyoverdine non chargé et chargé en ferripyoverdine. Le tonneau  $\beta$  est coloré en vert, le bouchon en rouge, la partie périplasmique en bleu, la boucle reliant le domaine de signalisation et le bouchon en jaune et la ferripyoverdine est colorée suivant la nomenclature standard (d'après (Brillet et al., 2007)).

La position dans le périplasme du domaine de signalisation dépend également du statut de chargement du récepteur (Schalk et al., 2009; Wirth et al., 2007). Lorsque FpvAI est chargé en ferripyoverdine, ce domaine de signalisation subit une rotation, le faisant basculer dans le périplasme (figure 18). Le repliement du domaine reste cependant identique (Brillet et al., 2007). Ce basculement va permettre au récepteur de déclencher la cascade de signalisation induisant la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par le sidérophore (Braun et al., 2006; Lamont et al., 2002).

Les structures des récepteurs de sidérophore sont caractérisées par une absence de canal pour le passage de ferrisidérophore (voir vue de dessus figure 17). En effet, les interactions bouchon-tonneau impliquent plus de 80 liaisons hydrogènes et il n'y a pas d'espace suffisamment large pour permettre le passage d'un complexe ferrisidérophore (Krewulak and Vogel, 2007). Un changement majeur de conformation du transporteur, induit par l'interaction entre la machinerie TonB et le récepteur, doit donc intervenir pour ouvrir un canal.

Différents mécanismes ont été proposés, avec entre autres formation d'un canal après déplacement du bouchon de l'intérieur du tonneau vers le périplasme ou encore formation d'un canal par changement de conformation du bouchon au sein du tonneau (Eisenhauer et al., 2005; Ma et al., 2007).

En se basant sur les structures des complexes FhuA-TonB et BtuB-TonB, il a été proposé que l'interaction avec TonB permet au bouchon, par un changement de conformation, de se dissocier du tonneau, permettant ainsi la formation d'un canal (Pawelek et al., 2006; Shultis et al., 2006). Plus précisément, TonB, en exerçant une force mécanique très modeste sur le récepteur, pourrait induire des changements conformationnels importants ou un dépliement du domaine bouchon (Gumbart et al., 2007). De nombreuses molécules d'eau ont été observées à l'interface du bouchon et du tonneau. La présence de ces molécules d'eau, en agissant comme un lubrifiant, pourrait réduire l'énergie nécessaire à la dislocation du bouchon du tonneau (Sansom, 1999). Enfin, un résidu normalement situé à l'intérieur du domaine N-terminal de FepA a été retrouvé par marquage dans le périplasme, indiquant que le processus de transport pourrait effectivement impliquer l'expulsion, au moins partielle, du domaine globulaire du tonneau (Ma et al., 2007). Cependant, malgré toutes les données disponibles sur ces récepteurs, le mécanisme exact de l'internalisation du ferrisidérophore au travers du tonneau  $\beta$  reste encore mal compris.

## ***b) Le complexe TonB-ExbB-ExbD***

Les 3 protéines TonB, ExbB et ExbD sont associées en un complexe protéique inséré dans la membrane cytoplasmique (Eick-Helmerich and Braun, 1989). Ce complexe permet de transférer directement l'énergie de la force proton motrice de la membrane interne au récepteur de membrane externe TonB-dépendant. Ce transfert d'énergie est nécessaire à la translocation du ferrisidérophore à travers le récepteur.

La protéine **TonB** (26kDa) est ancrée à la membrane interne par sa séquence signal amino-terminale d'adressage à la membrane, tandis que le reste de la molécule se localise dans le périplasme (Hannavy et al., 1990; Postle and Skare, 1988). TonB peut être divisée en 3 domaines distincts :

- le domaine N-terminal, qui consiste en une hélice transmembranaire de 22 à 32 résidus et en une courte région cytoplasmique. Ce domaine contient la séquence signal hydrophobe et permet l'ancrage de TonB dans la membrane cytoplasmique, mais possède aussi d'autres rôles, notamment d'interaction avec ExbB (Jaskula et al., 1994; Karlsson et al., 1993). Le domaine transmembranaire de TonB est essentiel à l'activité de TonB (Jaskula et al., 1994),

- un domaine central (résidus 33-102), localisé dans le périplasme. Les résidus 66-102 comprennent une région caractéristique, riche en proline qui contient des séries de répétitions Pro-Glu et Pro-Lys. Cette région pourrait permettre l'extension de la protéine à travers l'espace périplasmique. Des études RMN de cette région isolée suggèrent une conformation hautement structurée qui peut s'étendre sur 10 nm de long (Evans et al., 1986).

- un domaine C-terminal, globulaire, qui constitue la zone d'interaction avec les récepteurs TonB dépendants (Postle and Kadner, 2003). Ce domaine se structure en 2 hélices  $\alpha$  suivies en C-terminal de TonB d'un feuillet de 4 brins  $\beta$  antiparallèles (Chang et al., 2001).

Les structures du domaine C-terminal de TonB en complexe avec FhuA et BtuB ont été résolues (Pawelek et al., 2006; Shultis et al., 2006). Dans ces complexes, les interactions mises en jeu impliquent un feuillet  $\beta$  de la région C-terminale de TonB qui recrute un brin  $\beta$  parallèle formé par la boîte TonB du récepteur de membrane externe (figure 19). Dans la structure TonB-BtuB, un résidu chargé de TonB, une arginine, permet de faire un pont salin additionnel avec un résidu aspartate de la boîte TonB (Shultis et al., 2006). Dans la structure TonB-FhuA, cette arginine hautement conservée de TonB crée des contacts multiples avec le bouchon du récepteur (Pawelek et al., 2006).

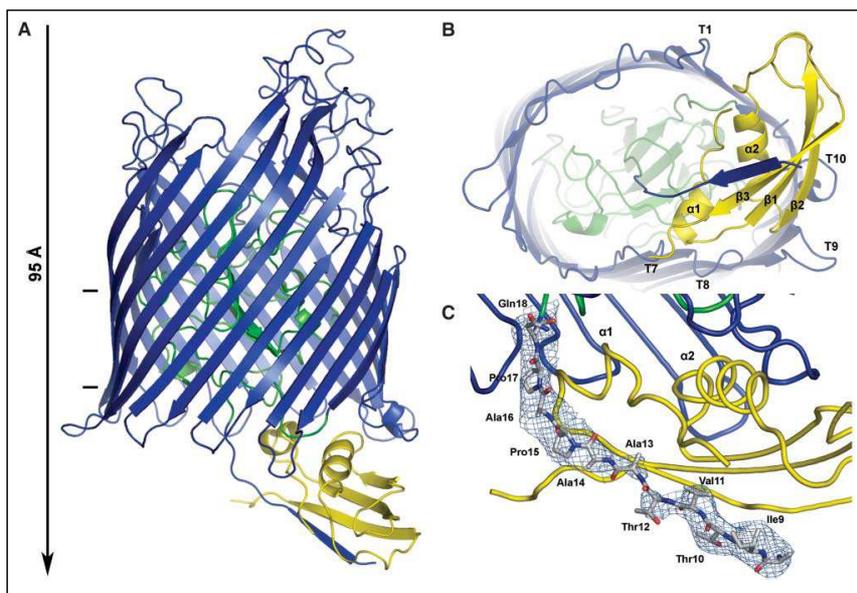


Figure 19 : Structure du complexe TonB-FhuA (tiré de (Pawelek et al., 2006)). (A) Représentation en ruban des résidus 158 à 235 de TonB complexés avec le récepteur FhuA d'*E. coli*. Les barres verticales délimitent approximativement la membrane externe dans laquelle est inséré le récepteur. La flèche indique la direction vers le périplasma. Le domaine bouchon de FhuA (résidus de 19 à 160) est coloré en vert, les résidus restants (8 à 18 et 161 à 725) sont colorés en bleu. Les résidus de TonB sont colorés en jaune. (B) Vue de la face périplasmique du récepteur FhuA en complexe avec TonB. Les éléments de structure secondaire de TonB sont notés  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ . Les boucles périplasmiques de FhuA sont également signalées (T1, T7 à T10). (C) Représentation en carte de densité électronique des résidus Ile9 à Gln18 de FhuA. Ces résidus sont sous forme bâtonnets et colorés par atomes (carbone en blanc, azote en bleu, oxygène en rouge).

**ExbB** est une protéine membranaire de 26 kDa, insérée dans la membrane cytoplasmique par 3 segments transmembranaires (Karlsson et al., 1993). La boucle cytoplasmique située entre les segments I et II est d'une taille importante (près de 90 résidus). La structure précise de la protéine ExbB reste encore à déterminer.

Comme TonB, la protéine **ExbD** (17kDa) est seulement ancrée à la membrane interne par un segment transmembranaire dans sa région N-terminale. La majeure partie de la protéine est localisée dans le périplasma et constitue un domaine d'environ 90 acides aminés (Kampfenkel and Braun, 1992). La structure du domaine périplasmique de ExbD de *E. coli* consiste en une queue N-terminale (résidus 43-63), une région structurée avec 2 hélices  $\alpha$  sur une face d'un feuillet à 5 brins  $\beta$  (résidus 64 à 133), et terminé par un segment C-terminal non structuré (résidus 134 à 141) (Garcia-Herrero et al., 2007; Garcia-Herrero and Vogel, 2005). La protéine ExbD est un composant essentiel du système TonB, requis pour l'activité de TonB (Brinkman and Larsen, 2008). Le rôle précis de ExbD n'est pas connu, mais il a été proposé avoir une

fonction similaire aux chaperonnes dans la régulation de la dynamique de conformation de TonB (Ghosh and Postle, 2005; Larsen et al., 2007).

Chez *E.coli*, lorsque la région *exb* est mutée, les processus d'acquisition dépendants des récepteurs de membrane externe sont diminués (Eick-Helmerich and Braun, 1989).

Dans le cas de *P. aeruginosa*, 3 protéines TonB ont été identifiées, nommées TonBI, TonBII et TonBIII (Poole et al., 1996; Zhao et al., 1998; Zhao and Poole, 2000). Cependant, seule la mutation de TonBI affecte les capacités d'acquisition du fer dans cet organisme (Takase et al., 2000b). Cette protéine TonBI possède une extension périplasmique par rapport à la protéine TonB d'*E.coli*. Les protéines ExbB et ExbD impliquées dans le transport du fer chez *P. aeruginosa* n'ont quant à elles pas encore été identifiées.

L'organisation du complexe dans la membrane cytoplasmique, ses interactions et sa stoechiométrie ont été étudiés dans *E. coli* (Postle and Kadner, 2003). La stoechiométrie du complexe, d'environ 520 kDa, a été définie à 2 TonB / 4ExbD / 14 ExbB (Higgs et al., 2002; Postle and Kadner, 2003; Sauter et al., 2003). ExbB interagit à la fois avec ExbD et avec TonB (Braun et al., 1996; Karlsson et al., 1993).

Les protéines TonB et ExbD interagissent *in vivo* grâce à la force proton motrice (Higgs et al., 1998; Ollis et al., 2009).

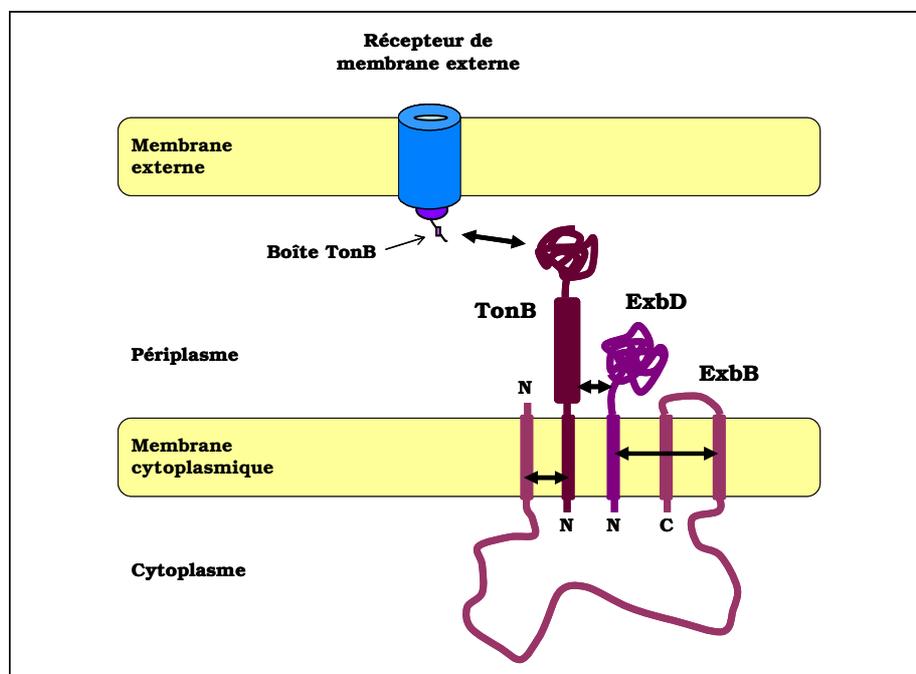


Figure 20 : Schéma de l'organisation du complexe TonB-ExbB-ExbD et ses interactions (représentées par les flèches doubles).

Les 3 protéines TonB, ExbB et ExbD fonctionnent de concert pour transmettre l'énergie de la force proton motrice de la membrane interne au récepteur de membrane externe (Postle and Larsen, 2007). L'interaction entre le domaine C-terminal de TonB et le récepteur TonB-dépendant est nécessaire au transfert d'énergie. Pour ce faire, la protéine TonB va subir des changements conformationnels induits par la force proton motrice lui permettant de contacter le récepteur localisé dans la membrane externe. Cependant, le mécanisme par lequel la force proton motrice de la membrane cytoplasmique active le récepteur via la machinerie TonB n'a pas encore été élucidé. Deux mécanismes ont été proposés :

- le modèle « navette », dans lequel la force proton motrice énergise la protéine TonB via le complexe ExbB/D, entraînant le relargage du segment membranaire de TonB de la membrane interne. La protéine TonB énergisée contacterait alors le récepteur de membrane externe et lui transmettrait l'énergie emmagasinée, avant de retourner à la membrane interne (Larsen et al., 2003; Letain and Postle, 1997; Postle and Kadner, 2003).

- le modèle « rotation » (Chang et al., 2001; Postle and Kadner, 2003). Dans ce modèle, la protéine TonB reste associée à la membrane cytoplasmique en complexe avec ExbB et ExbD. Grâce à la force proton motrice de la membrane cytoplasmique, la partie C-terminale de la protéine TonB va subir un mouvement de rotation initié par les protéines ExbB et ExbD (Postle and Kadner, 2003). Ce mouvement de rotation de TonB lui permettrait d'adopter, grâce à son bras riche en proline, une conformation étendue suffisante pour traverser le périplasma et contacter par son domaine C-terminal avec la boîte TonB du récepteur de membrane externe (Letain and Postle, 1997; Postle and Kadner, 2003).

L'interaction avec TonB induirait les changements conformationnels nécessaires au passage du complexe à travers le récepteur (Shultis et al., 2006). Ainsi, le complexe de membrane interne TonB-ExbB-ExbD est un véritable « transducteur d'énergie », qui permet la translocation active du complexe sidérophore-fer à travers le récepteur de membrane externe.

## **2. Passage de la membrane cytoplasmique**

Chez *E. coli*, une fois dans le périplasma, les ferrisidérophores sont transportés à travers la membrane interne via un transporteur ABC. Le fer est ensuite dissocié de son

sidérophore dans le cytoplasme (Koster, 2001). Les transporteurs ABC sont constitués d'une perméase insérée dans la membrane cytoplasmique associée à une protéine de liaison à l'ATP (Koster, 2005). L'énergie requise au passage à travers le transporteur est alors procurée par l'hydrolyse d'ATP en ADP. Chez les bactéries à Gram négatif, on trouve souvent associé à ces transporteurs ABC une protéine affine périplasmique permettant d'apporter le ligand au transporteur.

Dans le cas de *P. aeruginosa*, l'analyse du génome suggère la présence d'un homologue au transporteur ABC de l'entérobactine d'*E. coli*. En revanche, aucun candidat homologue aux systèmes ABC d'*E. coli* de transport du citrate, du ferrichrome ou de la ferrioxamine B n'ont été retrouvés dans le génome de *P. aeruginosa*, suggérant un mécanisme de général de transport du fer à travers la membrane interne différent (voir figure 11, page 28).

Dans les cas du transport de la ferripyochéline, du ferrichrome et de la ferrioxamine B, le passage à travers la membrane interne serait assuré par une perméase spécifique. La protéine de membrane interne FptX est nécessaire au transport du fer par la pyochéline (Cuiv et al., 2004). La protéine FoxB serait impliquée dans le transport du fer par le ferrichrome et la ferrioxamine B (Cuiv et al., 2007). Cependant, l'absence de cette protéine n'abolit pas l'import du fer via ces sidérophores, suggérant une redondance de ce transporteur au niveau de la membrane interne.

Dans le cas de la pyoverdine chez *P. aeruginosa*, le ferrisidérophore serait dissocié dans le périplasme, ce qui implique que seul le fer est transporté vers le cytoplasme (Greenwald et al., 2007). Ce fer serait pris en charge par une protéine affine périplasmique d'un transporteur ABC putatif, codé par l'opéron PA2407 à 2410. Ces gènes ont été très étudiés au sein du laboratoire, mais ce travail n'a pas permis pour l'instant d'attribuer formellement un rôle à ce transporteur dans le passage du fer à travers la membrane interne. En revanche, il a été montré que la protéine périplasmique, codée par le gène PA2407, était capable de lier le fer (résultats non publiés).

Ce mécanisme de transport pourrait se rapprocher des transporteurs « sidérophores indépendants ». Il existe en effet des transporteurs ABC sidérophores indépendants impliqués dans l'import du fer, pour lesquels seul le fer est le substrat. C'est le cas par exemple des transporteurs ABC transportant le fer via les récepteurs à la transferrine, que l'on retrouve chez *Neisseria meningitidis* (système FbpABC) ou *Haemophilus influenzae* (système hit) (Adhikari et al., 1995; Anderson et al., 2004).

### **3. Métabolisme intracellulaire des ferrisidérophores**

#### ***a) Dissociation du ferrisidérophore***

Une fois transporté dans la cellule, le ferrisidérophore, thermodynamiquement stable, doit être dissocié pour permettre l'utilisation du fer par la bactérie.

Pour cette étape, trois principaux mécanismes de relargage du fer ont été proposés (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998; Barchini and Cowart, 1996; Dhungana et al., 2005) :

- par hydrolyse partielle ou totale du sidérophore,
- par protonation assistée des fonctions chélatrices du sidérophore,
- par réduction du centre métallique.

La réduction du Fe(III) en Fe(II) facilite le relargage du métal par diminution de la stabilité thermodynamique du complexe sidérophore et par une augmentation des cinétiques d'échange du ligand (Harrington and Crumbliss, 2009; Raymond et al., 2003; Richens, 2005).

Cette dissociation pourra se produire dans des compartiments cellulaires différents (cytoplasme ou périplasma) selon le type de sidérophore.

Dans le cas de l'entérobactine, le sidérophore est hydrolysé dans le cytoplasme chez *E. coli* (Brickman and McIntosh, 1992; Greenwood and Luke, 1978). Dans le cas du ferrichrome, le fer est probablement réduit du Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup> dans le cytoplasme et le sidérophore est acétylé chez *E. coli* et *P. aeruginosa* (Hannauer et al., ; Hartmann and Braun, 1980; Matzanke et al., 2004).

Dans le cas de la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*, le complexe Pvd-Ga, qui ne peut pas être dissocié par réduction du métal, s'accumule dans le périplasma de la bactérie, suggérant que l'étape de dissociation métal-sidérophore se déroule dans ce compartiment cellulaire et fait intervenir un mécanisme de réduction du métal (Greenwald et al., 2007). La réductase impliquée n'a cependant pas encore été identifiée.

#### ***b) Recyclage du sidérophore***

S'il n'est pas hydrolysé, le sidérophore pourra être recyclé dans le milieu extracellulaire, soit dans sa forme native, soit modifié chimiquement.

Dans le cas de la pyoverdine, après relargage du métal, le sidérophore est recyclé dans le milieu extracellulaire (Schalk et al., 2002). Cette pyoverdine recyclée est

toujours capable de lier le fer et d'effectuer un nouveau cycle de transport (Greenwald et al., 2007; Schalk et al., 2002).

Pour la voie du ferrichrome, le sidérophore est acétylé puis recyclé du cytoplasme vers le milieu extracellulaire chez *E. coli* et chez *P. aeruginosa* (Hannauer et al.).

Les voies et les mécanismes de ces recyclages n'ont pas encore été identifiés, ni chez *P. aeruginosa*, ni chez *E. coli*.

## **B. Le système de régulation de la pyoverdine et de son acquisition**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'homéostasie du fer, les facteurs  $\sigma$ -ECF assurent directement le contrôle des gènes de biosynthèse de certains sidérophores et/ou de leur acquisition. Ce mode de régulation a été observé pour de nombreux sidérophores, notamment la pyoverdine et le ferrichrome chez *P. aeruginosa* et le citrate chez *E. coli* (Braun et al., 2003; Llamas et al., 2006; Poole and McKay, 2003; Visca et al., 2002). Ce système de régulation va être à double niveau :

- lorsque la bactérie est en carence en fer, une cascade de signalisation, via les facteurs sigma, va activer la transcription des gènes de production et d'acquisition du sidérophore,
- lorsque la quantité en fer acquise est suffisante, un rétrocontrôle génique par la protéine répresseur Fur bloque la production du sidérophore et de ses protéines d'acquisition.

### **1. Régulation positive du système pyoverdine**

#### **a) Mécanisme de contrôle**

Cette régulation requiert une cascade de transduction de signal qui implique :

- le récepteur de membrane externe lui-même, qui, lié au ferrisidérophore, initie la cascade (Ferguson et al., 2007),
- un système régulateur en deux parties, qui inclut un élément de réponse à l'environnement, le facteur  $\sigma$ -ECF, et un facteur anti-sigma qui contrôle l'activité du facteur  $\sigma$ -ECF (Braun et al., 2006).

Ce type de régulation n'existe que lorsque le récepteur de membrane externe possède l'extension N-terminale contenant le domaine de signalisation. Ces récepteurs, tels que FpvA ou FecA, jouent alors le rôle de médiateur du signal. Lorsque le ferrisidérophore se lie au récepteur, celui-ci subit des changements conformationnels, notamment au niveau du domaine de signalisation qui subit une rotation vers le périplasme (figure 18, page 36) (Brillet et al., 2007; Wirth et al., 2007). Le domaine de signalisation va alors pouvoir contacter la partie périplasmique du facteur anti- $\sigma$  inséré dans la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne la libération du ou des facteurs  $\sigma$ -ECF qui lui sont associés. Les facteurs  $\sigma$ -ECF vont alors aller se fixer sur les promoteurs de leurs gènes cibles et en activer la transcription.

L'analyse du génome montre que *P. aeruginosa* coderait pour 32 récepteurs TonB-dépendants potentiellement impliqués dans l'assimilation du fer, trois protéines TonB, dont TonB1 utilisée dans le transport du fer via la pyoverdine, et moins d'une dizaine de transporteurs ABC potentiellement impliqués dans le transport de fer seul ou en complexe avec différents sidérophores (Cornelis and Matthijs, 2002). Par ce type de système de régulation, l'expression de récepteurs variés est régulée d'une part avec la seule production de récepteurs répondants positivement aux sidérophores disponibles et d'autre part par la sélection des multiples sidérophores disponibles sur la base de leur efficacité de chélation du fer et du transport suivant (Llamas et al., 2006).

### **b) Le système pyoverdine : FpvR, PvdS et FpvI**

La régulation post-transcriptionnelle du système pyoverdine fonctionne sur ce modèle et fait intervenir le facteur anti- $\sigma$  FpvR qui contrôle les deux facteurs  $\sigma$ -ECF PvdS et FpvI (Beare et al., 2003; Visca et al., 2002).

La liaison de la pyoverdine chargée en fer avec son récepteur FpvA et les changements conformationnels qui s'ensuivent au niveau du domaine de signalisation vont entraîner l'interaction de ce domaine avec la partie périplasmique de **FpvR**, localisé dans la membrane cytoplasmique (Beare et al., 2003; Lamont et al., 2002; Shen et al., 2002). Le signal transduit à la partie périplasmique de l'antisigma FpvR est transmis à sa partie cytoplasmique, qui contrôle l'activité de PvdS et de FpvI, ce qui entraîne leur dissociation (Redly and Poole, 2005).

**PvdS** est un facteur ECF- $\sigma$  alternatif, essentiel pour l'expression de nombreux gènes du locus « pvd » impliqués dans la biosynthèse de la pyoverdine (Cunliffe et al., 1995; Leoni et al., 2000; Wilson and Lamont, 2000; Wilson et al., 2001). PvdS active

notamment l'expression de PvdA, codant pour une enzyme clé dans la voie biosynthétique de la pyoverdine (Leoni et al., 1996). PvdS joue aussi un rôle clé dans la signalisation médiée par les sidérophores, qui permet, en réponse à un manque de fer, l'expression concertée de nombreux déterminants de virulence connus, incluant l'exotoxine A et l'endoprotéase PrpL, deux facteurs de virulence extracellulaire, (Hunt et al., 2002; Lamont et al., 2002; Wilderman et al., 2001; Wilson and Lamont, 2000).

Le facteur  $\sigma$  PvdS, associé à l'ARN polymérase, se lie à une séquence spécifique de reconnaissance de la région promotrice, appelé boîte IS (« Iron Starvation » box), ce qui permet alors l'activation de la transcription des gènes présentant cette boîte (Wilson and Lamont, 2006; Wilson et al., 2001). Le motif de séquence constituant la boîte IS est situé à environ 30-40 paires de bases du site de début de transcription et forme une partie de la séquence promotrice (Rombel et al., 1995; Wilson et al., 2001). Une seconde séquence, le motif CGT, à environ -10 paires de base, serait aussi requise pour la reconnaissance du promoteur par PvdS (résultats non publiés I. Lamont). Les boîtes IS, correspondant au consensus TAAAT-N16/17-GCT, sont trouvées en amont de nombreux gènes ou clusters de gène (Ochsner et al., 2002b). PvdS montre une forte similarité de séquence avec le facteur sigma FecI de *E.coli*, le régulateur positif de la transcription de FecA, impliqué dans le transport du citrate ferrique (Miyazaki et al., 1995).

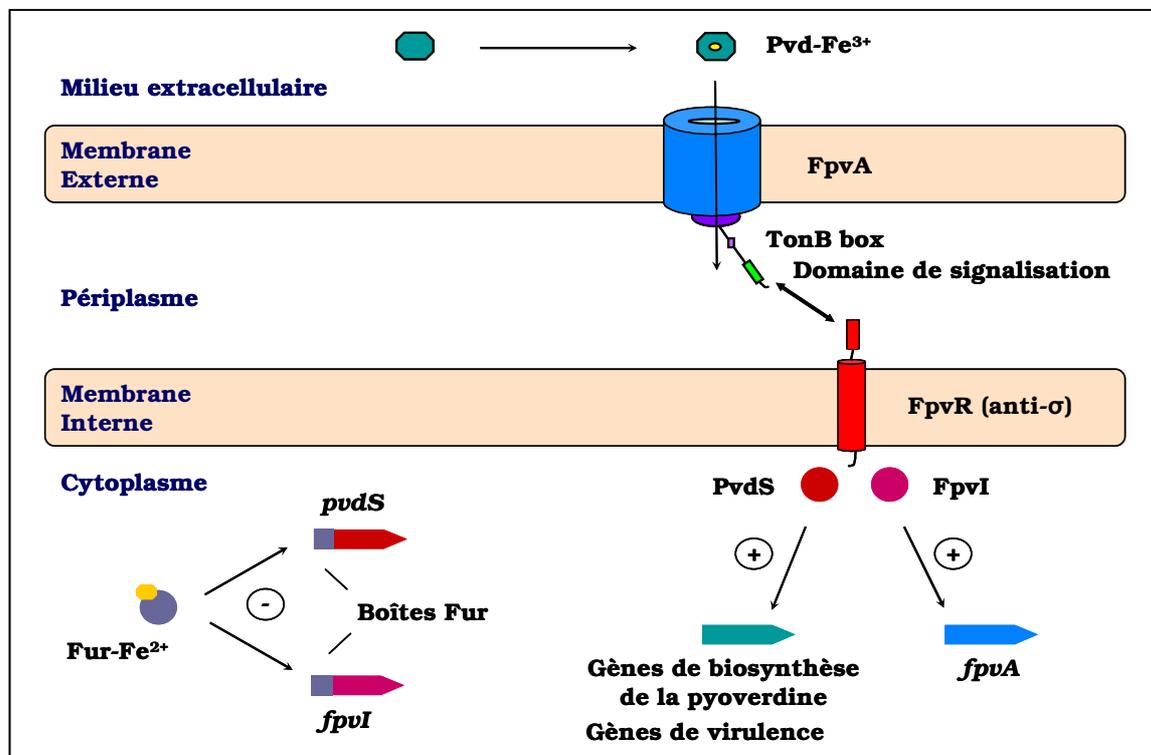


Figure 21 : Schéma général du système de régulation de la voie pyoverdine. La liaison du complexe pyoverdine-Fe induit un changement de conformation du domaine N-terminal du récepteur FpvA. Le

domaine de signalisation peut alors interagir avec le facteur anti-sigma FpvR. Les facteurs sigma PvdS et FpvI libérés vont recruter l'ARN polymérase pour activer la transcription de leurs gènes cibles. Lorsque la concentration en fer devient trop importante dans la cellule, la protéine Fur activée se lie aux promoteurs des gènes *pvdS* et *FpvI* et en réprime la transcription.

**FpvI**, second facteur ECF- $\sigma$  dont l'activité est négativement régulée par FpvR, est requis pour l'expression du gène du récepteur de la pyoverdine, FpvA (Beare et al., 2003; Redly and Poole, 2003, 2005). En présence d'un complexe pyoverdine-Fe, l'activité de FpvI est considérablement augmentée, ce qui induit la production de FpvAI (Redly and Poole, 2003). FpvI présente également des similarités de séquence aux facteurs sigma Fecl chez *E. coli* ou PupI chez *P. putida*, responsables respectivement de l'expression sidérophore dépendante des récepteurs au citrate et à la pseudobactine (Redly and Poole, 2003).

## 2. Régulation négative du système pyoverdine

En conditions de croissance riche en fer, la protéine répresseur Fur (Ferrique Uptake Repressor) assure la régulation négative du système.

Fur contrôle directement les promoteurs des gènes de transport et de biosynthèse des sidérophores, mais aussi la transcription des gènes codant pour les facteurs  $\sigma$ -ECF et anti- $\sigma$ -ECF impliqués dans la régulation positive du système (Cunliffe et al., 1995; Hantke, 2001; Leoni et al., 1996).

Lorsque le gène *fur* de *E. coli* est muté, les sidérophores et leurs protéines récepteurs de membrane externe sont constitutivement surproduites (Hantke, 2001). Chez *E. coli*, Fur réprime aussi l'expression des gènes *tonB-exbB-exbD* (Braun, 2003).

Chez *P. aeruginosa*, les gènes *pvdS*, *fpvI* et *fpvR* possèdent au niveau de leur séquence promotrice un site de liaison à Fur (Beare et al., 2003; Cunliffe et al., 1995; Redly and Poole, 2003; Vasil and Ochsner, 1999).

Ce système de régulation permet d'éviter l'accumulation de fer dans la cellule, mais aussi, probablement, la production, inutile et coûteuse en énergie pour la cellule, de sidérophores et des récepteurs cibles en milieu riche en fer.



## IV. Biosynthèse et maturation de la pyoverdine

En fonction de la nature chimique des sidérophores, leur biosynthèse peut se faire selon différents mécanismes (Miethke and Marahiel, 2007). Généralement, les sidérophores composés de peptides sont assemblés par des peptides synthétases non ribosomiques similaires à celles utilisées pour la biosynthèse des peptides antibiotiques. Cette synthèse a lieu dans le cytoplasme. Elle fait souvent intervenir des enzymes de modification et parfois des enzymes de maturation post-synthèse.

Parmi les 100 pyoverdines identifiées à ce jour, seule la biosynthèse de la pyoverdine de type I de *P. aeruginosa* a été relativement bien décrite dans la littérature. En effet, l'utilisation d'approches génomiques, permettant l'identification de gènes impliqués dans la synthèse de ce sidérophore et suggérant des fonctions pour les enzymes correspondantes, combinés à des analyses biochimiques, testant les hypothèses ainsi générées, ont permis une large compréhension des différentes étapes moléculaires de cette voie de biosynthèse (pour revue (Visca et al., 2007)). Les gènes ainsi caractérisés codent principalement pour des enzymes de modification et pour des peptides synthétases non ribosomiques. Comme pour de nombreux sidérophores, ces gènes de biosynthèse de la pyoverdine sont majoritairement regroupés au sein du même locus, appelé le locus « *pvd* ».

Très schématiquement, le squelette peptidique de la pyoverdine, en grande partie dérivé de précurseurs d'acides aminés, est assemblé séquentiellement par des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS, en anglais Non Ribosomal Peptides Synthetases) localisées dans le cytoplasme et modifié par des enzymes accessoires dans le cytoplasme et probablement dans le périplasme (Visca et al., 2007).

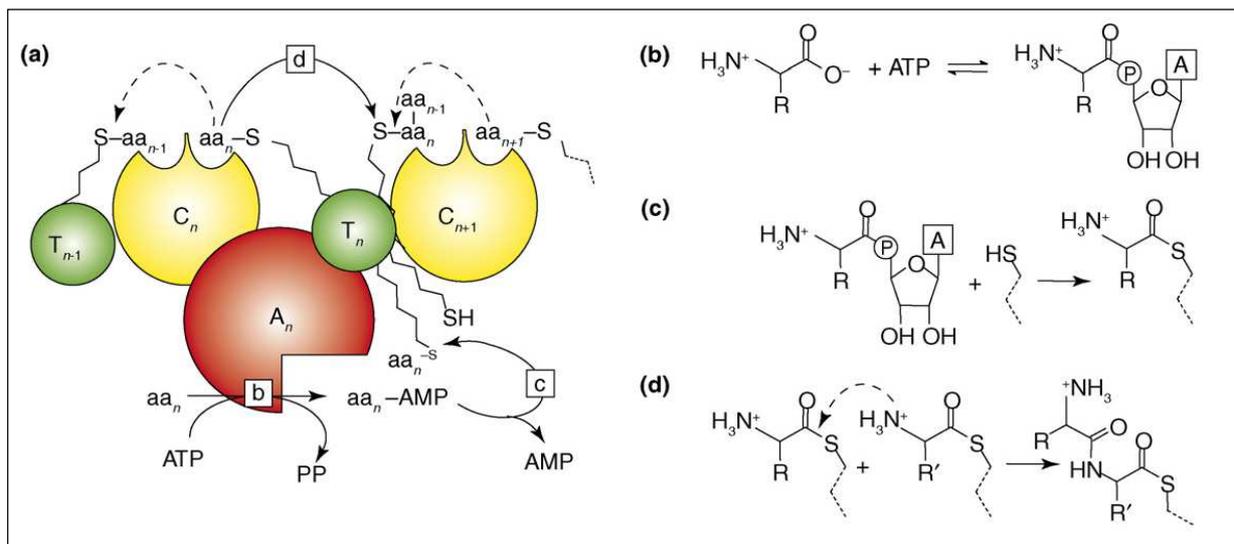
### A. Les NRPS

Les peptides synthétases non ribosomiques sont de grosses enzymes multimodulaires responsables de la synthèse de séquences peptidiques particulières (pour revue (Finking and Marahiel, 2004)). Ces enzymes ne nécessitent pas de brin d'ARNm modèle, produisant donc des peptides non ribosomiques. Elles ont été découvertes à l'origine comme catalyseurs de la synthèse d'antibiotiques et d'autres substances dans les bactéries à Gram positif (Crosa and Walsh, 2002).

Une ligne d'assemblage NRPS comprend des domaines structurés autonomes, rassemblés en modules fonctionnels pour effectuer les étapes de sélection et d'activation des monomères, d'élongation et enfin de terminaison de la chaîne

peptidique synthétisée. Le nombre de domaines dans la chaîne d'assemblage est variable, pouvant aller jusqu'à 45 domaines. Chaque module de l'enzyme dirige l'incorporation séquentielle d'un acide aminé dans la chaîne peptidique en cours de synthèse.

Le module de base des NRPS est composé de 3 domaines minimum : un domaine d'Adénylation ou d'Activation (A), d'un domaine de Thiolation (T) et d'un domaine de condensation (C) (figure 22). Le domaine A d'activation de chaque module du NRPS reconnaît et active un acide aminé spécifique en son adénylate acyle par réaction avec l'ATP. Cet ester activé est ensuite covalentement lié sous sa forme thioester sur le domaine T de thiolation. Enfin, le domaine C de condensation catalyse le transfert direct à un autre intermédiaire acide aminé acyle sur le module adjacent en amont pour former une liaison peptidique.



**Figure 22** : Mécanisme de fonctionnement des NRPS (d'après (Visca et al., 2007)). (a) Chaque module de base contient un domaine A, responsable de la reconnaissance et de l'adénylation (activation) de l'acide aminé substrat, un domaine T de thiolation, auquel un cofacteur phosphopantéthéine est attaché de façon covalente et, à l'exception du module responsable de l'incorporation du premier acide aminé, un domaine C de condensation, qui catalyse la formation séquentielle de la liaison peptidique entre le peptide naissant et l'acide aminé suivant, porté par le module flanquant. Dans chaque module, l'acide aminé reconnu subit une réaction d'adénylation (réaction (b)). Il est ensuite covalentement transféré au cofacteur phosphopantéthéine (réaction (c)), puis le domaine C catalyse la formation de la liaison peptidique par l'attaque nucléophile de l'acide aminé suivant, activé et lié au phosphopantéthéine, sur le groupe carboxyle du peptide naissant (réaction (d)) (flèches pointillées). Le peptide est synthétisé dans la direction N-terminale vers C-terminale.

Dans certains cas, les modules peuvent aussi contenir des domaines accessoires pour la méthylation ou l'épimérisation de la configuration L- à la configuration D- de l'acide aminé substrat.

Enfin, le dernier module comprend en général un domaine thioestérase qui hydrolyse la liaison thioester entre le peptide assemblé et le cofacteur phosphopantéthéine, permettant le relargage du peptide. Cette réaction est souvent couplée avec la cyclisation du peptide (Finking and Marahiel, 2004).

Le nombre de modules de l'enzyme impliqués sera dépendant de la taille de la molécule à assembler. En général, le nombre et l'ordre des modules dictent le nombre et l'ordre des acides aminés activés et incorporés dans le peptide produit (Crosa and Walsh, 2002).

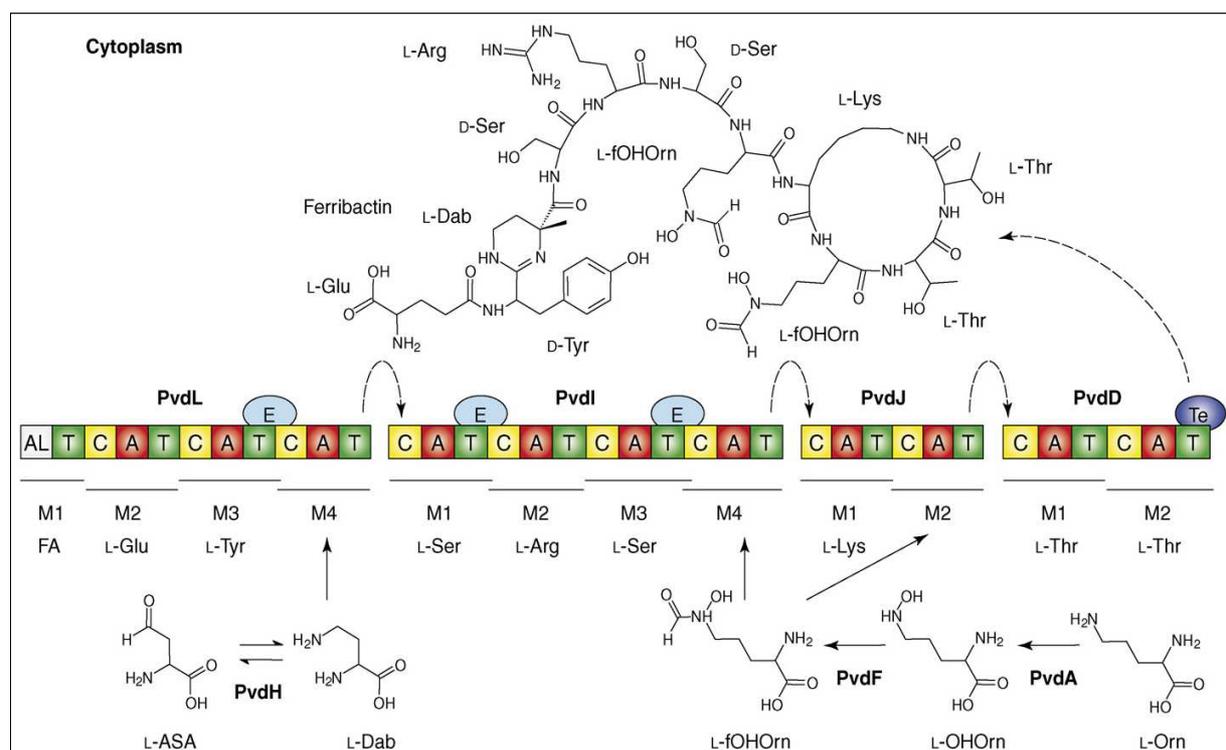
## **B. La synthèse du squelette carboné de la pyoverdine**

Le squelette carboné de la pyoverdine est entièrement synthétisé dans le cytoplasme par les NRPS PvdL, PvdI, PvdJ et PvdD (Lehoux et al., 2000; Merriman et al., 1995; Mossialos et al., 2002). Le squelette du chromophore de la pyoverdine est le produit par la condensation de la L-Glu, D-Tyr et L-Dab, tandis que la partie peptidique de la pyoverdine PAO1 de type I provient de la condensation et de la cyclisation partielle de 8 acides aminés.

PvdL est la seule NRPS dans laquelle le domaine C initial est absent, ce qui suggère sa place de 1<sup>er</sup> intervenant dans la biogenèse de la pyoverdine (Mossialos et al., 2002). PvdL est aussi constituée de 2 modules de base (II et IV), séparé d'un 3<sup>ème</sup> module central possédant un domaine d'épimérisation additionnel. Le 4<sup>ème</sup> module est inhabituellement court, avec un domaine T précédé par un domaine semblable à une acyl-CoA ligase, dont le rôle n'a pas encore été élucidé dans la synthèse peptide non-ribosomal (Mossialos et al., 2002). PvdI et PvdJ sont composées de 4 et 2 modules de bases respectivement. Dans les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> modules de PvdI, on retrouve deux domaines d'épimérisation supplémentaires, probablement impliqués dans l'épimérisation des deux résidus L-Ser (Lehoux et al., 2000; Ravel and Cornelis, 2003). Enfin, PvdD est la seule NRPS qui possède à son extrémité un domaine thioestérase, ce qui suggère que PvdD est impliquée dans le relargage du sidérophore à la fin de l'assemblage (Ackerley et al., 2003).

PvdD est la seule de ces peptides synthétases décrite biochimiquement comme activant deux résidus L-Tyr (Ackerley et al., 2003). Cependant, la voie NRPS de la structure de la pyoverdine a pu être établie à partir de prédictions *in silico* du substrat spécifique à chaque domaine A et de l'analyse l'organisation moléculaire de chaque

NRPS (Challis et al., 2000; Stachelhaus et al., 1999). Pour *P. aeruginosa* PAO1 et *P. syringae*, la composition de la partie peptidique de la pyoverdine prédite par l'analyse des acides aminés les plus communs activés par les domaines A successifs des NRPS impliquées correspondent parfaitement aux structures des pyoverdines publiées (Julich et al., 2001; Meyer, 2000).



**Figure 23** : Schéma de biosynthèse par les NRPS du squelette peptidique de la pyoverdine PAO1 de type 1 aboutissant à un précurseur de la pyoverdine, la ferribactine (d'après (Visca et al., 2007)). Les réactions catalysées par les enzymes de modification PvdH, PvdA et PvdF sont aussi représentées. Les NRPS sont représentés schématiquement en domaines modulaires (M). Chaque domaine est symbolisé par une lettre : A pour domaine d'adénylation, AL pour domaine acyl-coA ligase, C pour domaine de condensation et T pour domaine de thiolation. En ovale sont indiqués les domaines auxiliaires d'épimérisation (domaine E) et de thioestérase (domaine Te). L'acide aminé substrat reconnu par chaque module est également indiqué. Abréviations : ASA = aspartate β-semialdéhyde, Dab = 2,4-diaminobutyrate, FA = acide gras, fOHOrn = N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine, OHOrn = N<sup>5</sup>-hydroxyornithine

PvdL et les NRPS en amont travaillent de concert pour synthétiser le squelette peptidique entier de la pyoverdine (figure 23). Très brièvement, PvdL catalyse la formation du squelette chromophore par condensation de la D-Tyrosine et de l'acide L-2,4-diaminobutyrique avec le L-acide glutamique (Mossialos et al., 2002). Cet acide glutamique sera le précurseur de l'acide dicarboxylique lié à l'amide (Taraz et al., 1991).

Le domaine C du module 1 de PvdI recrute et lie le précurseur formé par PvdL au premier résidu acide aminé (D-Sérine) de la future chaîne peptidique. L'élongation du peptide se fait ensuite par la progression linéaire des modules de PvdI, PvdJ et PvdD. PvdI catalyse la condensation de la L-arginine, de la deuxième L-Sérine et de la L-N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine, préalablement modifiée par PvdF et PvdA. PvdJ ajoute à ce précurseur la L-lysine et la deuxième L-N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine. Pour terminer, les 2 résidus L-Thréonine du peptide sont incorporées par la peptide synthétase PvdD (Ackerley et al., 2003). Le peptide est alors relargué par l'activité du domaine thioestérase de PvdD (Ackerley et al., 2003).

### C. Les enzymes de modification

Chez *P. aeruginosa*, la synthèse de la pyoverdine implique plusieurs modifications chimiques d'acides aminés guidées par des enzymes codées par des gènes localisés dans le locus Pvd. Ces modifications concernent des résidus de la partie peptidique de la pyoverdine. En effet, le peptide de la pyoverdine comprend des acides aminés inhabituels, tels que la N<sup>5</sup>-hydroxyornithine, la N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine ou l'hydroxyaspartate.

Ces modifications sont guidées par des enzymes cytoplasmiques codées par les gènes *pvdA*, *pvdF* et *pvdH* (figure 23). Ces trois enzymes ont été caractérisées génétiquement et biochimiquement (figure 23):

- PvdA, une L-Ornithine N<sup>5</sup>-oxygénase, est l'enzyme qui catalyse la synthèse de la L-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine par hydroxylation de L-Ornithine (Ge and Seah, 2006). Cette étape précoce de la biosynthèse de la pyoverdine a été caractérisée au niveau moléculaire chez *P. aeruginosa* (Visca et al., 1994),

- PvdF, une transformylase, catalyse la formylation de la N<sup>5</sup>-hydroxyornithine pour former la N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine qui est incorporée dans la pyoverdine (McMorran et al., 2001). Cela implique donc que PvdA et PvdF agissent de façon séquentielle pour synthétiser la L-N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine.

Le gène *pvdF* est seulement présent chez *P. aeruginosa*. En revanche, un gène codant pour une transacétylase a été retrouvé dans les génomes de *P. putida* et *P. fluorescens* (Ravel and Cornelis, 2003),

- PvdH peut catalyser une réaction aminotransférase internconvertissant l'aspartate  $\beta$ -semialdéhyde et la L-2,4-diaminobutyrate (L-Dab) (Vandenende et al., 2004).

Il n'est pas encore bien défini si ces réactions de modification ont lieu avant ou pendant l'incorporation des acides aminés dans la chaîne peptidique. Cependant, les mutants des gènes *pvdA* et *pvdF* ne sont pas fluorescents, suggérant que la formation de N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine est un pré-requis pour l'assemblage du chromophore et la maturation (McMorran et al., 2001; Visca et al., 1994; Visca et al., 1992).

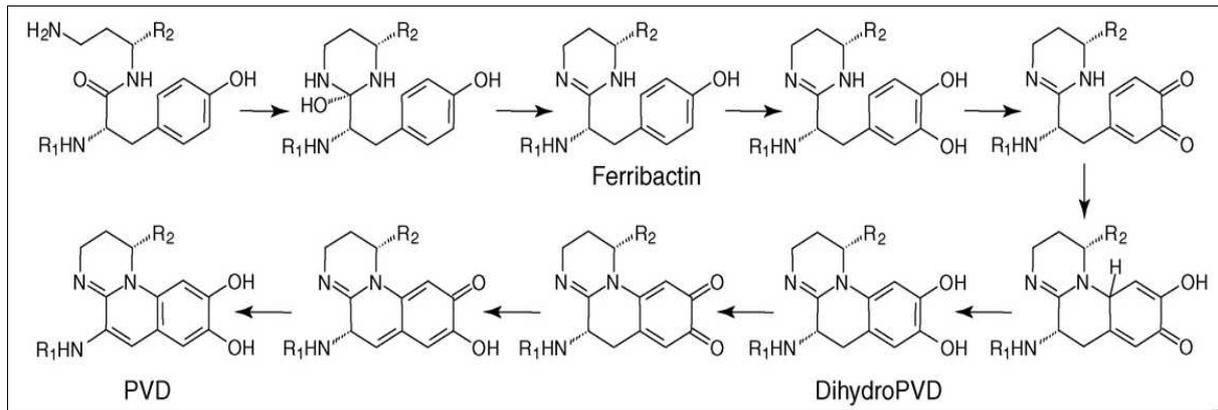
## **D. Les étapes de maturation**

Selon les sidérophores et en fonction de leur complexité, le peptide synthétisé par les NRPS va devoir subir une ou plusieurs étapes de maturation avant d'être fonctionnel. Ces étapes incluent la cyclisation du chromophore, la modification des groupes chélatants et le repliement de la molécule (cyclisation ou semi cyclisation du peptide) et suggèrent que des enzymes additionnelles viennent compléter la synthèse du squelette carboné.

Les événements conduisant à la maturation de la pyoverdine, et notamment à la cyclisation du chromophore, sont encore très mal compris. Des études basées sur l'identification et la caractérisation de composés intermédiaires de la voie de biosynthèse en utilisant des approches biochimiques classiques, notamment de spectrométrie de masse, ont été mises en œuvre en particulier dans le laboratoire de H. Budzikiewicz (Budzikiewicz, 1993). Cette méthode a abouti à la description de deux intermédiaires de biosynthèse purifiés et caractérisés particulièrement importants, la ferribactine et la 5, 6-dihydroxypyoverdine, qui a permis un éclairage sur la synthèse du chromophore de la pyoverdine (Hohlneicher et al., 2001). La ferribactine est un précurseur cytoplasmique de pyoverdine dans lequel le futur chromophore est encore sous forme de chaîne peptidique,  $\gamma$ -L-Glu-D-Tyr-L-Dab, telle qu'elle a été synthétisée par la NRPS PvdL (Hohlneicher et al., 2001). La dihydroxypyoverdine est identique à la pyoverdine à l'exception de deux carbones du chromophore qui ne sont pas saturés (Hohlneicher et al., 2001). En conséquence, ces 2 formes n'émettent pas de fluorescence.

La transformation de la ferribactine en pyoverdine requiert une série de réactions redox suivies par une tautomérisation qui conduit à la formation de l'anneau dihydroxyquinoline. Cette cyclisation du chromophore de la pyoverdine par condensation oxydative a été montrée possible par synthèse chimique par l'addition d'une molécule oxydante (Dorrestein, 2003 ; Jones, 2008).

Une revue récente sur le sujet a proposé, à partir de ces données, le schéma suivant pour la biosynthèse du chromophore (Visca et al., 2007) :



**Figure 24** : Enchaînement séquence réactionnel pouvant conduire à la cyclisation du chromophore ((Visca et al., 2007). R1 représente une chaîne acyle et R2 la partie peptidique de la molécule.

L'hypothèse que plusieurs modifications de la partie chromophore puissent prendre place dans le périplasma a également été émise (Baysse et al., 2002). Des mutants défectueux dans le système de sécrétion des protéines TAT (Twin-Arginine Translocation) sont pyoverdine déficients, ce qui suggère que au moins certains composants clés de la biosynthèse de la pyoverdine doivent être exportés dans le compartiment périplasmique par la voie Tat (Ochsner et al., 2002a).

### **E. Organisation génomique : le « locus pvd »**

Très souvent, les gènes responsables de la biosynthèse, l'excrétion, le transport et la régulation des sidérophores sont rassemblés dans le génome en un ou plusieurs loci (Crosa and Walsh, 2002). Par exemple, chez *E.coli*, tous les gènes nécessaires à la production de l'entérobactine et à son utilisation sont regroupés au sein des deux loci *ent* et *fep*, localisés sur le chromosome à l'intérieur d'un cluster d'approximativement 22 kb (Crosa and Walsh, 2002).

Chez *P. aeruginosa*, la biosynthèse et la sécrétion de la pyoverdine, l'import du fer ainsi que la régulation de l'expression des gènes de ce système sont gouvernés par une trentaine de gènes rassemblés au sein d'un cluster de gènes, appelé « **locus pvd** » (Stover et al., 2000; Tsuda et al., 1995). Ce cluster se situe à environ 47 min sur la carte génétique et s'étale sur environ 90 kb d'ADN du chromosome bactérien (Ankenbauer et al., 1986; Tsuda et al., 1995).

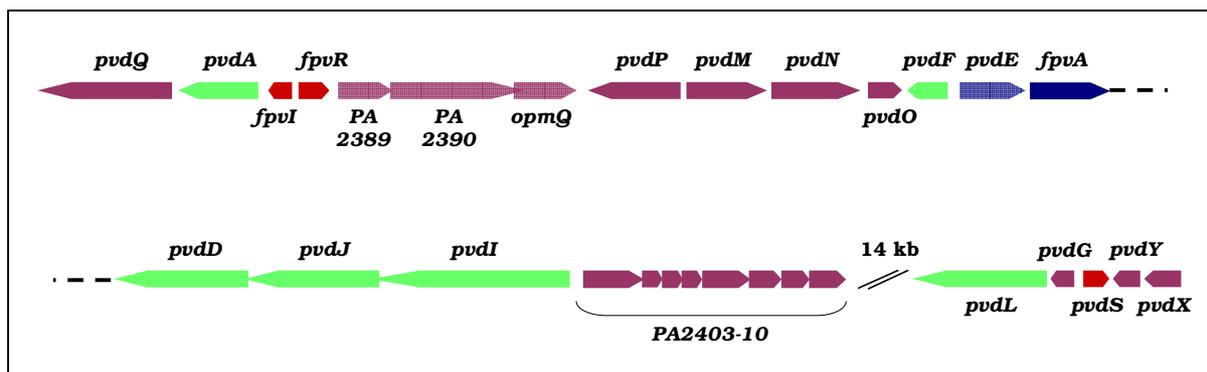


Figure 25 : Représentation schématique du locus « pvd ». Les gènes de biosynthèse sont représentés en vert, les gènes de régulation en rouge, les gènes de transport en bleu et les gènes de fonction encore inconnue en violet.

Dans d'autres espèces, les gènes pyoverdine sont soit aussi regroupés en un cluster unique comme chez *P. syringae*, soit disposés en plusieurs clusters, comme chez *P. fluorescens* et *P. putida* (divisés en 3 loci dans ces génomes) (Ravel and Cornelis, 2003).

Les gènes et enzymes requis pour la synthèse de pyoverdine sont les mieux caractérisés dans le type I de la souche PAO1. Grâce au séquençage complet de *P. aeruginosa* PAO1, de nombreux gènes requis pour la biosynthèse de la pyoverdine ont été identifiés dans le génome en utilisant une puce à ADN (GeneChip®, Affymetrix), qui a permis la mise en évidence des changements globaux d'expression induits par la carence en fer, puis par étude moléculaire et / ou biochimique des gènes candidats (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b; Palma et al., 2003; Stover et al., 2000). Cependant, si de nombreux gènes du « locus pvd » ont été caractérisés, certains restent encore de fonction indéterminée (voir table 1).

Des analyses de génomes entre différentes souches de *P. aeruginosa* ont permis de montrer que certains gènes pyoverdine sont restreints aux souches produisant une même pyoverdine, suggérant que ces gènes dirigent la synthèse du peptide souche spécifique (Lamont and Martin, 2003; Rombel and Lamont, 1992). Seule la NRPS PvdL est hautement conservée dans de nombreux génomes de *Pseudomonas* (Mossialos et al., 2002; Ravel and Cornelis, 2003).

De la même manière, les études comparatives inter-espèces de l'organisation génomique du locus pyoverdine révèlent les divergences phylogéniques, ainsi que les événements de sélections positives (comme par exemple *fpvA*, le gène du récepteur de la pyoverdine ou *PA2403*, un gène de fonction inconnue) ou de co-évolutions de gènes qui

ont pu se produire au cours de l'évolution dans ce locus (Rombel and Lamont, 1992; Smith et al., 2005).

Gènes du locus	Fonction	Phénotype	Référence(s)
<i>pvdQ</i>	Probable acylase	Pvd <sup>-</sup>	(Sio et al., 2006)
<i>pvdA</i>	L-Ornithine hydroxylase	Pvd <sup>-</sup>	(Visca et al., 1994)
<i>fpvI</i>	Facteur ECF sigma, contrôle la transcription du gène <i>fpvA</i>	Pvd <sup>+</sup>	(Beare et al., 2003)
<i>fpvR</i>	Facteur anti-sigma pour les facteurs sigma PvdS et FpvI	Pvd <sup>+</sup>	(Beare et al., 2003; Lamont et al., 2002)
<i>PA2389</i>	Similarités avec les protéines de fusion membranaire périplasmique des systèmes d'efflux tripartites	Pvd <sup>+/-</sup>	(Zgurskaya and Nikaido, 2000)
<i>PA2390</i>	Similarités avec les transporteurs de type ABC des systèmes d'efflux tripartites	Pvd <sup>+/-</sup>	(Zgurskaya and Nikaido, 2000)
<i>PA2391</i>	Similarités avec les facteurs de membrane externe des systèmes d'efflux tripartites	Pvd <sup>+/-</sup>	(Zgurskaya and Nikaido, 2000)
<i>PvdP</i>	Pas de fonction connue	Pvd <sup>-</sup>	
<i>PvdM</i>	Similarités avec une dipeptidase	Pvd <sup>-</sup>	(Rached et al., 1990)
<i>PvdN</i>	Similarités avec une isopénicilline N-épimérase de <i>Streptomyces clavuligerus</i> Prédite être une aminotransférase	Pvd <sup>-</sup>	(Kovacevic et al., 1990; Ochsner et al., 2002b)
<i>PvdO</i>	Pas de fonction connue	Pvd <sup>-</sup>	
<i>pvdF</i>	N <sup>5</sup> -hydroxyornithine transformylase	Pvd <sup>-</sup>	(McMorran et al., 2001)
<i>pvdE</i>	Probable ABC transporteur (sécrétion)	Pvd <sup>-</sup>	(McMorran et al., 1996)
<i>fpvA</i>	Récepteur de membrane externe de la ferripyoverdine	Pvd <sup>+/-</sup>	(Poole et al., 1993b)
<i>pvdD</i>	NRPS peptide	Pvd <sup>-</sup>	(Ackerley et al., 2003; Merriman et al., 1995)
<i>pvdJK</i>	NRPS peptide	Pvd <sup>-</sup>	(Lehoux et al., 2000)
<i>pvdI</i>	NRPS peptide	Pvd <sup>-</sup>	(Lehoux et al., 2000)

<i>PA2403-10</i>	Expression co-régulée avec les gènes de synthèse de la pyoverdine. <i>PA2407-10</i> probable transporteur ABC.	Pvd <sup>+</sup>	(Ochsner et al., 2002b)
<i>PA2411</i>	Similarités avec la thioestérase GrsT de <i>Bacillus brevis</i>	Pvd <sup>+</sup>	(Kratzschmar et al., 1989)
<i>PA2412</i>	Pas de fonction connue	Pvd <sup>-</sup>	
<i>pvdH</i>	Aminotransférase	Pvd <sup>-</sup>	(Lamont and Martin, 2003; Vandenende et al., 2004)
<i>pvdL</i>	NRPS chromophore	Pvd <sup>-</sup>	(Mossialos et al., 2002)
<i>pvdG</i>	Probable thioestérase	Pvd <sup>-</sup>	(Lamont and Martin, 2003)
<i>pvdS</i>	Facteur ECF sigma, contrôle la transcription des gènes de biosynthèse de la pyoverdine	Pvd <sup>-</sup>	(Cunliffe et al., 1995; Miyazaki et al., 1995)
<i>PvdY</i>	Pas de fonction connue	Pvd <sup>+</sup>	(Vasil and Ochsner, 1999)
<i>PvdX</i>	Pas de fonction connue	Pvd <sup>+</sup>	(Vasil and Ochsner, 1999)
Gènes hors locus			
<i>pvcABCD</i>	Enzymes associées à la synthèse de la pyoverdine	Pvd <sup>(-)</sup>	(Stintzi et al., 1996; Stintzi et al., 1999)
<i>ptxR</i>	Régulateur transcriptionnel requis pour l'expression des gènes <i>pvc</i>	Pvd <sup>(-)</sup>	(Stintzi et al., 1999)

**Table 1** : Génomique des fonctions liées à la pyoverdines. Les gènes caractérisés sont notés en noir, les autres sont inscrits en gris. Pvd<sup>-</sup> signifie que lorsque le gène est muté, il n'y a pas de pyoverdine produite, Pvd<sup>+/-</sup>, que de la pyoverdine est produite mais en quantité moindre, Pvd<sup>(-)</sup>, que les effets des mutations sur la synthèse de la pyoverdine sont dépendants du milieu de croissance.

**Remarque** : L'opéron de 4 gènes *pvcABCD*, situé à 66-70 min de la carte génétique sur un cluster distinct du locus « pvd », a été cloné, séquencé et rapporté être requis pour la synthèse du chromophore de la pyoverdine (Stintzi et al., 1996; Stintzi et al., 1999). Cependant, la mutation de ce cluster ne semble pas affecter la production de pyoverdine (Drake and Gulick, 2008). Ces gènes ne sont actuellement plus considérés comme essentiels pour la synthèse de la pyoverdine et la formation du chromophore.

## V. Sécrétion de la pyoverdine

Si les mécanismes de biosynthèse des sidérophores ont été relativement bien étudiés, leurs modes de sécrétion restent encore peu compris et peu décrits dans la littérature. Comme nous venons de l'aborder, les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme. Suivant ou concomitant avec la synthèse, ils doivent franchir la double membrane et l'espace périplasmique des bactéries Gram-négatifs pour rejoindre le milieu extracellulaire, dans lequel ils pourront jouer leur rôle. A cause de leurs propriétés physico-chimiques et de leur taille, les sidérophores ne peuvent pas franchir passivement ces membranes. Cela implique que des mécanismes d'efflux actifs sont nécessaires.

Après un état des connaissances actuelles sur la sécrétion de la pyoverdine et des autres sidérophores, les caractéristiques générales des différents types de systèmes susceptibles d'intervenir seront brièvement présentées dans le paragraphe V-C, en fin de chapitre.

### A. L'export de la pyoverdine

Dans le cas de la pyoverdine, un transporteur de type ABC est probablement impliqué pour la sécrétion à travers la membrane interne. Le gène *pvdE*, localisé dans le locus « pvd » et codant pour un transporteur ABC de classe « export », est décrit comme essentiel pour la synthèse de la pyoverdine (McMorran et al., 1996).

L'expression de PvdE est régulée par le fer (Rombel et al., 1995). En effet, le promoteur de *pvdE* contient une boîte IS (Iron Starvation) et son expression est donc directement régulée par le facteur ECF- $\sigma$  PvdS (Wilson et al., 2001). Ce transporteur est pressenti être responsable du transport d'un précurseur de la pyoverdine, la ferribactine, à travers la membrane interne. Ceci est pour l'instant une hypothèse qui doit être confirmée.

Pour la sécrétion de la pyoverdine à travers la membrane externe, peu de données sont disponibles et toutes restent à l'état d'hypothèses. Deux pompes d'efflux tripartites putatives ont été proposées successivement.

En 1993, l'équipe de K. Poole a proposé que le système d'efflux de type RND MexAB-OprM soit impliqué dans la sécrétion de la pyoverdine. En effet, l'opéron codant ces gènes est inductible en condition de limitation en fer chez *P. aeruginosa* et *E. coli*, tandis que des mutants de cette pompe étaient incapables de pousser dans un milieu minimum déficient en fer et contenant du dipyridyl, un chélateur chimique du fer, ce

qui suggérerait un rôle possible de cette pompe dans la sécrétion de la pyoverdine (Poole et al., 1993a). Le rôle de ce système dans la sécrétion de la pyoverdine n'a pas été plus investi ou, du moins, aucune preuve formelle de son implication n'a pu être apportée.

Par ailleurs, dans le génome de *P. aeruginosa*, l'opéron *PA2389-91* situé dans le cluster de gènes dédié aux fonctions de la pyoverdine est prédit coder pour un appareil d'efflux tripartite de type transporteur ABC. Le gène *PA2390* coderait pour la protéine de membrane interne, une perméase avec 4 segments transmembranaires prédits et possédant les motifs de la fonction ATPase. La protéine de membrane externe, nommée OpmQ, serait codée par le gène *PA2391*. Enfin, la protéine *PA2389* constituerait la protéine de fusion périplasmique, dont le rôle serait de faire la communication entre les protéines de membrane interne et externe.

L'expression de ces gènes *PA2389-91* corrèle avec celle des gènes de la synthèse de la pyoverdine, puisque, comme la plupart des gènes impliqués dans le système pyoverdine, l'opéron *PA2389-91* possède une boîte IS et est directement régulé par le facteur sigma PvdS (Ochsner et al., 2002b).

Cependant, ces protéines n'ont jamais vraiment été étudiées en tant que système de sécrétion de la pyoverdine car les mutations de ces gènes n'empêchent pas la sécrétion de la pyoverdine. En l'absence de ces gènes, le phénotype décrit indique un taux de pyoverdine dans le milieu extracellulaire réduit d'environ 50% par rapport à une souche sauvage (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b). Ces données pourraient indiquer que soit ce système n'est pas responsable de la sécrétion de la pyoverdine, soit, alternativement, que, en son absence, un des nombreux autres systèmes d'efflux de type RND prédits dans *P. aeruginosa* PAO1 est capable de sécréter de la pyoverdine.

## **B. L'export des autres sidérophores bactériens**

D'une manière générale, peu d'éléments sont disponibles concernant la sécrétion des sidérophores, y compris chez *E. coli* (Grass, 2006). Un petit nombre de système de sécrétion de sidérophores ont été décrits, principalement chez les Gram-négatifs. On retrouve des transporteurs appartenant aux superfamilles MFS et ABC.

Cependant, à l'exception de l'entérobactine chez *E. coli*, seuls les composants de transport de la membrane interne ont été identifiés dans ces systèmes.

Il n'est pas exclu que ces transporteurs agissent en complexe avec un facteur de membrane externe et une protéine de fusion membranaire permettant une sécrétion directe du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Pour l'instant, ces partenaires potentiels n'ont pas été identifiés.

## 1. Sidérophores sécrétés par une pompe MFS

La plupart des exporteurs de membrane interne impliqués ou suggérés être impliqués dans la sécrétion de sidérophores appartiennent à la superfamille des pompes MFS. Dans tous les cas, à une exception près, l'expression de ces transporteurs MFS est régulée par la protéine Fur.

Chez *E. coli*, la sécrétion de l'entérobactine à travers la membrane interne est médiée principalement (mais pas exclusivement) par la protéine EntS (Furrer et al., 2002). Le gène *entS*, localisé dans le cluster de gènes *ent-fep* Fur-régulé, code pour une protéine de membrane à 12 segments transmembranaires du type des pompes d'efflux MFS. La mutation du gène *entS* montre une sécrétion significativement réduite d'entérobactine et une augmentation de produits de dégradation de ce sidérophore. Ce phénomène serait dû à une hydrolyse intracellulaire catalysée par Fes (pour Ferric enterobactine Esterase), la protéine normalement responsable de l'hydrolyse de la ferrienterobactine, puis à la diffusion consécutive et/ou au relargage des produits de dégradation par d'autres systèmes d'exports cytoplasmiques.

Pour la sécrétion dans le milieu extracellulaire, la protéine canal de membrane externe TolC a été montré être exclusivement responsable du relargage de l'entérobactine à travers la membrane externe (Bleuel et al., 2005).

De la même manière, plusieurs pompes d'efflux MFS possédant 12 segments membranaires sont impliquées dans l'export de sidérophores dans d'autres bactéries.

C'est le cas de la légiobactine, un sidérophore de structure encore inconnue produit par *Legionella pneumophila* (Allard et al., 2006), de l'achromobactine chez *Erwinia chrysanthemi* (Franza et al., 2005), de l'alcaligine, un sidérophore produit par *Bordetella pertussis* et *Bordetella bronchiseptica* (Brickman and Armstrong, 2005), de la protochéline d'*Azotobacter vinelandii* (Page et al., 2003) et de la vibrioferrine de *Vibrio parahaemolyticus* (Tanabe et al., 2006). L'alignement de plusieurs de ces protéines MFS identifiées montre une identité de séquence protéique basse, inférieure à 20 % (Miethke and Marahiel, 2007). Seul un motif consensus a été retrouvé entre les segments transmembranaires 2 et 3, très similaire au motif consensus majeur décrit pour les MFS dans cette région (Pao et al., 1998).

Enfin, un gène prédit coder une protéine putative de 45 kDa avec des similarités significatives à EntS a été identifié dans une région chromosomique de *Acinetobacter baumannii* arborant des gènes apparentés à la biosynthèse et au transport d'un sidérophore de type catécholate (Dorsey et al., 2003).

En général, la mutation des gènes identifiés n'entraîne pas d'abolition totale, mais seulement une diminution de la sécrétion du sidérophore.

Chez les Gram-positifs, un système de sécrétion de sidérophore de type MFS a également été identifié, le transporteur YmfE (Miethke et al., 2008). Il est impliqué dans l'export de la bacillibactine chez *Bacillus subtilis*. La mutation du gène *ymfE* affecte la sécrétion de bacillibactine et entraîne une forte augmentation de la sécrétion d'un précurseur de ce sidérophore. La sécrétion de la bacillibactine est Fur-indépendante. Cependant, un régulateur transcriptionnel de type Mer-R, Mta, est capable d'activer à la fois la sécrétion de bacillibactine et l'expression du gène *ymfE* (Miethke et al., 2008).

## **2. Sidérophores sécrétés par une perméase ABC**

Deux systèmes de sécrétion de sidérophores par des perméases de membrane interne de type ABC ont également été retrouvés.

Chez *Mycobacterium Smegmatis*, une bactérie Gram positif, le transporteur ABC ExiT est responsable de l'efflux de l'exochéline (Zhu et al., 1998).

Un deuxième système de transport de type ABC a été également trouvé chez *Salmonella enterica*, le transporteur IroC. Cette perméase est responsable de l'export de la salmochéline, mais aussi, secondairement, de l'entérobactine (EntS serait le principal) (Crouch et al., 2008). La salmochéline est un sidérophore de structure basée sur celle de l'entérobactine, modifiée par l'addition de deux carbones glucosylés (Hantke et al., 2003).

## **C. Les différents systèmes d'efflux bactériens**

Tous les organismes vivants possèdent des systèmes d'efflux actifs, qui participent aux équilibres cellulaires et notamment aux processus de détoxification des différents composés xénobiotiques.

Chez les bactéries à Gram-négatif, les pompes d'efflux peuvent être spécifiques à un substrat ou au contraire peuvent expulser une gamme étendue de composés structurellement et chimiquement dissimilaires (par exemple des antibiotiques de différentes classes chimiques). Cette dernière catégorie de pompes, appelée MDR (Multi-Drug Résistance), est bien connue pour conférer à la cellule une susceptibilité moindre aux antibiotiques par exportation active de ces molécules toxiques à sa survie (Nikaido,

2009). Les gènes codant les pompes d'efflux sont localisés soit sur le chromosome, soit sur des éléments génétiques transmissibles.

Les pompes d'efflux sont localisées dans la membrane interne et peuvent consister en un seul composant ou en l'association de plusieurs composants, sous forme d'un complexe protéique tripartite, présent uniquement chez les Gram-négatifs. Ces transporteurs ont été classifiés en 5 superfamilles, en se basant sur des critères d'homologie de séquence et de caractéristiques mécanistiques et supramoléculaires de la protéine de membrane interne (pour revue (Borges-Walmsley et al., 2003)).

- MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion),
- SMR (Small Multi-drug Resistance),
- RND (Resistance-Nodulation-Division),
- MFS (Major Facilitator Superfamily),
- ABC (ATP-Binding Cassette).

Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (famille ABC) ou par un mécanisme d'antiport d'ions qui contribue à l'état énergétique de la membrane, par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE).

Dans les systèmes des familles SMR et MATE, la drogue est exportée dans le périplasma puis traverse la membrane externe via des porines.

Les pompes à efflux de type MFS, ABC et RND peuvent se configurer en systèmes tripartites et sont alors constituées :

- d'un transporteur de membrane interne (ou protéine d'efflux),
- d'un facteur de membrane externe (ou protéine canal),
- d'une protéine accessoire (ou protéine de fusion membranaire) périplasmique, qui va jouer le rôle d'adaptateur et permettre la coopération entre les protéines de membrane externe et interne.

L'ensemble de ces trois protéines forme des gros assemblages à multi-composants, qui traversent à la fois les membranes externe et interne des bactéries à Gram-négatif et travaillent de façon coordonnée (Zgurskaya, 2009).

Une fois associés, les complexes tripartites formés sont stables, comme cela a été démontré par cross-linking et fractionnement différentiel des membranes pour la pompe AcrA-AcrB-TolC chez *E. coli* (Tikhonova and Zgurskaya, 2004; Touze et al., 2004). Dans ces pompes tripartites, tous les composants sont absolument essentiels au transport, bien que ce soit le composant de membrane interne qui détermine la spécificité du substrat et l'exporte activement (Zgurskaya et al., 2003).

## **1. Les transporteurs de membrane interne**

Les transporteurs de membrane interne qui peuvent s'associer en complexes protéiques tripartites sont structurellement et fonctionnellement très divers. Ils peuvent appartenir à une des trois superfamilles de protéines RND, MFS et ABC.

Les transporteurs ABC fonctionnent par l'hydrolyse d'ATP, tandis que les substrats des pompes d'efflux RND et MFS sont couplés avec le transport de protons. Les transporteurs MFS sont fonctionnels comme monomères, tandis que les transporteurs ABC et RND sont des dimères et des trimères, respectivement. Les topologies transmembranaires de ces transporteurs diffèrent aussi de façon significative.

### **a) Pompes MFS (Major Facilitator Superfamily)**

Les pompes MFS appartiennent à une grande et diverse superfamille de transporteurs, capables de transporter une large gamme de substrats (Saier et al., 1999). Les transporteurs MFS sont classés en 17 familles, chacune reconnaissant et transportant une classe distincte de composés structurellement reliés. La plupart de ces familles sont substrat spécifique, tandis que 6 familles contiennent des transporteurs MDR.

Les membres de la superfamille MFS sont des transporteurs secondaires qui utilisent des mécanismes d'uniport, de symport (proton ou sodium) ou d'antiport (soluté/proton ou soluté/soluté) (Saier et al., 1999).

Les transporteurs MFS possèdent généralement une topologie uniforme de 12  $\alpha$ -hélices transmembranaires, connectées par des boucles hydrophiles, avec leurs extrémités N et C terminales situées dans le cytoplasme. Cependant, certaines familles possèdent 6, 14 ou 24 segments transmembranaires (Law et al., 2008).

Malgré le peu de similarité de séquence primaire entre les différentes familles, les premières données structurales suggèrent que les protéines MFS pourraient avoir des structures semblables avec 8 des 12 segments transmembranaires rassemblés pour former un pore (Abramson et al., 2003; Hirai et al., 2002; Lemieux et al., 2005; Yin et al., 2006).

### **b) Pompes ABC (ATP-binding Cassette)**

Les transporteurs ABC (de l'anglais, **ATP Binding Cassette** pour cassette de liaison à l'ATP) appartiennent à une large famille de protéines qui permettent d'importer

ou d'exporter un grand nombre de molécules telles que des acides aminés, des ions, des sucres, des lipides et des drogues.

Les transporteurs ABC sont caractérisés par une structure cœur de 4 domaines ou sous-unités protéiques : deux domaines transmembranaires qui forment la perméase et deux domaines de liaison à l'ATP (ou domaines ABC) (Jones and George, 2004).

Les deux domaines transmembranaires possèdent un nombre variable d'hélices transmembranaires hydrophobes insérées dans la membrane cytoplasmique et forment le canal transmembranaire. Ces domaines contiennent aussi le site de liaison au substrat composé de résidus polaires et chargés. Les exporteurs et les importeurs diffèrent principalement par le nombre de segments transmembranaires. Les ABC exporteurs possèdent un cœur conservé de 12 hélices transmembranaires, tandis que les ABC importeurs contiennent entre 10 et 20 hélices, dépendant de la masse et de la nature chimique du substrat transporté.

Les deux domaines cytoplasmiques ATPases fixent et hydrolysent l'ATP en ADP, procurant l'énergie nécessaire à la translocation du substrat à travers la perméase. Les domaines ATPases agissent comme des moteurs moléculaires qui transforment l'énergie potentielle chimique de l'ATP en changements conformationnels protéiques, permettant un pompage unidirectionnel du substrat à travers la membrane (figure 26) (Davidson and Chen, 2004).

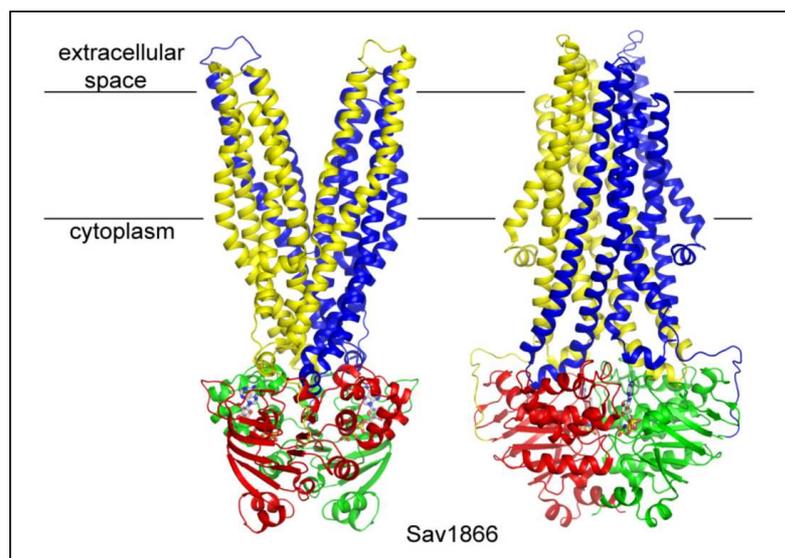


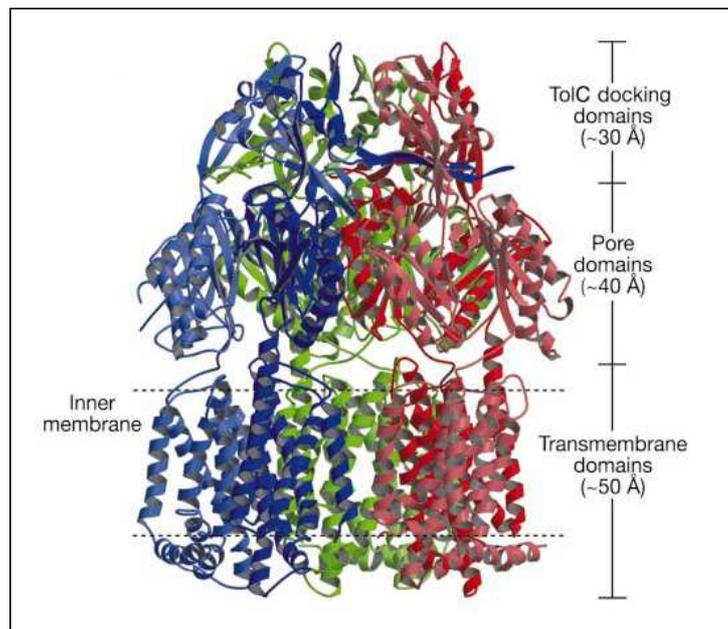
Figure 26 : Structure de l'exporteur ABC Sav1866 de *S.aureus* (Dawson and Locher, 2006). Une sous-unité est colorée en bleu (segments transmembranaires) et vert (domaine ATPase) et l'autre sous-unité est colorée en jaune et rouge (tiré de (Oldham et al., 2008))

Malgré la grande diversité de substrats transportés, les séquences des composants ABC sont remarquablement conservées à travers tous les ABC transporteurs. Trois motifs peptidiques consensus principaux sont retrouvés : les motifs Walker A (ou 'P loop') riche en glycine et Walker B hydrophobe, tous deux hautement conservés pour la liaison au nucléotide, et le motif « LSGGQ », la séquence signature caractéristique des protéines ABC (Schneider and Hunke, 1998). Ces régions sont essentielles pour le transport et l'activité ATPase (Shyamala et al., 1991).

### **c) Pompes RND (Resistance, Nodulation and cell division)**

Les pompes de la famille RND catalysent l'efflux de substrat via un mécanisme antiport à proton en utilisant le gradient électrochimique de la force proton motrice, dans lequel le mouvement des ions hydrogènes conduit le transport du substrat (Zgurskaya and Nikaido, 1999).

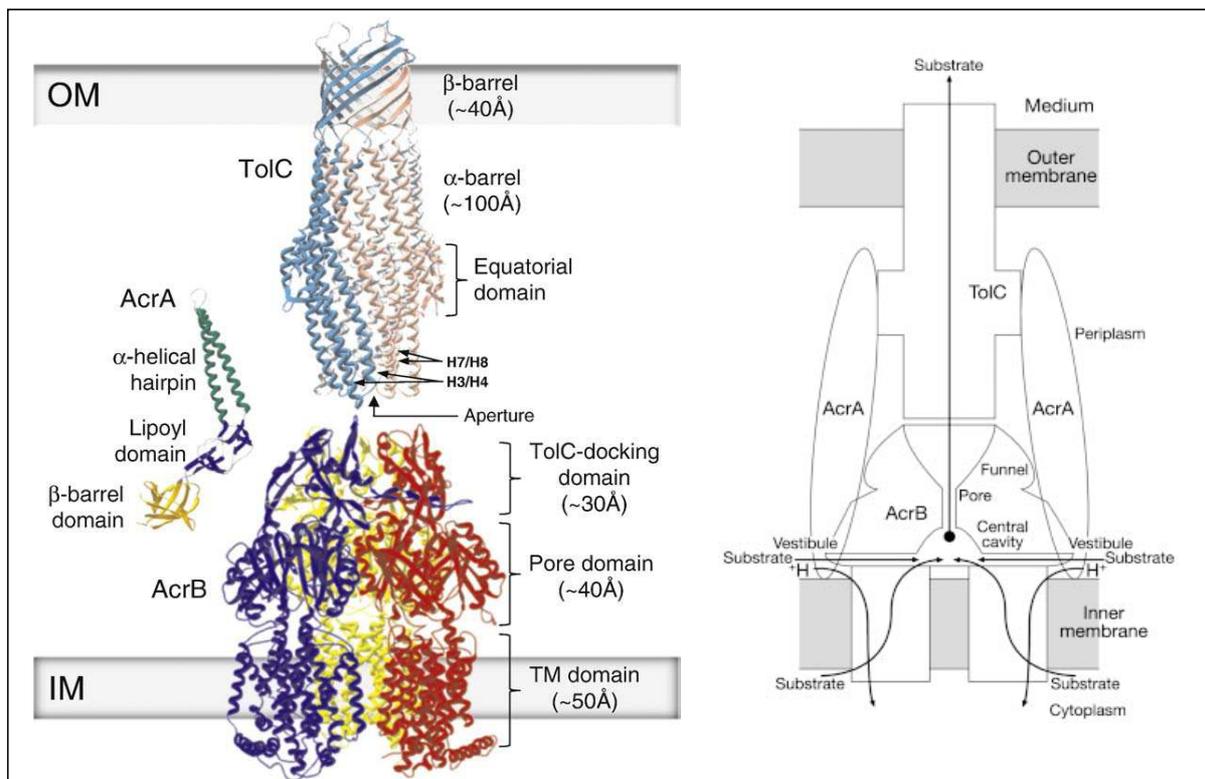
Ces transporteurs exportent une large gamme de substrats, incluant antibiotiques, colorants, détergents, inhibiteurs, désinfectants, métaux lourds, solvants organiques et homosérines lactones impliquées dans le quorum sensing (Blair and Piddock, 2009; Poole, 2001a). Ils interviennent en particulier dans les mécanismes de résistance des bactéries Gram-négatives (Poole, 2001b).



**Figure 27** : Structure de AcrB. Les trois protomères sont colorés en rouge, vert et bleu (tiré de (Murakami et al., 2002)).

Les structures des protéines MexB de *P. aeruginosa* et AcrB de *E.coli* (transporteurs à efflux de la membrane interne appartenant aux systèmes d'efflux tripartites MexAB-OprM et AcrAB-TolC respectivement) ont été résolues (Murakami et al., 2002; Sennhauser et al., 2009). Ces pompes se présentent sous la forme d'un trimère, avec un domaine périplasmique de 70 Å de long et un domaine transmembranaire de 50 Å de long (figure 27). Du point de vue topologique, chaque monomère possède trois séries de segments transmembranaires ancrés dans la membrane interne et deux grandes boucles extracytoplasmiques.

Les structures de la protéine AcrB en présence de ligands variés ont aussi été résolues. Les analyses structurales de l'interaction transporteur ligand démontrent la présence de sites de liaison au substrat composites localisés à l'intérieur de AcrB, dont la cavité interne est hautement flexible (Sennhauser et al., 2009). Ceci indique que les pompes à efflux peuvent s'adapter pour transporter une large gamme de substrats, démontrant un transport non-spécifique des drogues (Yu et al., 2003a; Yu et al., 2003b). Ces structures montrent également la présence de vestibules situés au niveau du domaine pore qui permettraient au substrat situé dans le périplasma d'accéder à la cavité interne (Murakami et al., 2002) (figure 28).



**Figure 28** : Modèle du complexe AcrAB-TolC et mécanisme schématique de l'export de drogues multiples médié par ce système (tiré de (Murakami et al., 2002))

## 2. Protéine de membrane externe – Composants de type TolC

Les protéines de la famille de TolC sont centrales pour l'export de nombreuses grosses protéines, utiles à la survie bactérienne dans les hôtes mammifères, mais aussi pour l'efflux d'une pléthore de petites molécules nocives qui sont inhibitrices pour la bactérie (Paulsen et al., 1997). TolC a été la première protéine de membrane externe de ce type dont la structure a été résolue et représente la protéine type de cette famille de protéine (Koronakis et al., 2000). Depuis, la structure de OprM a aussi été résolue (Akama et al., 2004a). Les canaux de membrane externe de ces pompes sont structurellement conservés (pour revue (Koronakis et al., 2004)). Ces protéines possèdent une structure homotrimérique stable et forment un tonneau  $\alpha/\beta$  à 12 brins (figure 29). Chacun des 3 monomères contribue à 4 brins  $\beta$  antiparallèles et 4 brins  $\alpha$ -hélice antiparallèles (2 longues hélices continues et 2 paires de courtes hélices) pour former les domaines canal et tunnel, respectivement.

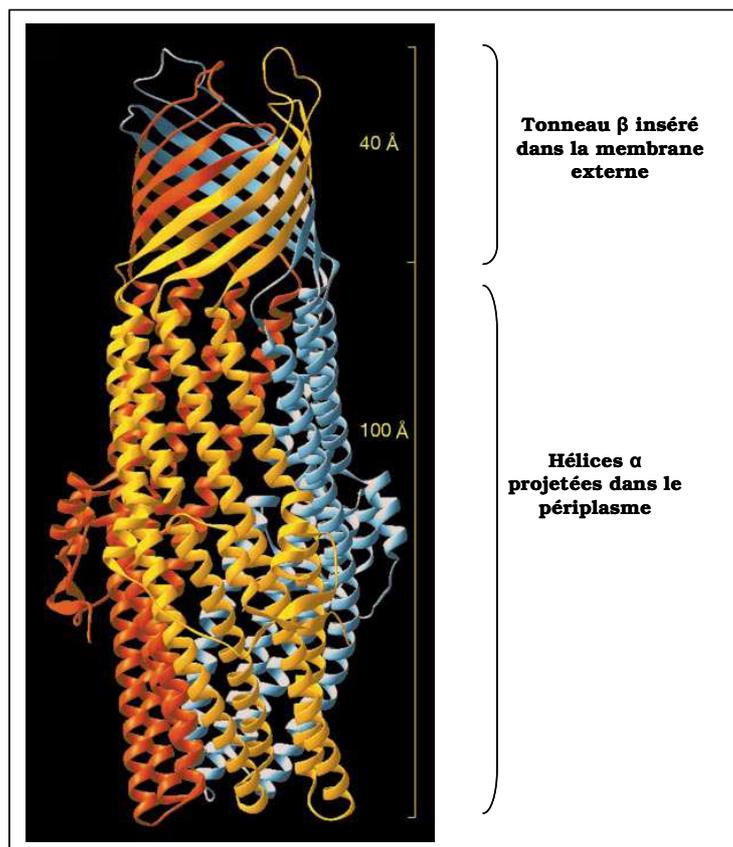


Figure 29 : Structure de TolC (d'après (Koronakis et al., 2000))

La protéine est emboîtée dans la membrane externe par le tonneau  $\beta$  de 40 Å de long et se projette à travers l'espace périplasmique par le tonneau à hélices  $\alpha$  sur 100 Å.

Ensemble, ces domaines de 140 Å de long au total forment un seul pore, constitutivement ouvert à son extrémité distale vers le milieu extracellulaire (pas de boucles structurées qui compriment le tonneau  $\beta$ , pas de bouchon), mais fermé à son entrée périplasmique. Le passage vers l'état transitoire ouvert est amené par un mécanisme semblable à l'iris dans lequel l'entrée des  $\alpha$ -hélices subit un réalignement en se déroulant, probablement stabilisé par l'interaction avec les hélices périplasmiques du transporteur de membrane interne.

Les protéines de membrane externe ont la particularité de pouvoir interagir avec différentes pompes associées à leur protéine de fusion (par exemple, TolC avec AcrAB et MacAB chez *E.Coli* ou OprM avec MexAB et MexXY chez *P. aeruginosa*). Les cinétiques de recrutement de TolC seront alors variables (Tikhonova et al., 2009).

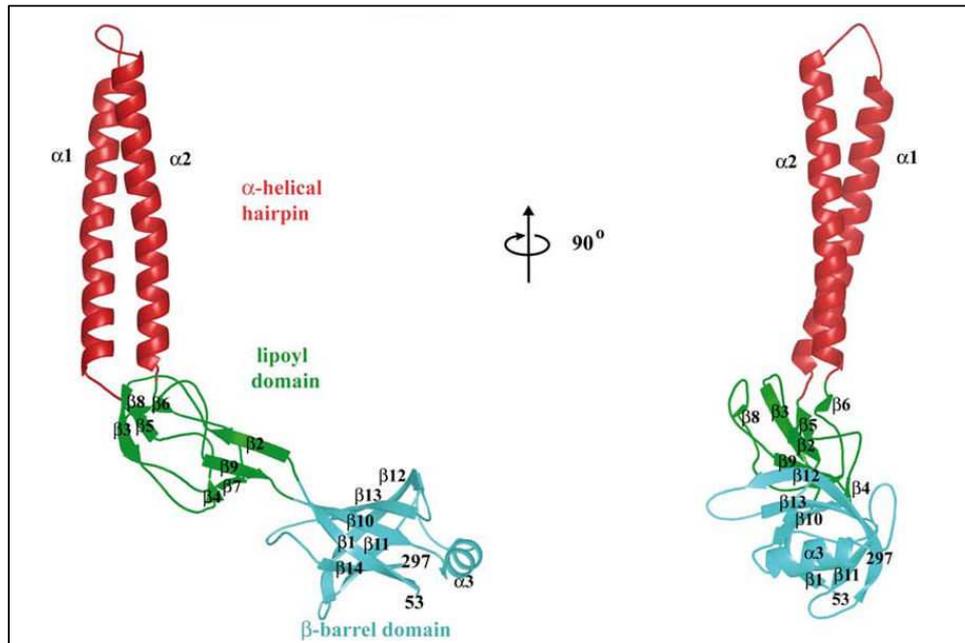
### **3. Composant périplasmique – protéine de fusion (MFP pour Membrane Fusion Protéine)**

Les protéines de fusion membranaires (MFP) périplasmiques permettent l'adéquation structurale et fonctionnelle entre les divers transporteurs de membrane interne de type RND, ABC et MFS et les canaux de membrane externe (Zgurskaya et al., 2009).

Les structures de plusieurs composants périplasmiques de pompe d'efflux bactériennes, MexA de *P. aeruginosa* (MexAB-OprM type RND) ainsi que AcrA et MacA de *E.coli* (AcrAB-TolC type RND et MacAB-TolC type ABC), ont été résolues et montrent de fortes similarités (Akama et al., 2004b; Higgins et al., 2004; Mikolosko et al., 2006; Yum et al., 2009). Les structures de ces adaptateurs contiennent une courte région hydrophile N-terminale suivie par un segment hydrophobe qui sert soit de peptide signal clivable, soit comme hélice alpha transmembranaire. *In vivo*, ces protéines sont ancrées à la membrane interne via une hélice transmembranaire ou via une tête lipidique N terminale, le reste de la protéine étant dans le périplasme.

La portion périplasmique de MFPs est une molécule allongée, en forme de faucille comprenant trois sous-domaines arrangés linéairement (figure 30):

- un domaine tonneau  $\beta$  à six brins,
- un domaine lipoyl localisé au centre,
- une épingle  $\alpha$ -hélice de 47 Å de long à l'autre extrémité de la molécule.



**Figure 30** : Représentation en ruban d'un monomère de AcrA. Le domaine hélice  $\alpha$  en épingle est en rouge, le domaine lipoyl en vert et le domaine tonneau  $\beta$  en bleu (d'après (Mikolosko et al., 2006)).

Ces protéines sont oligomériques. La structure de MacA présente des orientations de ces domaines différentes de celles des structures de AcrA et MexA (Yum et al., 2009). MacA possède un arrangement hexamérique en anneau, tandis que MexA forme un assemblage hélicoïdal inhabituel avec les épingle des monomères voisins qui s'empaquètent face contre face pour former des arcs doubles et que AcrA montre des arrangements dimériques par des interactions parallèles et antiparallèles (Higgins et al., 2004; Mikolosko et al., 2006; Yum et al., 2009).

Le domaine tonneau  $\beta$  de la MFP communique probablement avec les transporteurs de membrane interne, alors que l'épingle  $\alpha$ -hélice établit le contact avec le canal de membrane externe (Elkins and Nikaido, 2003; Krishnamoorthy et al., 2008; Lobedanz et al., 2007; Yum et al., 2009). Le rôle de la protéine adaptatrice dans le processus d'efflux est encore mal compris. Une hypothèse suggère que cette protéine transmet l'énergie du transporteur de membrane interne au canal externe.

Le mécanisme d'assemblage et d'architecture des pompes d'efflux multi-drogues reste peu clair. Un modèle d'assemblage de la pompe AcrAB-TolC a été récemment proposé à partir des différentes données structurales et fonctionnelles disponibles (Symmons et al., 2009).

# **Deuxième partie**

Résultats

## Présentation des résultats

Les résultats obtenus exposés dans la suite du manuscrit concernent les dernières étapes de la biosynthèse de la pyoverdine et son export subséquent. Ils sont présentés en deux chapitres distincts.

Le premier chapitre porte sur les étapes de maturation tardive de la pyoverdine, qui font suite à la synthèse cytoplasmique d'un précurseur. Pour ce travail, il a été nécessaire au préalable de mettre au point la technique de microscopie de fluorescence sur les cellules *in vivo*. Ce travail a donné lieu à une publication (Article 1), insérée dans le chapitre.

Le deuxième chapitre détaille les premières données obtenues sur la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ. Nous montrons que cette pompe est responsable du recyclage de la pyoverdine (Article2) et de la sécrétion de la pyoverdine (Article3, soumis) vers le milieu extracellulaire.

---

## Etapes tardives de la biosynthèse de la pyoverdine

---

### 1.1 Introduction à l'article 1

La pyoverdine est un sidérophore bactérien relativement complexe, de part sa taille et sa structure peptidique composée d'un chromophore relié à un octapeptide cyclique. Son processus de biosynthèse requiert de nombreuses étapes de synthèse, de modification d'acides aminés et de maturation. Tandis que les étapes et les enzymes d'assemblage du squelette peptidique de cette molécule ont été étudiées et comprises dans leur ensemble, la suite du processus de biosynthèse, et notamment les étapes de maturation tardives, reste relativement obscur.

Mon premier objectif durant cette thèse a été d'utiliser les propriétés de fluorescence de la pyoverdine pour identifier le compartiment cellulaire, cytoplasme et périplasme, où avait lieu la formation du chromophore. En effet, la pyoverdine n'est fluorescente que si son chromophore est présent (voir propriétés de la fluorescence de la pyoverdine ci-dessous). Une étude précédente a permis d'isoler et de caractériser un intermédiaire de synthèse cytoplasmique, la ferribactine (Baysse et al., 2002; Hohlneicher et al., 2001). La ferribactine est un précurseur de pyoverdine dans lequel, au lieu du groupement chromophore dihydroxyquinoline, est retrouvé le tripeptide  $\gamma$ -L-Glu-D-Tyr-L-Dab directement issu de la synthèse par les NRPS du squelette carboné (Hohlneicher et al., 2001). De fait, ce précurseur cytoplasmique n'est donc pas fluorescent. La maturation du chromophore de la ferribactine requiert une série de réaction d'oxydoréduction et la ferribactine peut être convertie en pyoverdine chimiquement *in vitro* par l'addition d'un oxydant (Dorrestein et al., 2003; Jones et al., 2009).

Nous avons donc également essayé de mieux comprendre, au niveau biologique, les différentes étapes de maturation de la pyoverdine et d'identifier les enzymes impliquées *in vivo*. Les gènes *pvdN*, *pvdO*, *pvdP* et *pvdQ* sont situés dans le locus « pvd » et sont essentiels à la synthèse de la pyoverdine (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b). Cependant, la fonction et le rôle exact des protéines codées par ces gènes dans la synthèse de la pyoverdine restent inconnus. Ces 4 protéines sont prédites, d'après leur séquence, être localisées dans le périplasme (Lewenza et al., 2005; Ravel and Cornelis, 2003). Cette prédiction a été confirmée expérimentalement pour PvdN, qui

possède un signal d'export de type TAT, et pour PvdO, par analyse protéomique du périplasme (Imperi et al., 2009; Voulhoux et al., 2006). L'implication de ces enzymes dans la maturation de la pyoverdine a donc été étudiée.

## 1.2 Propriétés spectrales de la pyoverdine

La pyoverdine, grâce à la présence de son chromophore, est une molécule fluorescente avec un maximum d'absorbance à 380 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 450 nm (figure 31).

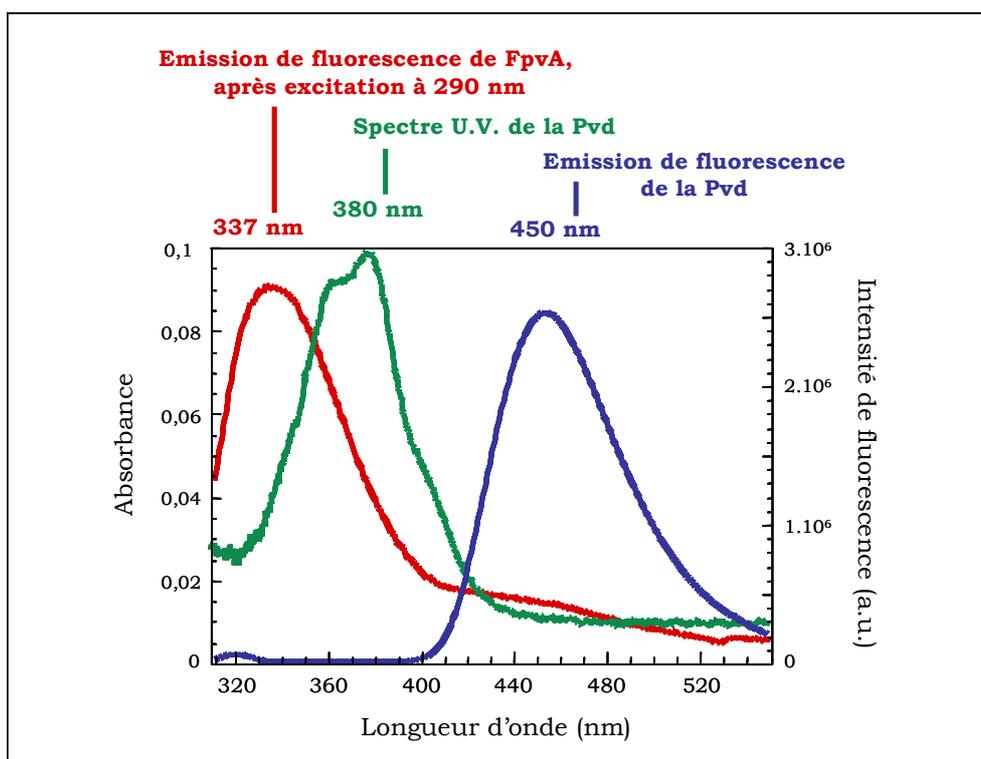


Figure 31 : Spectres d'absorption U.V. (en vert) et d'émission de fluorescence (en bleu) de la pyoverdine libre. Spectre d'émission de fluorescence du récepteur FpvA (rouge). Le recouvrement spectral entre l'émission des tryptophanes du récepteur FpvA et le spectre d'absorption de la pyoverdine permet de faire du FRET entre ces deux partenaires.

La fluorescence naturelle de la pyoverdine a été très utilisée dans le laboratoire pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport de la ferripyoverdine.

Lorsque la pyoverdine chélate du fer, la fluorescence du chromophore est éteinte par le métal (figure 32). La présence ou l'absence de fluorescence de la pyoverdine va ainsi refléter sa forme non chargée ou chargée en fer respectivement. Par spectrométrie de fluorescence, il est ainsi possible de suivre *in vivo* et en temps réel les cinétiques de

dissociation du fer de la pyoverdine ou encore le recyclage de la pyoverdine dans le milieu extracellulaire après dissociation du métal.

Par ailleurs, la pyoverdine possède les propriétés spectrales idéales pour faire du FRET (de l'anglais Fluorescence Resonance Energie Transfert) avec les tryptophanes des protéines (figure 31) (Schalk et al., 1999). Ceci a permis de suivre *in vivo* et en temps réel les interactions entre la pyoverdine et son récepteur de la membrane externe FpvA.

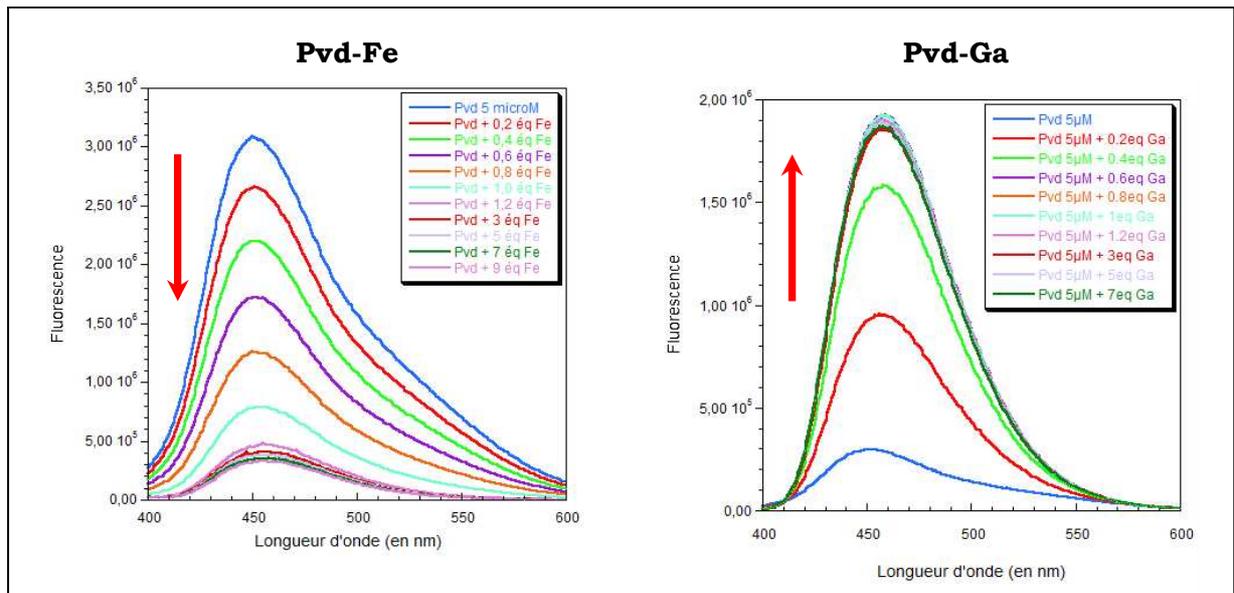


Figure 32 : Spectres d'émission de fluorescence de la pyoverdine chélatant du fer ou du gallium en quantité croissante. Lorsque la pyoverdine est complexée au fer, la fluorescence (symbolisée par la flèche rouge) est éteinte, tandis que lorsque la pyoverdine chélate du gallium, sa fluorescence est largement augmentée.

Outre le fer, la pyoverdine a la capacité de chélater différents métaux trivalents, comme l'aluminium ou le gallium. Les propriétés de fluorescence de la pyoverdine varient en fonction du métal avec lequel elle interagit (figure 32). Dans le cas du  $\text{Ga}^{3+}$ , qui nous intéresse par la suite, la fluorescence du complexe formé avec la pyoverdine va être augmentée d'un facteur quatre environ par rapport à l'apo-pyoverdine (Folschweiller et al., 2002).

### 1.3 Technique de microscopie de fluorescence

A mon arrivée au laboratoire, l'un des nouveaux projets qui m'ont été confiés a été de mettre en place la technique de microscopie de fluorescence pour étudier la voie

pyoverdine, *in vivo*, chez *P. aeruginosa* en utilisant les propriétés de fluorescence de ce sidérophore.

Le protocole utilisé consiste en la fixation des cellules sur une fine couche d'agarose 1% déposé sur la lame de microscopie (Mascarenhas et al., 2002). Cette couche est indispensable pour observer les cellules *in vivo*, puisqu'elle permet l'immobilisation des bactéries sur la lame. Cependant, cette couche présente deux défauts majeurs :

- l'agarose entraîne une légère auto-fluorescence,
- il est très difficile, voir impossible, d'obtenir la même épaisseur d'agarose sur toute la surface de la lame, ce qui génère des différences de plan plus ou moins importantes sur une même image.

Par ailleurs, la pyoverdine n'est que faiblement fluorescente et nécessite une excitation avec une énergie relativement forte pour une observation convenable en microscopie de fluorescence, ce qui entraîne une extinction rapide de la fluorescence de l'échantillon. Plusieurs essais avec des agents anti-blanchiment n'ont pas permis de protéger le fluorophore et d'augmenter le temps d'exposition. Au contraire, ces produits absorbaient la fluorescence de la pyoverdine et éteignaient complètement le signal.

Le filtre optimal utilisé, après essai des filtres disponibles dans la gamme de longueur d'onde du fluorophore, est le cube CFP (de l'anglais Cyan Fluorescent Protéine) (excitation 440 nm, émission 480 nm).

*P. aeruginosa* est une bactérie de très petite taille (2µm de longueur environ). Pour obtenir des images avec une définition acceptable, le microscope a été adapté d'une lentille supplémentaire placée devant l'oculaire, permettant un grossissement total de 1600 fois (capacités de grossissement : caméra 1,6 fois, lentille 10 fois, objectif 100 fois).

Cette technique, entièrement nouvelle au laboratoire et avec le fluorophore utilisé, a également nécessité de nombreuses mises au point dans le traitement de l'image : mise au point du bruit de fond des images, mise en parallèle de l'image à fond clair apposée à l'image de fluorescence et traitement informatique de l'image avec le logiciel Image J.

## **1.4 Résumé de l'article 1**

Cet article repose sur la mise en évidence, dans la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa*, d'un anneau de fluorescence au niveau de l'enveloppe de la bactérie, correspondant à une accumulation physiologique de pyoverdine dans le compartiment périplasmique, en contraste avec une absence de fluorescence due à ce sidérophore

dans le cytoplasme. Cette observation majeure a pu être faite grâce à la mise en place de la technique de microscopie de fluorescence sur des cellules *in vivo* en utilisant la pyoverdine comme fluorophore naturel, puis a été confirmée par fractionnement cellulaire et mesure de la fluorescence dans les fractions périplasmiques et cytoplasmiques isolées. La fluorescence présente dans le périplasma est bien due à de la pyoverdine, puisque tout mutant incapable de produire ce sidérophore ne présente pas de fluorescence périplasmique.

Ces différentes observations suggèrent que la cyclisation du chromophore de la pyoverdine pourrait avoir lieu dans le périplasma. L'apparition de fluorescence correspond à l'apparition de la formation du chromophore, puisque tant que le chromophore n'est pas cyclisé, le précurseur de la pyoverdine ne peut pas être fluorescent. En utilisant cette propriété, nous avons également montré qu'une mutation du transporteur ABC PvdE entraînait une absence de sécrétion de pyoverdine dans le milieu extracellulaire, mais aussi une absence de fluorescence correspondant à de la pyoverdine dans le périplasma et dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent une implication majeure de PvdE dans la biosynthèse du sidérophore pyoverdine. Comme la mutation de ce transporteur n'entraîne aucune apparition de fluorescence dans le cytoplasme de la bactérie, on peut supposer que PvdE transporte un précurseur de la pyoverdine n'ayant pas de chromophore formé, probablement la ferribactine, et que la cyclisation du chromophore se déroule dans le compartiment périplasmique.

Enfin, les mutants des gènes *PvdN*, *PvdO*, *PvdP* et *PvdQ* présentent tous un défaut de production qualitatif et/ou quantitatif de pyoverdine. Plus précisément, lorsqu'il manque les enzymes périplasmiques PvdN, PvdO ou PvdP, il n'y a plus de fluorescence dans le périplasma, ni de sécrétion de pyoverdine dans le milieu extracellulaire, ce qui prouve l'implication de ces enzymes dans la maturation de la pyoverdine à un stade précédent la cyclisation du chromophore ou dans la cyclisation elle-même. Lorsque *pvdQ* est muté, seule une forme fluorescente, mais différente de la pyoverdine mature, est produite. Cela signifie que le chromophore est, au moins en partie, cyclisé, suggérant que PvdQ a un rôle dans la maturation de la pyoverdine en aval de la cyclisation du chromophore.

## **1.5 Article 1**



# Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation

Emilie Yeterian · Lois W. Martin · Laurent Guillon ·  
Laure Journet · Iain L. Lamont · Isabelle J. Schalk

Received: 9 August 2009 / Accepted: 15 September 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Pyoverdines, the main siderophores produced by fluorescent *Pseudomonads*, comprise a fluorescent dihydroxyquinoline chromophore attached to a strain-specific peptide. These molecules are thought to be synthesized as non-fluorescent precursor peptides that are then modified to give functional pyoverdines. Using the fluorescent properties of PVDI, the pyoverdine produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, we were able to show that PVDI was not present in the cytoplasm of the bacteria, but large amounts of a fluorescent PVDI precursor PVDIp were stored in the periplasm. Like PVDI, PVDIp is able to transport iron into *P. aeruginosa* cells. Mutation of genes encoding the periplasmic PvdN, PvdO and PvdP proteins prevented accumulation of PVDIp in the periplasm and secretion of PVDI into the growth medium, indicating that these three enzymes are involved in PVDI synthesis. Mutation of the gene encoding PvdQ resulted in the presence of fluorescent PVDI precursor in the periplasm and secretion of a functional fluorescent siderophore that had different isoelectric properties to PVDI, suggesting a role for PvdQ in the periplasmic maturation of PVDI. Mutation of the gene encoding the export ABC transporter PvdE prevented PVDI production and accumulation of PVDIp in the periplasm. These data are consistent with a model in which a PVDI precursor peptide is synthesized in the cytoplasm and exported to the periplasm by PvdE where

siderophore maturation, including formation of the chromophore moiety, occurs in a process involving the PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ proteins.

**Keywords** Siderophore biosynthesis · Pyoverdine · Iron uptake · Fluorescence · Fluorescent peptide · *Pseudomonas aeruginosa*

## Introduction

Iron is an essential element for almost all bacteria but under aerobic conditions at neutral pH, iron forms insoluble Fe(III) oxide hydrates and is therefore not readily available. To overcome this problem of iron accessibility many bacteria produce iron chelators called siderophores. These molecules solubilize ferric ions and transport these ions into bacterial cells via specific outer membrane transporters (Braun 2003; Schalk 2008). In Gram negative bacteria, this transport is driven by the proton motive force of the cytoplasmic membrane through a cytoplasmic membrane complex comprising three proteins, TonB, ExbB and ExbD (Postle and Kadner 2003; Koebnik 2005; Wiener 2005). Pyoverdines, a group of structurally related fluorescent siderophores, represent the primary iron uptake system in fluorescent *Pseudomonads*, although many species can also synthesize additional siderophores such as pyochelin and quinolobactin, or can acquire iron bound to a variety of exogenous chelators, including many heterologous siderophores (Cornelis and Matthijs 2002; Poole and McKay 2003; Schalk 2008).

More than 60 different pyoverdines have been identified (Meyer et al. 2008). All pyoverdines are comprised of three distinct structural parts (Abdallah and Pattus 2000; Budzikiewicz 2004), a dihydroxyquinoline chromophore

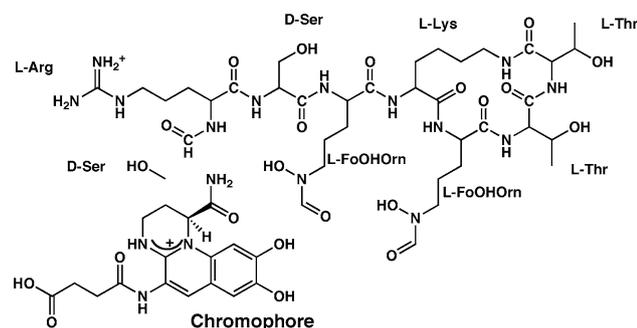
E. Yeterian · L. Guillon · L. Journet · I. J. Schalk (✉)  
Métaux et Microorganismes, Chimie, Biologie et Applications,  
FRE 3211, CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd  
Sébastien Brant, BP 10412, 67413 Strasbourg, Illkirch, France  
e-mail: isabelle.schalk@unistra.fr

L. W. Martin · I. L. Lamont  
Department of Biochemistry, University of Otago,  
PO Box 56, Dunedin, New Zealand

responsible for their fluorescence, a peptide chain comprising 6–12 amino acids (partially modified) bound to the carboxylic group of the chromophore and a small side chain bound at position C-3 of the chromophore. In most cases, this side chain is a diacid of the Krebs cycle such as succinic acid, malic or  $\alpha$ -ketoglutaric acid or one of their amide derivatives. The peptide part is unique to each strain and may be linear, or partially or entirely cyclic and its composition and length are specific to the producer strain (Abdallah and Pattus 2000; Budzikiewicz 2004). This peptidic part can have L- and D-amino acids, some of which are unusual, such as  $N^5$ -hydroxyornithine,  $N^5$ -formyl- $N^5$ -hydroxyornithine and hydroxyaspartate. The catechol group of the chromophore and the hydroxamate (occasionally  $\beta$ -hydroxy acid) groups of the peptide part provide a high-affinity binding site with association constants as high as  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  for ferric ion (Albrecht-Gary et al. 1994). Pyoverdines produced by *P. aeruginosa* can be of three types (PVDI, II and III) that are distinguished by different peptide chains (Meyer et al. 1997).

Iron uptake by pyoverdines is best understood in *P. aeruginosa* PAO1, which produces PVDI (Fig. 1) [for a review see (Schalk 2008)]. The ferric form of this siderophore is transported across the outer membrane by a specific receptor, FpvAI (Poole et al. 1993b; Cobessi et al. 2005; Schalk 2008). Iron is probably released from the siderophore in the periplasm by a mechanism thought to involve iron reduction, with recycling of the siderophore that can then transport another iron ion (Greenwald et al. 2007). FpvAI is also involved in a signaling cascade, with an anti-sigma factor FpvR and two sigma factors FpvI and PvdS regulating the expression of the genes involved in the iron uptake by this siderophore (*fpvA*), genes encoding the enzymes involved in the biosynthesis of PVDI and genes that encode virulence factors exotoxin A and PrpL protease [for a review see (Visca et al. 2002)].

Pyoverdine synthesis is also best understood for *P. aeruginosa* strain PAO1, although available evidence



**Fig. 1** Chemical structure of PVDI from *P. aeruginosa* PAO1. Standard three-letter codes are used for amino acids, except for *N*-formyl-*N*-hydroxyornithine (FoOHorn)

indicates that analogous biosynthetic pathways give rise to other PVDs in other strains and species [reviewed in (Visca et al. 2007)]. A precursor molecule is thought to be derived from amino acid precursors that are assembled by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), with other enzymes giving rise to the substrates for the NRPS enzymes and catalyzing additional reactions that complete the maturation of pyoverdines (Visca et al. 2007). The synthesis of the peptide precursor involves the PvdI, PvdJ, PvdL and PvdD NRPSs (Merriman et al. 1995; Lehoux et al. 2000; Mossialos et al. 2002; Ackerley et al. 2003; Lamont and Martin 2003; Ravel and Cornelis 2003; Visca 2004). The maturation of the chromophore, which is common to all pyoverdines, is likely to involve a series of oxido-reduction steps of a condensation product of D-tyrosine and L-2,4-diaminobutyrate that is part of the peptide precursor (Dorrestein et al. 2003). Consistent with this, PvdL that is proposed to incorporate D-tyrosine and L-2,4-diaminobutyrate into the precursor peptide is the only pyoverdine synthesis NRPS present in the genomes of all fluorescent *Pseudomonads* analyzed so far (Mossialos et al. 2002). Maturation of the chromophore was formerly thought to require the enzymes PvcA–D but it has now been shown that these enzymes are not required for chromophore maturation (Clarke-Pearson and Brady 2008) and the enzymes that carry out this process have not been identified. The PvdH enzyme, which is also common to different fluorescent *pseudomonads*, catalyzes the formation of L-2,4-diaminobutyrate that is thought to be required for chromophore synthesis from aspartate  $\beta$ -semialdehyde (Vandenende et al. 2004). Other pyoverdine synthesis enzymes that have been characterized include PvdA that encodes a membrane-associated ornithine hydrogenase (Visca et al. 1994; Ge and Seah 2006; Imperi et al. 2008), PvdF that encodes a hydroxyornithine-formylating enzyme (McMorran et al. 2001) and PvdYII that encodes a hydroxyornithine acetylase (Lamont et al. 2006). Other enzymes that are required for PVDI synthesis have been implicated through gene mutation studies (Ochsner et al. 2002a; Lamont and Martin 2003), but the precise roles of the corresponding enzymes have not been elucidated. Since some proteins of unknown function that are essential for PVDI synthesis are predicted to be periplasmic (PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ) (Ravel and Cornelis 2003; Lewenza et al. 2005), and this was confirmed experimentally for PvdN (Voulhoux et al. 2006), it was proposed that a precursor of PVDI, with an unformed chromophore, is synthesized in the cytoplasm, and matured in the periplasm (Baysse et al. 2002; Visca et al. 2007). The transport of the precursor across the inner membrane may involve PvdE, which is an “export” ABC transporter essential for PVDI production (McMorran et al. 1996; Saurin et al. 1999).

In the present work, the fluorescent properties of PVDI were used to investigate this siderophore synthesis pathway and the roles of the ABC transporter PvdE and the PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ proteins in PVDI synthesis.

## Materials and methods

### Chemicals

Chemicals were purchased from Sigma unless otherwise stated. PVDI and PVDI-Fe were prepared as described previously (Albrecht-Gary et al. 1994).

### Bacterial strains and growth

The strains used in this study are described in Table 1. Strains were grown at 37°C in succinate medium (composition in g/L is K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; sodium succinate, 4.0 and the pH was adjusted to 7.0 by addition of NaOH). For *P. aeruginosa* PAO1 OT11 and the corresponding mutants the medium was supplemented with 1 mM each of leucine and proline.

**Table 1** Strains used in this study

Name	Genotype/phenotype	References
PAO1	Wild type	Royle et al. (1981)
PAD06	<i>pvdA</i> ::ΩSm/Sp	Takase et al. (2000)
PAD06(pPVR2)	<i>pvdA</i> ::ΩSm/Sp, FpvA <sup>+</sup>	Brillet et al. (2007)
PAD07	<i>pvdA</i> ::ΩSm/Sp, Δ <i>pchD</i> ::ΩTc	Takase et al. (2000)
PAO1 <i>fpvA</i>	Δ <i>fpvA</i>	Shirley and Lamont (2009)
PAO1 <i>fpvA</i> , <i>fpvR</i>	Δ <i>fpvA</i> , Δ <i>fpvR</i>	This study
PAO1 <i>pvdN</i>	<i>pvdN</i> ::Km	Lamont and Martin (2003)
PAO1 <i>pvdO</i>	<i>pvdO</i> ::Km	Lamont and Martin (2003)
PAO1 <i>pvdP</i>	<i>pvdP</i> ::Km	Lamont and Martin (2003)
PAO1 <i>pvdQ</i>	<i>pvdQ</i> ::pEXGm	Kovach et al. (1995)
PAO1 OT11	<i>leu pro</i>	McMorran et al. (1996)
PAO1 OT11 <i>pvdE</i>	<i>pvdE</i> ::Km	Mascarenhas et al. (2002)
PAO1 OT11 <i>pvdE</i> (pBBR4)	<i>pvdE</i> ::Km, Cb <sup>R</sup>	This study
PAO1 OT11 <i>pvdE</i> (pBBR4::pvdE)	Pvd <sup>+</sup> , Cb <sup>R</sup>	This study

### Genetic manipulations

Enzymes were purchased from Roche and used under the conditions recommended by the manufacturer. Plasmid and chromosomal DNA were isolated using the Roche high pure plasmid isolation kit and the Ultra Clean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio), respectively, according to the manufacturers' instructions. Treatment of DNA with enzymes, subcloning of DNA, and transformation of plasmid constructs into *E. coli* and *P. aeruginosa* were carried out using standard methods (Sambrook and Russel 2001; Chuanchuen et al. 2002). DNA fragments were amplified from *P. aeruginosa* PAO1 genomic DNA by PCR using PCR SuperMix High Fidelity obtained from Invitrogen. All products and plasmid constructs were verified by DNA sequencing. Deletion of the entire *fpvA* gene was carried out using plasmid pJSS2 as described previously (Shen et al. 2002). A deletion of *fpvR* extending from just after the 5' end of the gene to just before the 3' end was engineered using pEX18Tc (Hoang et al. 1998). Flanking DNA fragments were amplified by PCR with primers 5'-CGCGAATTCAGTCGTTGAACTCCATCCGG-3' and 5'-GGCGGTACCCGAGCGAAACAAGGCTTTAA-3' 5'-(upstream) and 5'-CGCGGTACCGTTAAATTTAGCCGCCCTGG-3' GCCTCTAGAGGCGTTTTCCATCAGCTGTC-3' (downstream), with introduced restriction sites shown in bold. The PCR products were digested with *EcoRI* and *KpnI*, and *KpnI* and *XbaI*, and cloned sequentially into pEX18Tc. The resulting plasmid was transformed into *E. coli* strain S17-1 (Simon et al. 1986) and transferred into *P. aeruginosa* by conjugation, resulting in homologous recombination between the chromosomal target and one of the deletion-flanking fragments located on the plasmid. Bacteria were then spread onto L-agar containing 5% sucrose to select for a second recombination event leaving a deletion of *fpvR*. Bacteria in which *fpvR* had been deleted were identified by PCR.

To construct plasmid pBBR4::pvdE, an *EcoRI*-*PstI* restriction fragment spanning the *pvdE* gene was excised from pSOT4 (Rombel et al. 1995) and cloned into pBBR4 (Kovach et al. 1995) that had been digested with the same enzymes.

### Image acquisition

Cells grown overnight in succinate medium were incubated with or without PVDI, washed once with siderophore-free buffer, and then mounted onto S750-agarose coated slides, as described previously (Mascarenhas et al. 2002). Images were acquired on a Leica DM RXA2 (objective: Leica HCX PL APO 100 × 1.40–0.7 OIL CS) microscope with a photometric coolSNAP HQ camera. Images were captured using MetaMorph 6.0 (Universal Imaging).

## Cell fractionation

For periplasm and cytoplasm preparations,  $2.5 \times 10^{10}$  bacteria (25 mL of OD<sub>600</sub> of 1) were collected by centrifugation after overnight growth in iron-limited succinate medium, washed twice with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and re-suspended in 1 mL of buffer A (200 mM Tris–HCl, pH 8.0, 20% sucrose). To obtain spheroplasts, 10  $\mu$ L of 100 mg/mL Lysozym (Euromedex) was slowly added to the cells and the mixtures were slowly shaken at room temperature for 40 min. After preparation of the spheroplasts, the periplasmic fractions were isolated by centrifugation (15 min at 8,000g). The pellets containing the spheroplasts were washed twice with buffer A. The spheroplasts were re-suspended in 750  $\mu$ L cold water and the mixtures incubated for 1 h at room temperature in the presence of benzonase (1  $\mu$ L, from Sigma). The cytoplasmic fractions were isolated by ultracentrifugation (40 min at 120,000g). The volume of the cytoplasmic and periplasmic fractions was adjusted to 1 mL with 50 mM Tris–HCl pH 8.0 buffer and the fluorescence in each fraction was monitored. The proteins were separated on SDS PAGE (12%). For western blotting, proteins were transferred from the gel onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked by incubation overnight in phosphate-buffered saline [PBS (pH 7.6), 5% dried milk] and then incubated in blocking buffer with primary antibody against  $\beta$ -lactamase (Chemicon, dilution 1/2,500), followed by a second incubation in blocking buffer with horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma, dilution 1/10,000). Blots were developed using the enhanced chemiluminescence protocol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat, Pierce).

## Electrophoretic analysis of PVDs

PVDI and its precursors were purified on a column of octadecylsilane (Lichroprep RP 18, 40–63  $\mu$ m, Merck). The column was first washed with an aqueous solution of acetic acid at pH 4.0, to remove the bulk of inorganic salts and then the siderophores were eluted with a 1:1 mixture of acetonitrile/50 mM pyridine–acetate buffer pH 5.0. After evaporation, the siderophores were dissolved in 50 mM pyridine–acetate buffer pH 5.0. Electrophoretic analysis of pyoverdines on cellulose acetate membranes (Midifilm, Biomidi) was carried out using a horizontal electrophoresis tank as described (Albrecht-Gary et al. 1994). Electrophoresis was performed in 100 mM pyridine–acetic acid pH 5.0 at a constant voltage (300 V) for 30 min.

## Fluorescence spectroscopy

Fluorescence experiments were carried out using 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 ( $\lambda_{exc}$ ) was set at 400 nm (for direct excitation), and the emission of fluorescence ( $\lambda_{em}$ ) was measured at 450 nm. The cells, after overnight growth in iron-limited medium, were washed with two volumes of 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) and re-suspended in the same buffer to a final OD<sub>600</sub> of 0.75. To follow PVDI production, the bacterial suspension (900  $\mu$ L) was stirred in a 1 mL cuvette and the fluorescence monitored. The fluorescent emission spectra of PVDI and its precursors were performed with purified siderophores in solution in 50 mM Tris–HCl pH 8.0. The siderophores were purified as described above for electrophoretic analysis.

## <sup>55</sup>Fe uptake assay

The iron uptake assays were carried up as described previously (Schalk et al. 2001). PAD07 cells at an OD<sub>600</sub> of 1, preincubated as required with 200  $\mu$ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), were incubated in the presence of 200 nM siderophore–<sup>55</sup>Fe complexes. At different times aliquots were removed, filtered and the radioactivity retained by the bacteria counted.

## Iron chelation by PVDI and PVDI precursors

After overnight growth in succinate medium, *P. aeruginosa* PAO1 and PAO1*pvdQ* cells were collected by centrifugation and the siderophore was prepared from the supernatants. PVDI and PVDI precursors were purified as described above for electrophoretic analysis, diluted to 500 nM in 50 mM pyridine–acetate buffer (pH 5.0). Aliquots of FeCl<sub>3</sub> (stock solution at 100  $\mu$ M, 1 mM and 10 mM) were added and the fluorescence monitored at 450 nm (excitation wavelength 400 nm) after 5 min incubation.

## Mass spectrometry analyses of PVDI precursors

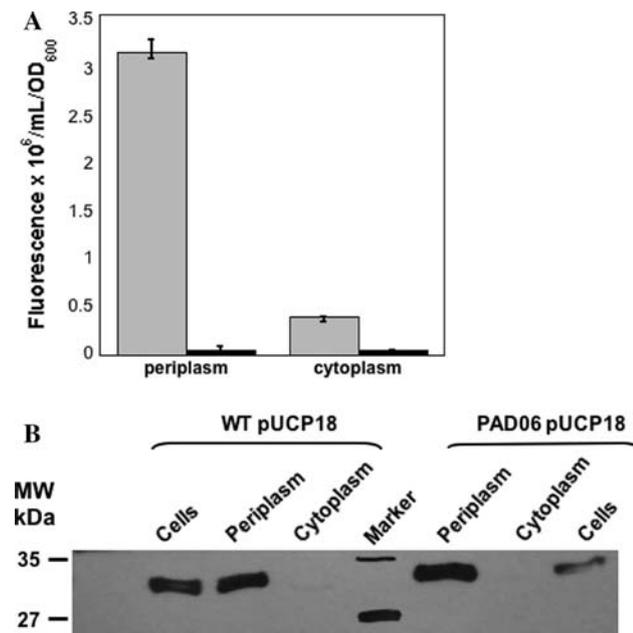
Samples were analyzed using LC–MS at the Service de Spectrométrie de Masse de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg. Samples were dissolved in DMSO, injected on a Thermo HypersilGold C18 column (1  $\times$  3  $\times$  1.9 cm) and analyzed in electrospray (ES–TOF) experiments performed on a Bruker Daltonic MicroTOF mass spectrometer.

## Results

### Presence of important amounts of PVDI in the periplasm of *P. aeruginosa* PAO1

We first investigated whether chromophore formation occurs in the periplasm. PVDI is characterized by a typical

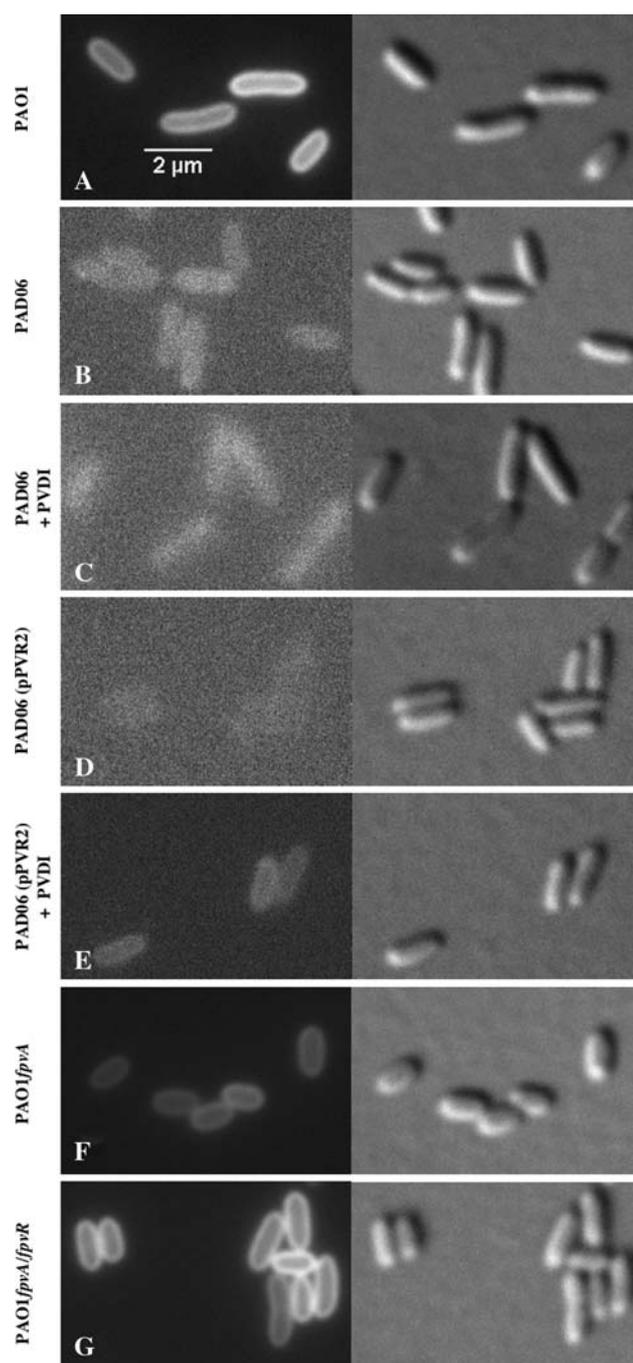
fluorescence at 450 nm (excitation wavelength 400 nm), due to the presence of its chromophore moiety. Only PVDI and any PVDI precursors with a formed chromophore are fluorescent. To identify the cellular compartment of chromophore formation, we used the fluorescent properties of the chromophore to look for its presence in the cytoplasm and/or in the periplasm of *P. aeruginosa* cells. Two approaches were used, cellular fractionation (Fig. 2) and fluorescent microscopy (Fig. 3). When the periplasm and the cytoplasm of *P. aeruginosa* PAO1 cells were fractionated, a large amount of fluorescence was detected in the periplasmic fraction and almost no fluorescence in the cytoplasmic fraction (Fig. 2a). This result is consistent with the hypothesis that maturation of the PVDI chromophore takes place in the periplasm although it could also indicate that the chromophore is formed in the cytoplasm, exported immediately after its formation across the inner membrane and stored in the periplasm. To check that



**Fig. 2** **a** Fluorescence in the cytoplasmic and periplasmic fractions of *P. aeruginosa* PAO1 (gray bars) and PAD06 (unable to produce PVDI) (black bars). Spheroplasts were prepared for separation of the periplasmic and cytoplasmic fractions. Before extraction of the cytoplasm, the spheroplasts were washed twice. The samples (periplasm and cytoplasm), each in a volume of 1 mL, were excited at 400 nm and the fluorescence was monitored at 450 nm. The observed fluorescence is proportional to the amount of PVDI present in each sub-cellular fraction. The data are means of three independent experiments. **b** Western blot analyzes of the cytoplasmic and periplasmic fractions. The equivalent of 0.1 OD<sub>600</sub> units of PAO1 and PAD06, transformed with plasmid pUCP18 that carries a gene encoding a periplasmic  $\beta$ -lactamase, were separated by SDS PAGE. Proteins were blotted onto nitrocellulose and  $\beta$  lactamase detected using an antibody. Molecular weight markers (in kDa) are shown on the left

fractionation occurred with minimal contamination of one cell compartment by the other, the bacteria were transformed with plasmid pUCP18 (West et al. 1994) that carries a gene encoding a periplasmic  $\beta$ -lactamase. Analysis of the cytoplasmic and periplasmic fractions of these cells showed that the fractionation procedure was very efficient with only trace amounts of  $\beta$ -lactamase in the cytoplasmic fractions (Fig. 2b).

Because of its fluorescent properties, PVDI is suitable for imaging in living cells by fluorescence microscopy. We immobilized growing *P. aeruginosa* PAO1 and different mutants on agarose. A strong fluorescence at wavelengths corresponding to the emission of fluorescence of PVDI was only detected on the circumference of PAO1 cells (Fig. 3a). This fluorescence was absent in a PVDI-deficient mutant (PAD06, Fig. 3b), demonstrating that the fluorescence is due to the presence of PVDI. The PVDI-Fe outer membrane transporter, FpvA, is able to bind PVDI at the cell surface when it is complexed with non-ferric ions such as Ga<sup>3+</sup> or Al<sup>3+</sup> (Schalk et al. 1999, 2001; Braud et al. 2009). These metals, unlike Fe<sup>3+</sup> ions, do not quench fluorescence of PVDI (Yoder and Kisaalita 2006; Braud et al. 2009). In order to discriminate between fluorescence due to PVDI bound to FpvA at the cell surface and fluorescence due to the presence of PVDI in the periplasm, PVDI-deficient PAD06 and PAD06(pPVR2) cells carrying a plasmid that overexpresses FpvA were incubated in the presence of metal-free PVDI (Fig. 3c). Fluorescence was observed at the cell periphery for the strain overexpressing FpvA (PAD06(pPVR2)) and preincubated with PVDI, but with a markedly lower intensity compared to *P. aeruginosa* PAO1 cells (Fig. 3a). These observations indicate that the fluorescence seen at the cell circumference of PAO1 cells is mostly due to accumulation of PVDI in the periplasm although overexpression of FpvA can give observable binding of PVDI to FpvA at the outer membrane. For the same purpose, PAO1fpvA and PAO1fpvAfpvR strains were observed by fluorescent microscopy (Fig. 3f, g). In these strains, FpvA is not expressed and so PVDI cannot bind to FpvA at the cell surface although it can be synthesized. Mutations in *fpvA* result in reduced PVDI synthesis relative to wild-type bacteria and this reduction is overcome when *fpvR* is also mutated (Lamont et al. 2002). In these strains the fluorescence at the cell periphery was higher than for PAD06 expressing FpvA (Fig. 3g) and was similar to the fluorescence seen in strain PAO1. All these data demonstrate that the fluorescence seen in PAO1 cells is mostly due to the presence of PVDI in the periplasm. The data shown in Figs. 2 and 3 indicate that PVDI or a fluorescent precursor accumulates in the periplasm before its secretion into the extracellular medium. These data suggest also that the final steps of chromophore biogenesis may take place in the periplasm.



**Fig. 3** Fluorescence microscopy of *P. aeruginosa* PAO1 and different mutants. For all the strains the left picture was taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right with DIC (Differential Interference Contrast) filter (white bar 2  $\mu$ m). The experiment has been carried out with *P. aeruginosa* wild type PAO1 cells (a), PAD06, a strain unable to produce PVDI (b), PAD06 cells incubated with PVDI (c), PAD06(pPVR2), a strain unable to produce PVDI and overexpressing FpvA (d), PAD06(pPVR2) incubated with PVDI (e), PAO1fpvA, a fpvA mutated strain (f) and PAO1fpvA/fpvR, a fpvA and fpvR mutated strain (g). When the cells were incubated with PVDI (strains PAD06 and PAD06(pPVR2)) siderophore excess was removed by washing prior to microscopy

### Chemical and biochemical characteristics of the periplasmic PVDI (PVDIp)

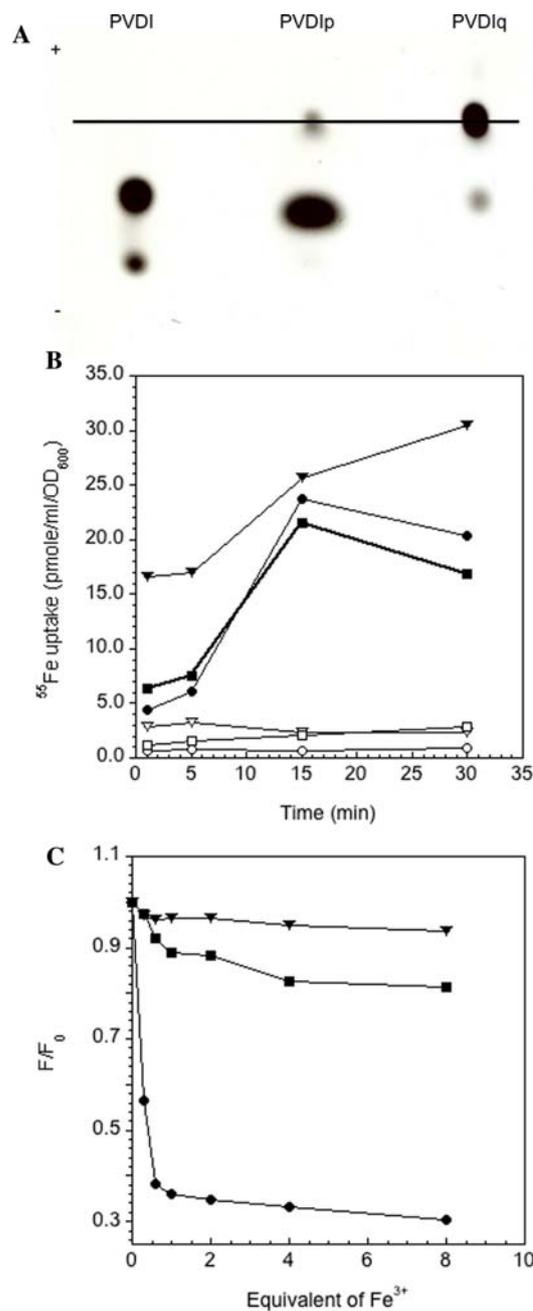
The data above show that PVDI or a fluorescent precursor accumulates in the periplasm of *P. aeruginosa* PAO1. Spheroplasts of *P. aeruginosa* PAO1 were prepared to extract the fluorescent material from the periplasmic fraction. Further purification was carried out on a column of octadecylsilane used previously to purify PVDs (Albrecht-Gary et al. 1994). The eluted fluorescent material (named PVDIp) gave  $m/z$  1,301.40 [PVDI found in the extracellular medium being  $m/z$  1,334.60, (correspond to PVDI +  $H^+$ )] (Demange et al. 1990). The migration pattern of PVDIp on cellulose acetate membrane was different from that of PVDI harvested from the extracellular medium, indicating a different pI (Fig. 4a). In both cases a major spot was observed with a minor spot. However, the migration distances of the major spots were slightly different for both molecules indicating a small difference in the structures and the minor spots had quite different mobilities. These data indicate that a single major fluorescent compound, PVDIp, accumulates in the periplasm. We extracted an average of 320  $\mu$ g/OD<sub>600</sub> of PVDIp from 1 L culture of *P. aeruginosa* PAO1. This represents 0.16% of the amount of PVDI (200 mg/OD<sub>600</sub>) purified from the extracellular medium. To evaluate its ability to chelate iron and transport iron, PVDIp and PVDI harvested in the extracellular medium from the same culture were loaded with <sup>55</sup>Fe and incubated with cells of the PVDI and pyochelin-deficient mutant PAD07. PVDIp was able to transport iron into PAD07 with the same efficiency as PVDI from the extracellular medium (Fig. 4b). This transport was abolished when the cells were treated with the protonophore CCCP, which inhibits any TonB-dependent transport (Clément et al. 2004). Fluorescence of PVDI from the extracellular medium was quenched by an excess of Fe<sup>3+</sup>, as expected (Folschweiller et al. 2002), but the fluorescence of PVDIp was not (Fig. 4c). Collectively, these data indicate that PVDIp is the only major fluorescent PVDI precursor that accumulates in the periplasm and that PVDIp is able to chelate Fe<sup>3+</sup> and transport it into *P. aeruginosa*.

### Role of PvdE in PVDI production

The peptide backbone of PVDI is assembled by NRPS that are thought to be in the cytoplasm giving rise to a PVDI precursor with a lacking a chromophore (Merriman et al. 1995; Lehoux et al. 2000; Mossialos et al. 2002; Ackerley et al. 2003; Lamont and Martin 2003; Ravel and Cornelis 2003; Visca 2004). The data presented in Figs. 2 and 3 indicate that this precursor is then transported across the inner membrane into the periplasm for maturation, as

**Fig. 4** Characteristics of PVDI, PVDIp and PVDIq. **a** Isoelectrofocusing migration of pyoverdine on cellulose acetate membranes. The black line indicates where the samples were loaded onto the membrane. PVDIp was isolated from the periplasm of *P. aeruginosa* PAO1 and PVDI and PVDIq were purified from the extracellular medium of strains PAO1 and PAO1*pvdQ*, respectively. **b** transport of  $^{55}\text{Fe}$  into *P. aeruginosa* PAD07. Suspensions of PAD07 at an  $\text{OD}_{600}$  of 1 were incubated with 200 nM PVDI- $^{55}\text{Fe}$  (filled circle), PVDIp- $^{55}\text{Fe}$  (filled square) and PVDIq- $^{55}\text{Fe}$  (filled inverted triangle) and aliquots were removed at different times and filtered. The amounts of radioactivity retained by bacteria collected on the filters were determined. The experiment was repeated with cells pretreated with 200  $\mu\text{M}$  CCCP (PVDI- $^{55}\text{Fe}$  (open circle), PVDIp- $^{55}\text{Fe}$  (open square) and PVDIq- $^{55}\text{Fe}$  (open inverted triangle)). PVDIp, pyoverdine prepared from the periplasm of *P. aeruginosa* PAO1; PVDIq, pyoverdine produced by PAO1*pvdQ* **c** fluorescence of the different forms of PVDI in the presence of  $\text{Fe}^{3+}$ . PVDI (filled circle), PVDIp (filled square) and PVDIq (filled inverted triangle) were diluted to 500 nM in 50 mM pyridine AcOH buffer (pH 5.0). Aliquots of  $\text{FeCl}_3$  were added and the fluorescence was monitored at 450 nm (excitation at 400 nm).  $F_0$  Fluorescence at time 0,  $F$  Fluorescence at time  $t$

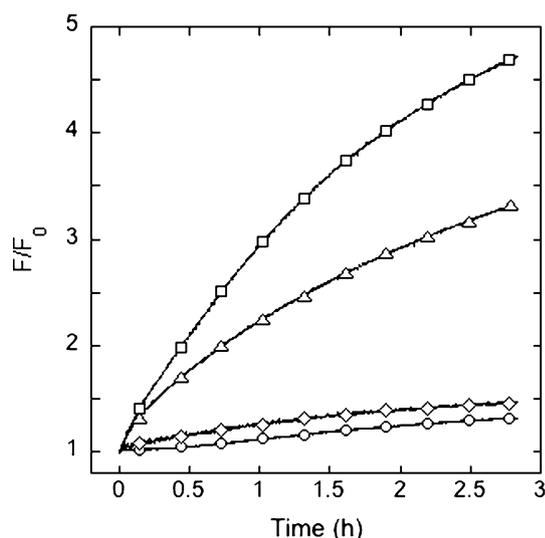
revealed by the presence of PVDIp in this cell compartment. A likely candidate for the transport of a PVDI non-fluorescent precursor across the inner membrane into the periplasm is PvdE, an “export” ABC transporter with a fused ATPase and permease component. Mutation of *pvdE* affects PVDI production (McMorran et al. 1996; Saurin et al. 1999) but its precise role in PVDI synthesis and/or transport has not been elucidated. The kinetics of formation of the chromophore in the periplasm can be followed by monitoring fluorescence in living cells. *P. aeruginosa* PAO1 OT11 (Pvd<sup>+</sup>), the corresponding *pvdE* mutant and the complemented strain were grown in iron-limited medium, collected, re-suspended in buffer and the fluorescence monitored (Fig. 5). Fluorescence increased and no plateau was reached for strain PAO1 OT11, showing that the synthesis and maturation of PVDI is continuous. Mutation of *pvdE* almost completely prevented PVDI production, and PVDI production was restored when the mutation was complemented. Consistent with these kinetic data, fluorescence microscopy showed no fluorescence in the periplasm for the PAO1 OT11*pvdE* mutant (Fig. 6a). When the mutant was complemented with a plasmid carrying *pvdE*, fluorescence was detected in the periplasm as for the wild-type strain (Fig. 6a). Periplasmic and cytoplasmic fractions as well as inner and outer membrane preparations were isolated from wild-type bacteria, the *pvdE* mutant and the complemented mutant. The fluorescence at 450 nm was monitored in each fractions (Fig. 6b). A fivefold higher amount of fluorescence was observed for the periplasmic fraction from the Pvd<sup>+</sup> PAO1 OT11 strain compared to the *pvdE* mutant. Fluorescence was mostly restored when the mutation was complemented with the plasmid-borne *pvdE* gene. No fluorescence was seen in the cytoplasm (Fig. 6b) or detected in the inner and outer membrane preparations (data not shown) for either the wild-type or *pvdE* mutant bacteria. Collectively, these data and



the fact that PvdE belongs to the family of ABC transporters suggest that PvdE enables transport of a PVDI precursor across the inner membrane. When this transport cannot occur through mutation of *pvdE* no fluorescence appears in the periplasm and no PVDI is released into the extracellular medium (McMorran et al. 1996; Saurin et al. 1999).

#### Roles of PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ in PVDI production

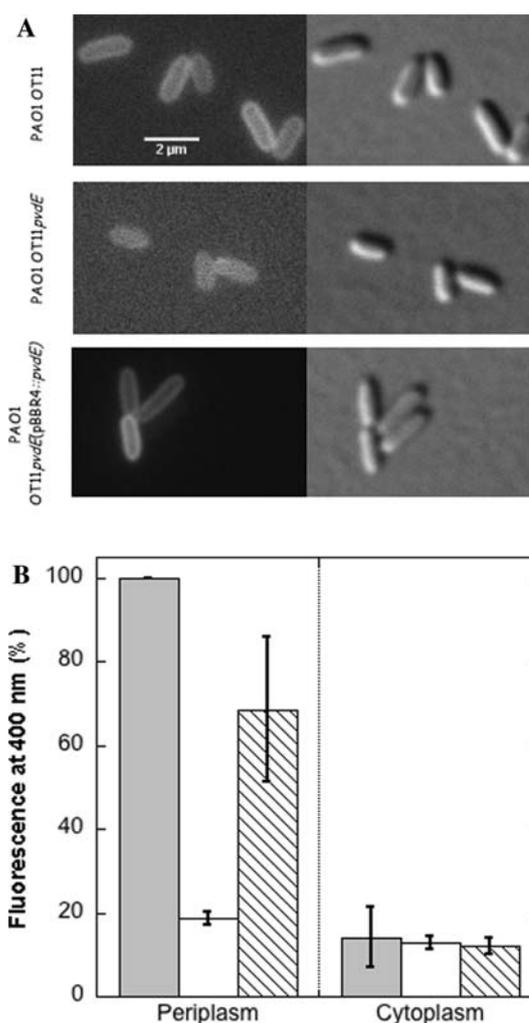
The data described above suggest that a PVDI precursor is synthesized in the cytoplasm of *P. aeruginosa* PAO1 and



**Fig. 5** Effect of *pvdE* mutation on PVDI synthesis. *P. aeruginosa* PAO1 OT11 (open square), OT11*pvdE* (open circle), PAO1 OT11*pvdE*(pBBR4) (open diamond) and PAO1 OT11*pvdE*(pBBR4::*pvdE*) (open triangle) cells at an OD<sub>600</sub> of 1 were incubated at 37°C in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and the total fluorescence monitored at 450 nm (excitation at 400 nm).  $F_0$  fluorescence at time 0,  $F$  fluorescence at time  $t$

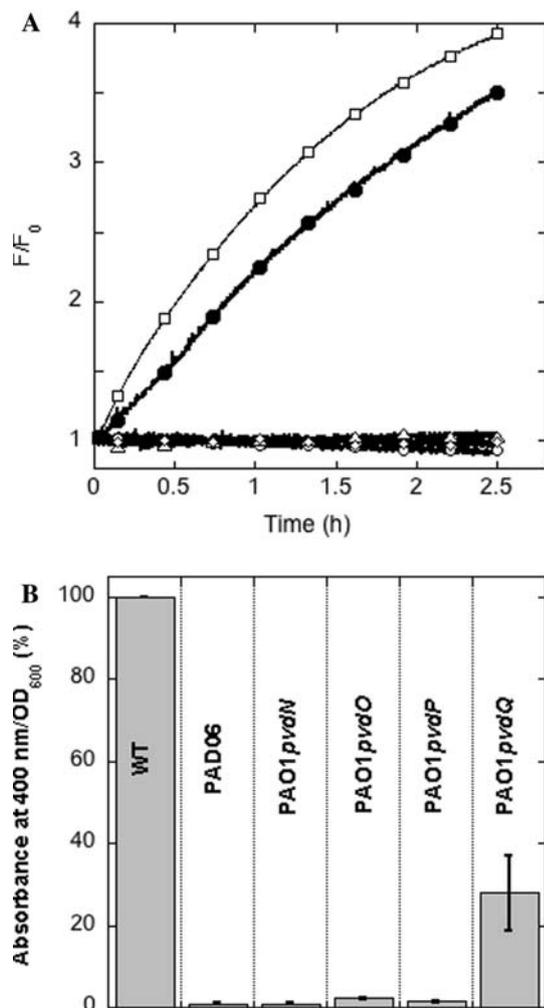
transported across the inner membrane by PvdE, with further steps of PVDI synthesis taking place in the periplasm before release of PVDI into the extracellular medium. The *pvdN*, *pvdO*, *pvdP* and *pvdQ* genes are required for pyoverdine synthesis (Lamont and Martin 2003) and PvdN has been shown to be located in the periplasm (Voulhoux et al. 2006); *pvdO*, *pvdP* and *pvdQ* are also predicted to encode periplasmic enzymes (Lewenza et al. 2005). The kinetics of PVDI chromophore formation was followed for *pvdN*, *pvdO*, *pvdP* and *pvdQ* mutants. No increase of fluorescence was observed for the *pvdN*, *pvdO* and *pvdP* mutants (Fig. 7a), indicating that these three enzymes must be involved either in chromophore formation or in a step preceding it. Consistent with this observation, no PVDI was found in the extracellular medium of an overnight culture of these three mutants (Fig. 7b). When *pvdQ* was mutated, chromophore formation was only slightly affected (a 17% decrease of fluorescence compared to PAO1, Fig. 7a) but the production of PVDI after overnight culture was more dramatically decreased (70%; Fig. 7b). PvdQ, which is predicted to be an acylase, must be involved in PVDI maturation, in a step following chromophore formation. Fluorescence microscopy studies showed that this mutant accumulates fluorescent siderophore in the periplasm in the same way as strain PAO1 (data not shown).

The fluorescence spectrum of PVDI<sub>q</sub>, the pyoverdine released into the extracellular medium by the *pvdQ* mutant, showed a small shift of the maximum of emission of fluorescence (456 nm in pyridine acetate buffer) compared



**Fig. 6** a Fluorescence microscopy of *P. aeruginosa* PAO1 OT11, PAO1 OT11*pvdE* and PAO1 OT11*pvdE*(pBBR4::*pvdE*). For all the strains the left picture was taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right with DCI (Differential Interference Contrast) filter (White bar 2 μm). b Fluorescence in the cytoplasmic and periplasmic fractions of *P. aeruginosa* PAO1 OT11 (gray bars), PAO1 OT11*pvdE* (white bars) and PAO1 OT11*pvdE*(pBBR4::*pvdE*) (striped bars). The spheroplasts were prepared as in Fig. 2 for separation of the periplasmic and cytoplasmic fractions and fluorescence was determined (excited at 400 nm and emission monitored at 450 nm). The data are mean values of three independent experiments

to PVDI secreted by PAO1 (452 nm in the same buffer). Electrophoretic analysis of PVDI<sub>q</sub> on cellulose acetate membranes showed no migration, showing a different pI from PVDI (Fig. 4a). Mass spectrum analyses of PVDI<sub>q</sub> gave  $m/z$  1,560.85 [PVDI found in the extracellular medium being  $m/z$  1,334.60 (corresponding to PVDI + H<sup>+</sup>)] a mass slightly higher than PVDI<sub>p</sub> (1,334.60), indicating that PVDI maturation involves at least one precursor with a molecular mass larger than the final product. PVDI<sub>q</sub> was able to transport <sup>55</sup>Fe into PAD07 cells ( $\Delta pvd \Delta pch$ ) with



**Fig. 7** **a** Kinetics of PVDI production. Cells of the strains (PAO1, open square; PAO1pvdN, open circle; PAO1pvdO, open triangle; PAO1pvdP, open diamond and PAO1pvdQ, filled circle) at an OD<sub>600</sub> of 1 in 50 mM Tris–HCl were incubated at 37°C and fluorescence at 450 nm (excitation at 400 nm) was monitored for 3 h.  $F_0$  fluorescence at time 0,  $F$  fluorescence at time  $t$ . **b** Effects of mutations on PVD production after overnight culture. The amounts of PVDI produced were estimated as previously, for an OD<sub>600</sub> of 1, by pelleting the cells and monitoring the absorbance at 400 nm in the supernatant (Nader et al. 2007). The data are mean values of three independent experiments

the same efficiency as PVDI from PAO1 (Fig. 4b) and this transport was abolished when the cells were treated with the protonophore CCCP. However, almost no quenching of the PVDIq fluorescence was observed in the presence of an excess of Fe<sup>3+</sup> (Fig. 4c) indicating a chelation that does not affect fluorescence.

## Discussion

The spectral properties of PVDI have been used previously by our group to investigate the interaction between PVDI

and its outer membrane transporter FpvAI (Schalk et al. 2001, 2002; Clément et al. 2004; Greenwald et al. 2007). Here, we used this approach to investigate PVDI synthesis. The biochemical functions of a number of enzymes involved in PVDI synthesis are well established [reviewed in (Visca et al. 2007)] but those of other enzymes that are required for this process are not. However, the predicted periplasmic locations of PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ (Lewenza et al. 2005), which has been verified experimentally for PvdN (Voulhoux et al. 2006), suggested that synthesis of PVDI starts in the cytoplasm and is continued in the periplasm. Fluorescence detection of the PVDI chromophore showed that in *P. aeruginosa* PAO1 this is located in the periplasm with only a small amount of fluorescence detected in the cytoplasm (Figs. 2, 3). Fluorescence in the cytoplasmic fraction following cellular fractionation is most likely due to slight contamination of the cytoplasmic fractions by the periplasmic fractions. PVDIp, the periplasmic form of PVDI, showed a different migration pattern on cellulose acetate membranes to PVDI secreted into the extracellular medium by PAO1 (Fig. 4b), has slightly different fluorescence properties from PVDI, and its fluorescence is not quenched by Fe<sup>3+</sup> in the same way as PVDI (Fig. 4c). Mass spectrum analyses of PVDIp revealed a mass of 1,301.40 compared with 1,334.60 for PVDI. When PVDIp was loaded with <sup>55</sup>Fe, the formed complex was transported into *P. aeruginosa* (Fig. 4a), indicating that the specific outer membrane transporter FpvA is able to recognize this PVDI precursor as the alternative pyoverdine receptor FpvB does not transport <sup>55</sup>Fe in our experimental conditions (unpublished data).

Siderophore outer membrane transporters are highly siderophore specific. Among the 70 different pyoverdines presently identified (Meyer et al. 2008), *P. aeruginosa* PAO1 is only able to use pyoverdines produced by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 or 18.1 in addition to PVDI (Meyer et al. 1999; Fuchs et al. 2001). Structural and biochemical studies of FpvA have shown that the siderophore binding to this transporter is influenced by the structure of the first three to four amino acids of the PVDI peptide moiety, while the C-terminus of the peptide does not seem to be involved extensively in recognition by FpvA (Greenwald et al. 2009). All these findings indicate that PVDIp has a structure that is sufficiently similar to PVDI to enable it to be recognized and transported by FpvA, although it is different from PVDI in its molecular weight and pI. These observations suggest that PVDIp is a PVDI fluorescent precursor. The fluorescent properties of PVDI are conferred by the chromophore. The PVDI chromophore is thought to be derived from a multistep oxidative cascade of a peptide precursor as part of the process that results in the presence of the catechol moiety of PVDI, with formation of the catechol group being the

last step in this process (Dorrestein et al. 2003; Dorrestein and Begley 2005). Since the fluorescence of PVDI<sub>p</sub> is not quenched by iron chelation (Fig. 4c), PVDI<sub>p</sub> may be a precursor of PVDI in which the chromophore has been formed but the catechol has not. Ferribactins, PVDI precursors in which the chromophore and catecholate moiety have not been formed, are able to chelate Fe<sup>3+</sup> ions via hydroxamate ligands [reviewed in (Budzikiewicz 2004)] and the two hydroxamate groups of PVDI are able to efficiently chelate iron in the absence of the catecholate group and are involved in the initial step of the formation of PVDI-Fe (Albrecht-Gary et al. 1994). The two hydroxamate groups would be sufficient for PVDI<sub>p</sub> to chelate iron with the formed complex being able to bind to FpvAI and be transported into the bacteria. Cell fractionation (Fig. 2) and fluorescent microscopy (Fig. 3) indicated that PVDI<sub>p</sub> is concentrated in the periplasm. However, the amount of PVDI<sub>p</sub> extracted from this small cell compartment is extremely low (320 µg/L/OD<sub>600</sub>; 0.16% of the amount of PVDI purified from the extracellular medium) and this has so far prevented elucidation of the structure of this PVDI precursor.

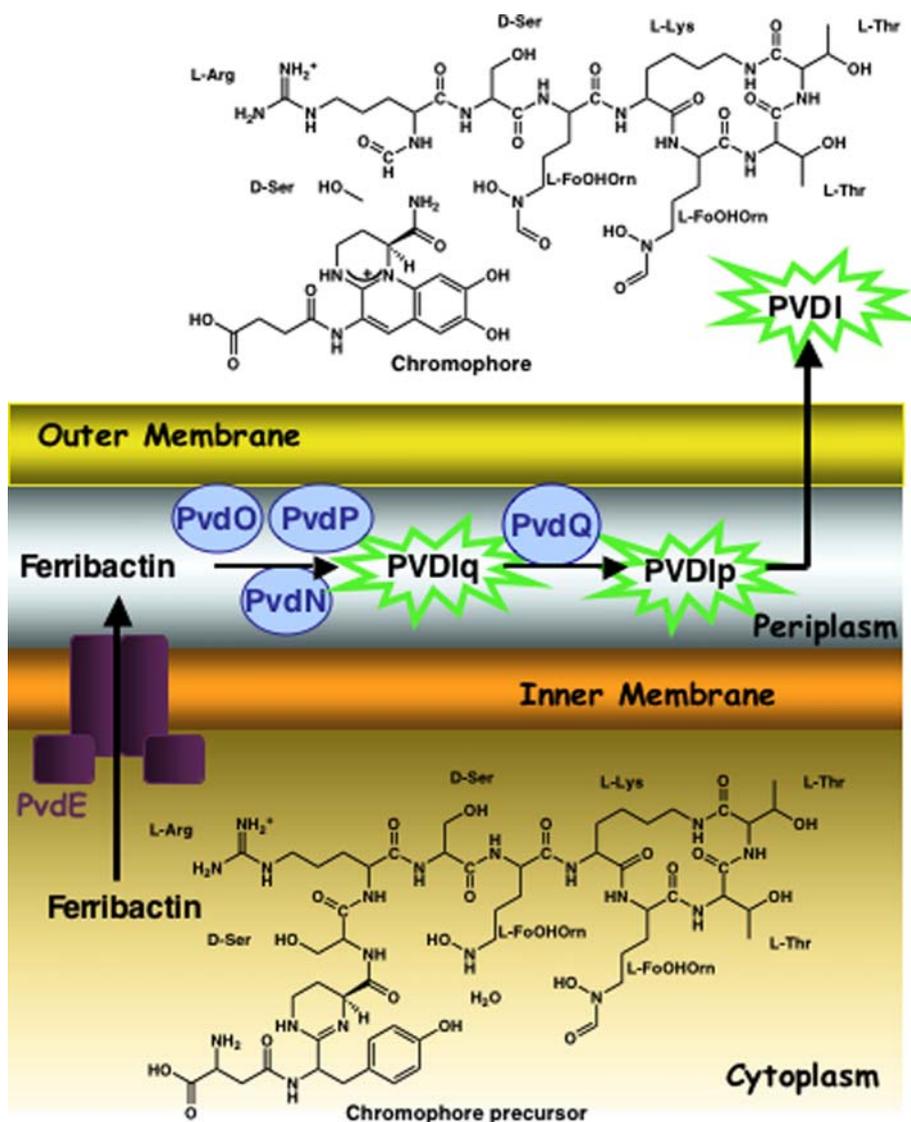
It is surprising that cells of *P. aeruginosa* store siderophore precursor in the periplasm. PVDI is able to chelate a number of metal ions in addition to iron (Baysse et al. 2000; Braud et al. 2009) so that these molecules are potentially able to chelate any free metal present in this cell compartment and perhaps also metal bound to metalloproteins. The differences between PVDI<sub>p</sub> and PVDI may indicate different mechanisms of chelation for the two molecules as discussed above resulting in a lower affinity of PVDI<sub>p</sub> for metal ions compared to PVDI and this may be important for maintaining metal ion homeostasis in the periplasm. Here again, further studies are necessary to clarify this point.

As discussed above, fluorescence corresponding to PVDI chromophore was detected in the periplasm, with almost no fluorescence in the cytoplasm of *P. aeruginosa* PAO1 cells (Figs. 2, 3). This strongly suggests that either a PVDI precursor with an unformed chromophore is synthesized in the cytoplasm and transported across the inner membrane with chromophore maturation occurring in the periplasm, or chromophore cyclization occurs in the cytoplasm with an immediate export of the formed molecule into the periplasm. The transport across the inner membrane apparently involves PvdE, an “export” ABC transporter, with a fused ATPase and permease. When *pvdE* was mutated, production of secreted PVDI was dramatically decreased (Fig. 5), PVDI<sub>p</sub> could not be detected in the periplasm and fluorescence did not accumulate in the cytoplasm (Fig. 6). PvdE is apparently involved in the transport of a PVDI precursor across the inner membrane. This transported molecule is most likely to be a non-

fluorescent PVDI precursor that is transported into the periplasm via PvdE, with maturation of the PVDI chromophore occurring only in this second cell compartment. A second possibility is that the chromophore is formed in the cytoplasm and PVDI biosynthesis is directly coupled to transport across the inner membrane by PvdE. However, synthesis of PVDI requires PvdN, PvdO and PvdP that are likely to be involved in the formation of the chromophore or in a step preceding it. In their absence no fluorescence was detected in the bacterial cells (Fig. 7a) and PVDI was not released into the extracellular medium (Fig. 7b). The periplasmic localization of PvdN has been shown experimentally (Voulhoux et al. 2006) and the presence of signal sequences for the other proteins makes it likely that they are also localized in the periplasm (Fig. 8). The cellular localization of these enzymes and the fact that their mutation prevents the presence of PVDI<sub>p</sub> in the periplasm as well as PVDI production indicates that PVDI chromophore formation occurs in the periplasm and the molecule transported by PvdE is a non-fluorescent precursor of PVDI. A reaction pathway has been proposed for the formation of the PVDI chromophore from a synthetic chromophore precursor (Dorrestein et al. 2003). Cell extracts from wild-type *P. aeruginosa*, but not a mutant strain that does not express PVDI synthesis genes, catalyzed reactions that were consistent with this scheme (Dorrestein et al. 2003). It remains to be determined whether PvdN, PvdO and PvdP catalyze specific steps in the proposed pathway.

When *pvdQ* was mutated, the rate of chromophore formation was only slightly decreased (Fig. 7a) but production of fluorescent siderophore in an overnight culture was 70% decreased. Since this mutant was able to form a fluorescent siderophore, PvdQ must be involved in PVDI synthesis either in a step following chromophore maturation or in a step converting an immature (but fluorescent) chromophore into the final form. The pyoverdine produced by PAO1 *pvdQ*, PVDI<sub>q</sub>, has a higher molecular weight than PVDI (1,560.85 Da instead of 1,334.60 Da) and migrated differently to PVDI on cellulose acetate (Fig. 4), indicating that the molecules have different pIs. PvdQ was shown to be an acylase for quorum sensing signal molecules (Huang et al. 2006) and synthesis of the PVDI precursor peptide is predicted to begin with incorporation of an acyl group (Mossialos et al. 2002) so that a possibility is that PvdQ is responsible for removing this group during PVDI synthesis. Moreover, iron chelation studies with PVDI<sub>q</sub> did not show the quenching of fluorescence characteristic of the formation of a ferrichelate complex although PVDI<sub>q</sub> efficiently transported <sup>55</sup>Fe into *P. aeruginosa* cells. It may be that PvdI<sub>q</sub> is a PVDI precursor with an immature chromophore lacking catechol function as proposed above for PVDI<sub>p</sub>. If this was the case, iron would only be chelated by the two hydroxamate functions in the

**Fig. 8** Model for Ferribactin maturation in *P. aeruginosa*. Ferribactin, a non-fluorescent PVDI precursor with an unformed chromophore, is synthesised in the cytoplasm. This molecule is transported across the inner membrane by the ABC transporter PvdE. The chromophore is formed in the periplasm with PvdN, PvdO and PvdP catalyzing steps in this process to form PVDIq that has a fluorescent chromophore. PvdQ is involved in conversion of PVDIq into PVDIp a pyoverdine precursor stored in the periplasm before being converted into PVDI and secreted by an unknown transporter. Only PVDI, PVDIp and PVDIq are fluorescent



PVDIq complex, which would be sufficient to enable transport into *P. aeruginosa* but not to efficiently quench fluorescence.

Collectively, our data show that a PVDI precursor with a non-cyclized chromophore is synthesized in the cytoplasm and transported across the inner membrane by the “export” ABC transporter PvdE. Once in the periplasm the chromophore is formed from the precursor and PvdN, PvdO and PvdP are likely to catalyze steps in this process. PvdQ is also involved in the maturation of the siderophore in the periplasm, probably in one of the last steps of the maturation of the chromophore. In this cell compartment the siderophore accumulates in a form (PVDIp) different from PVDI, but that is nonetheless able to chelate iron and to transport it into *P. aeruginosa*, by interacting with the specific outer membrane transporter FpvA. The mechanism of PVDI secretion across the outer membrane remains to be

determined. In the case of catecholate siderophores, it has been suggested that an efflux pump is involved in this step (Page et al. 2003). The PVDI locus contains three genes potentially encoding an efflux pump but previous studies have shown that mutations in these genes do not prevent secretion of PVDI (Ochsner et al. 2002b; Lamont and Martin 2003). Another efflux pump has also been proposed to be involved in PVDI secretion (MexABOprM) but its role has not been further investigated (Poole et al. 1993a).

In conclusion, our data show that the final steps of pyoverdine synthesis take place in the periplasm and that a siderophore precursor accumulates there. Periplasmic accumulation or storage of a siderophore precursor has not been shown for any other bacteria. It is possible that other siderophores are stored by bacteria in the periplasm but since they are not fluorescent, their accumulation has not been observed because of lack of appropriate tools.

**Acknowledgments** This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by the association Mucoviscidose ABCF. E. Yeterian had a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie. The authors are grateful to Keith Poole for providing plasmid pJSS2, to Karla Mettrick for constructing the *fpvA* and *fpvA fpvR* mutant strains and to Dr Gaëtan L. A. Mislin for mass spectrum analyses and discussion.

## References

- Abdallah MA, Pattus F (2000) Siderophores and iron-transport in microorganisms. *J Chin Chem Soc* 47:1–20
- Ackerley DF, Caradoc-Davies TT, Lamont IL (2003) Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:2848–2855
- Albrecht-Gary AM, Blanc S, Rochel N, Ocacktan AZ, Abdallah MA (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* 33:6391–6402
- Bayse C, De Vos D, Naudet Y, Vandermonde A, Ochsner U, Meyer JM, Budzikiewicz H, Schafer M, Fuchs R, Cornelis P (2000) Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146(Pt 10):2425–2434
- Bayse C, Budzikiewicz H, Uria Fernandez D, Cornelis P (2002) Impaired maturation of the siderophore pyoverdine chromophore in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 deficient for the cytochrome *c* biogenesis protein CcmC. *FEBS Lett* 523:23–28
- Braud A, Hoegy F, Jezequel K, Lebeau T, Schalk IJ (2009) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol* 11:1079–1091
- Braun V (2003) Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* 8:1409–1421
- 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
- Budzikiewicz H (2004) Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* 87:81–237
- Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP (2002) Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* 33(760):762–763
- Clarke-Pearson MF, Brady SF (2008) Paerucumarin, a new metabolite produced by the *pvc* gene cluster from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190:6927–6930
- Clément E, Mesini PJ, Pattus F, Abdallah MA, Schalk IJ (2004) The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* 43:7954–7965
- Cobessi D, Célia H, Folschweiller N, Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F (2005) The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J Mol Biol* 34:121–134
- Cornelis P, Matthijs S (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* 4:787–798
- Demange P, Wendenbaum S, Linget C, Mertz C, Cung MT, Dell A, Abdallah MA (1990) Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol Metals* 3:155–170
- Dorrestein P, Begley TP (2005) Oxidative cascades: a facile biosynthetic strategy for the assembly of complex molecules. *Bioorg Chem* 33:136–148
- Dorrestein PC, Poole K, Begley TP (2003) Formation of the chromophore of the pyoverdine siderophores by an oxidative cascade. *Org Lett* 5:2215–2217
- Folschweiller N, Gally J, Vincent M, Abdallah MA, Pattus F, Schalk IJ (2002) The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 41:14591–14601
- Fuchs R, Schafer M, Geoffroy V, Meyer JM (2001) Siderotyping—a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr Top Med Chem* 1:31–57
- Ge L, Seah SY (2006) Heterologous expression, purification, and characterization of an l-ornithine *N*(5)-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:7205–7210
- Greenwald J, Hoegy F, Nader M, Journet L, Mislin GLA, Graumann PL, Schalk IJ (2007) Real-time FRET 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 JM, Schalk IJ, Pattus F (2009) FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol Microbiol* 72:1246–1259
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86
- Huang JJ, Petersen A, Whiteley M, Leadbetter JR (2006) Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 72:1190–1197
- Imperi F, Putignano L, Tiburzi F, Ambrosi C, Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2008) Membrane-association determinants of the omega-amino acid monooxygenase PvdA, a pyoverdine biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 154:2804–2813
- Koebnik R (2005) TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol* 13:343–347
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166:175–176
- Lamont IL, Martin LW (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149:833–842
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7072–7077
- Lamont IL, Martin LW, Sims T, Scott A, Wallace M (2006) Characterization of a gene encoding an acetylase required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:3149–3152
- Lehoux DE, Sanschagrín F, Levesque RC (2000) Genomics of the 35-kb pvd locus and analysis of novel *pvdIJK* genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 190:141–146
- Lewenza S, Gardy JL, Brinkman FS, Hancock RE (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
- Mascarenhas J, Soppa J, Strunnikov AV, Graumann PL (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J* 21:3108–3118

- McMorran BJ, Merriman ME, Rombel IT, Lamont IL (1996) Characterisation of the *pvdE* gene which is required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 176:55–59
- McMorran BJ, Kumara HM, Sullivan K, Lamont IL (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147:1517–1524
- Merriman TR, Merriman ME, Lamont IL (1995) Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. *J Bacteriol* 177:252–258
- Meyer JM, Stintzi A, De Vos D, Cornelis P, Tappe R, Taraz K, Budzikiewicz H (1997) Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* 143(Pt 1):35–43
- Meyer JM, 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 JM, 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
- Mossialos D, Ochsner U, Baysse C, Chablain P, Pirnay JP, Koedam N, Budzikiewicz H, Fernandez DU, Schafer M, Ravel J, Cornelis P (2002) Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* 45:1673–1685
- Nader M, Dobbelaere W, Vincent M, Journet L, Adams H, Cobessi D, Gally J, Schalk IJ (2007) Identification of residues of FpvA involved in the different steps of Pvd-Fe uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46:11707–11717
- Ochsner U, Snyder A, Vasil AI, Vasil ML (2002a) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8312–8317
- Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML (2002b) GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* 45:1277–1287
- Page WJ, Kwon E, Cornish AS, Tindale AE (2003) The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiol Lett* 228:211–216
- Poole K, McKay GA (2003) Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci* 8:d661–d686
- Poole K, Heinrichs DE, Neshat S (1993a) Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* 10:529–544
- Poole K, Neshat S, Krebs K, Heinrichs DE (1993b) Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 175:4597–4604
- Postle K, Kadner RJ (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* 49:869–882
- Ravel J, Cornelis P (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* 11:195–200
- Rombel IT, McMorran BJ, Lamont IL (1995) Identification of a DNA sequence motif required for expression of iron-regulated genes in pseudomonads. *Mol Gen Genet* 246:519–528
- Royle PL, Matsumoto H, Holloway BW (1981) Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J Bacteriol* 145:145–155
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY
- Saurin W, Hofnung M, Dassa E (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48:22–41
- Schalk IJ (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* 102:1159–1169
- Schalk IJ, Kyslik P, Prome D, van Dorsselaer A, Poole K, Abdallah MA, Pattus F (1999) Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* 38:9357–9365
- Schalk IJ, Hennard C, Dugave C, Poole K, Abdallah MA, Pattus F (2001) Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol Microbiol* 39:351–360
- Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F (2002) Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41:1663–1671
- Shen J, Meldrum A, Poole K (2002) FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184:3268–3275
- Shirley M, Lamont IL (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 191:5634–5640
- Simon R, O'Connell M, Labes M, Puhler A (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* 118:640–659
- Takase H, Nitanai H, Hoshino K, Otani T (2000) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 68:1834–1839
- Vandenende CS, Vlasschaert M, Seah SY (2004) Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186:5596–5602
- Visca P (2004) Iron regulation and siderophore signalling in virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Juan-Luis R (ed) *Pseudomonas*, vol 2. Kluwer/Plenum Publishers, New York, pp 69–123
- Visca P, Ciervo A, Orsi N (1994) Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176:1128–1140
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 45:1177–1190
- Visca P, Imperi F, Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* 15:22–30
- Voulhoux R, Filloux A, Schalk IJ (2006) Role of the TAT System in the pyoverdine-mediated iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:3317–3323
- West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81–86
- Wiener MC (2005) TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr Opin Struct Biol* 15:394–400
- Yoder MF, Kisaalita WS (2006) Fluorescence of pyoverdine in response to iron and other common well water metals. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41:369–380



## 1.6 Discussion de l'article 1

Le squelette de la pyoverdine est synthétisé dans le cytoplasme par un mécanisme non ribosomique, aboutissant à la formation d'un précurseur cytoplasmique non fluorescent de la pyoverdine, la ferribactine, qui a pu être précédemment isolé (Hohlneicher et al., 2001; Visca et al., 2007). Les étapes de maturation permettant la formation d'une molécule de pyoverdine mature restaient plus énigmatiques.

En utilisant les propriétés intrinsèques de fluorescence de la pyoverdine, liées à la présence du chromophore cyclisé, nous avons étudié le processus de maturation tardive de ce précurseur cytoplasmique.

Dans un premier temps, grâce à la technique de microscopie de fluorescence nouvellement mise au point, nous avons pu observer un anneau de fluorescence au niveau de l'enveloppe de la bactérie *in vivo*. Afin de déterminer l'origine et la localisation cellulaire exacte de cette fluorescence, nous avons testé différents mutants, dans différentes conditions.

Lorsque la souche ne produit plus de pyoverdine, toute fluorescence disparaît, ce qui signifie que la fluorescence observée est bien due à de la pyoverdine produite par la bactérie. En revanche, l'incubation de cette même souche avec de la pyoverdine purifiée ne permet pas de retrouver le marquage fluorescent, ce qui suggère que la fluorescence est plutôt due à un stockage périplasmique et non à un marquage de la membrane externe dû à la liaison d'apo-pyoverdine sur son récepteur de membrane externe FpvAI. En effet, le récepteur FpvAI est responsable de la reconnaissance et du transport du complexe pyoverdine-Fe dans la cellule et peut lier l'apo-pyoverdine fluorescente. Pour vérifier que le marquage observé n'est pas dû à un tel phénomène, une souche n'exprimant pas FpvA a été testée et montre un marquage périplasmique plus faible qu'une souche sauvage. FpvA étant le premier maillon de la cascade de signalisation permettant une expression des gènes de biosynthèse de la pyoverdine, cette moindre intensité pourrait être liée à une production de sidérophore nettement plus faible. Afin de s'affranchir de ce système, nous avons expérimenté sur une souche délétée à la fois sur FpvA et sur FpvR, le facteur anti-sigma impliqué dans la cascade de signalisation, laissant libre les facteurs sigma qu'il contrôle. Ceci a été suffisant pour retrouver un marquage similaire à celui d'une souche sauvage. Toutes ces données nous ont permis de démontrer que *P. aeruginosa* accumule de façon physiologique de la pyoverdine néo-synthétisée dans le périplasme.

La présence de fluorescence spécifiquement périplasmique suggère l'hypothèse d'une maturation de la pyoverdine dans ce compartiment, incluant la cyclisation du chromophore. Plusieurs enzymes, décrites comme essentielles à la production de la pyoverdine mais de fonction non identifiée, sont prédites être périplasmiques. Le rôle possible des protéines PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ dans la maturation de la pyoverdine a donc été étudié.

La délétion des gènes *pvdN*, *pvdO* et *pvdP* entraîne le même phénotype pour chacune des souches mutantes : en l'absence des enzymes PvdN, PvdO ou PvdP, aucune fluorescence correspondant à la pyoverdine mature n'est retrouvée ni dans les cinétiques de production, ni dans les mesures de sécrétion dans le milieu extracellulaire. Ceci montre qu'il n'y a pas de pyoverdine fluorescente produite et donc que le chromophore n'est pas cyclisé dans ces souches. Ce travail montre donc clairement que les protéines PvdN, PvdO et PvdP catalysent dans le périplasma une ou plusieurs étapes réactionnelles impliquées dans la cyclisation du chromophore ou dans une étape la précédent. Ceci démontre aussi que la cyclisation du chromophore a bien lieu dans le compartiment périplasmique.

Les données montrent également qu'en l'absence de PvdQ, un composé, que nous avons nommé PVDq, présentant des propriétés spectrales similaires à celles de la pyoverdine, est produit et sécrété par la bactérie. Cependant, PVDq ne migre pas sur membrane de nitrocellulose, contrairement à la pyoverdine, et présente une masse supérieure à la pyoverdine mature. Le composé fluorescent ainsi produit n'est pas donc de la pyoverdine, mais en est probablement le précurseur, ce qui montre que PvdQ est clairement impliqué et essentiel dans la maturation de la pyoverdine.

L'enzyme PvdQ ne serait pas impliquée directement dans la cyclisation du chromophore, puisque de la fluorescence est retrouvée à la fois dans le périplasma et dans le milieu extracellulaire, mais interviendrait plus tardivement.

Les cinétiques de production montrent une baisse mineure (-10%) de l'apparition de fluorescence, donc de production de précurseur, quand PvdQ est absent. En revanche, la quantité de fluorescence totale retrouvée dans le milieu extracellulaire après culture est drastiquement réduite, suggérant que le composé produit est moins fluorescent, possiblement à cause d'un chromophore incomplètement cyclisé ou formé. Notamment, PVDq chélate très mal le fer ou, alternativement, la chélation n'affecte pas la fluorescence. Dans la pyoverdine, la complexation du fer se fait à travers les atomes d'oxygène présents sur le dihydroxyquinoline du chromophore et les atomes d'oxygènes des hydroxamates des hydroxyornithines de la chaîne peptidique. La chaîne peptidique étant formée lors de la biosynthèse cytoplasmique, il paraît plus envisageable que le problème se situe au niveau du chromophore. Remarquablement, les mesures d'absorbances effectuées montrent un léger décalage du maximum d'absorption de cette

molécule, suggérant une différence mineure de structure du chromophore dans PVDq. Ces données suggèrent que le composé PVDq possède un chromophore formé au moins en partie, mais différent du chromophore final au niveau de ces groupes chélatants.

Par ailleurs, la masse retrouvée pour le composé produit par une souche délétée de *pvdQ* serait concordante avec la masse de la pyoverdine sur laquelle serait fixée une longue chaîne acylée (différence de masse moléculaire de 226 g.M<sup>-1</sup> environ).

L'enzyme PvdQ possède une activité acylase, démontrée expérimentalement chez *P.aeruginosa* (Huang et al., 2003; Huang et al., 2006; Sio et al., 2006). PvdQ serait une acylase spécifique aux longues chaînes, comprises entre 11 et 14 carbones (Huang et al., 2003; Sio et al., 2006). De plus, la structure de PvdQ de *P. aeruginosa* a été résolue par le groupe de W. Quax et montre un site actif profond, adapté aux acyles à longue chaîne (communication Nadal-Jimenez et al., Congrès Pseudomonas 2009, publiées depuis dans PNAS (Bokhove et al.)).

Cette queue acylée, ajoutée précocement dans le processus de biosynthèse, pourrait servir à ancrer la ferribactine et les formes précurseurs successives de pyoverdine à la membrane interne dès leur export vers le périplasme et les maintiendrait liées pendant les étapes de maturation. Lors des fractionnements cellulaires, on observe toujours une faible contamination du périplasme vers la fraction cytoplasmique, malgré le lavage à répétition des sphéroplastes. Cette contamination pourrait être due à une libération de ce précurseur fluorescent lors du cassage de la membrane interne. De plus, l'ajout d'acide dans un extrait de PVDq fait immédiatement précipiter l'échantillon, contrairement à un extrait de pyoverdine, preuve que la nature chimique de ces deux composés est différente.

Lors de la biosynthèse de la pyoverdine, dès l'assemblage par PvdL des 3 acides aminés L-Dab, L-Glu et D-Tyr constituant le chromophore, il est probable qu'une réaction supplémentaire ait lieu pour modifier le type de liaison rattachant la L-Glu, puisqu'il semble que cet acide aminé soit joint par un  $\alpha$ -carbone plus que par un  $\gamma$ -carbone. En effet, il a été montré que la L-Glu attachée à l'origine au D-Tyr par son groupe  $\gamma$ -carboxyl peut être transformé en acide  $\alpha$ -cétoglutarique, succinamide, malamide ou en acide hydroxylé libre (Schäfer et al., 1991). Plus récemment, un acide malique a été retrouvé attaché au chromophore (Budzikiewicz et al., 2007). Cependant, ni la position ni la composition exacte de cette chaîne acylée n'ont pu encore être établies.

Globalement, toutes ces données suggèrent fortement que le composé produit par une souche délétée de *pvdQ* est un précurseur de pyoverdine dont le chromophore est formé, au moins partiellement, et sur lequel pourrait être fixé une longue chaîne carbonée acylée.

L'analyse sur membrane de nitrocellulose du contenu périplasmique d'une souche sauvage montre la présence d'un précurseur majoritaire (PVDp) et d'un précurseur (PVDq) en quantité plus faible. Les expériences de transport de <sup>55</sup>Fe radioactif montrent que FpvAI reconnaît et transporte le précurseur PVDp, ce qui suggère que ce précurseur possède une structure assez proche de la molécule finale. Leur point isoélectrique est par ailleurs quasiment similaire, tandis que la masse de PVDp est légèrement inférieure (masse moléculaire de 1301,4 au lieu de 1334,6), ce qui laisse penser que ce précurseur PVDp est une pyoverdine à laquelle il manquerait une fonction chimique, sans que cela ne modifie de façon fondamentale les propriétés physico-chimiques globales de la molécule.

Dans nos conditions de culture en laboratoire, la quantité de précurseur stockée dans le périplasme est négligeable (évaluée à 2% environ) par rapport à la quantité de pyoverdine retrouvée dans le milieu extracellulaire. Cependant, en conditions naturelles où la dilution dans l'environnement des sidérophores peut être beaucoup plus importante, cette quantité de précurseur pourrait constituer une réserve, rapidement disponible et pouvant servir de variable d'ajustement, libérable en réponse à un signal moléculaire montrant qu'il y a du fer disponible et récupérable dans l'environnement.

Enfin, cette maturation périplasmique implique donc l'export à travers la membrane interne d'un précurseur cytoplasmique vers le périplasme. Le transporteur de membrane interne PvdE est décrit comme essentiel à la production de pyoverdine (McMorran et al., 1996).

L'utilisation de la microscopie de fluorescence *in vivo* permet de démontrer pour la première fois que l'action de PvdE se situe avant une phase de maturation périplasmique puisque lorsque PvdE est muté, il n'y a plus d'accumulation de fluorescence correspondant à de la pyoverdine ou son précurseur fluorescent dans le périplasme. Tout ceci indique que PvdE, localisé dans la membrane interne, est sur la voie de biosynthèse de la pyoverdine et que ce transporteur joue un rôle majeur dans la production de la pyoverdine.

PvdE appartient à la famille des transporteurs ABC de classe "export", ce qui suggère son rôle dans une fonction de sécrétion à travers la membrane interne d'un substrat encore non identifié. Ce substrat pourrait être la ferribactine, ce qui a été l'hypothèse envisagée, mais pourrait aussi être un autre précurseur de pyoverdine (pseudobactine) non fluorescent synthétisé dans le cytoplasme. Il est aussi possible, bien que moins probable, que PvdE serve au transport d'un autre facteur extracytoplasmique requis pour la synthèse de la pyoverdine. Dans tous les cas, ce résultat suggère que la maturation de la pyoverdine, et notamment la cyclisation du chromophore a lieu dans le périplasme.

Les précédentes études sur PvdE ne montraient pas de sécrétion de pyoverdine dans le milieu, alors que ce travail, on peut voir une très légère production et sécrétion de pyoverdine ou de précurseur fluorescent. Ceci est certainement dû à une différence de carence en fer dans les milieux de culture utilisés. Notre milieu minimum de type succinique est particulièrement carencé en fer, bien plus que les milieux de type King B plus couramment utilisés par d'autres groupes. Cette carence pourrait expliquer la faible production de pyoverdine non retrouvée auparavant. La faible proportion de pyoverdine retrouvée dans le milieu extracellulaire pourrait être due à une fuite ou une réversion de la mutation, ou à la possibilité qu'un autre transporteur de membrane interne puisse prendre partiellement le relais pour le passage du substrat de PvdE.

Il est notable que, même en l'absence de PvdE, il n'y ait aucune apparition de fluorescence dans le cytoplasme correspondant à une forme précurseur fluorescente de pyoverdine, ce qui confirme que la cyclisation du précurseur ne peut avoir lieu que dans le compartiment périplasmique.

En conclusion, grâce à la microscopie de fluorescence et au fractionnement cellulaire, nous avons mis en évidence une accumulation de pyoverdine dans le périplasme. Nous avons également démontré que des étapes de maturation tardives, catalysées par les enzymes PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ, ont lieu dans ce compartiment périplasmique. Une conséquence majeure à cela concerne le mécanisme de sécrétion de la pyoverdine vers le milieu extracellulaire, qui se fait nécessairement en deux étapes. La première étape implique le transporteur ABC PvdE qui est très probablement responsable de l'export d'un précurseur cytoplasmique de la pyoverdine à travers la membrane interne.



### **Export de la pyoverdine à travers la membrane externe**

---

Après avoir déterminé que la pyoverdine ou un de ces précurseurs s'accumule de façon physiologique dans le périplasma se posait une nouvelle problématique consistant à comprendre comment la pyoverdine est sécrétée à travers la membrane externe vers le milieu extracellulaire. La pyoverdine, comme les autres sidérophores, a un poids moléculaire trop important ainsi que des propriétés physico-chimiques qui ne lui permettent pas de diffuser de façon passive via les porines de la membrane externe. Elle doit donc être sécrétée de façon active par un système d'export spécialisé. Sur ce point, très peu de données sont disponibles dans la littérature que ce soit pour la voie pyoverdine ou pour d'autres sidérophores.

#### **2.1 Introduction du chapitre**

Concernant les quelques systèmes de sécrétion de sidérophores déjà identifiés, on peut relever un certain nombre de similitudes. Les systèmes identifiés sont toujours des pompes d'efflux de type MFS, principalement, ou de type ABC. L'expression de tous ces systèmes de sécrétion, à une exception près, sont régulés par le fer. Ils sont toujours codés au sein du locus dédié à la synthèse du sidérophore. En revanche, à l'exclusion de l'entérobactine chez *E. coli* qui utilise le canal de membrane externe TolC, pour tous les autres systèmes, seules les protéines impliquées dans la translocation à travers la membrane interne ont pu être identifiées (Bleuel et al., 2005).

Dans le cas de la pyoverdine, aucun système de sécrétion n'a, à ce jour, été identifié. Seule l'hypothèse de l'implication d'une pompe à efflux tripartite dans le mécanisme de sécrétion a été proposée. Les deux candidats potentiels suggérés successivement ont été le système d'efflux MexAB-OprM et l'opéron de gènes *PA2389* à *PA2391* (Ochsner et al., 2002b; Poole et al., 1993a). Cependant, aucun travail n'a permis de démontrer formellement si l'une de ces pompes avait un rôle dans la sécrétion de pyoverdine chez *P. aeruginosa*.

MexAB-OprM est une pompe d'efflux tripartite de type RND. C'est un système majeur pour la résistance intrinsèque aux drogues multiples et notamment les antibiotiques chez *P. aeruginosa* (Li et al., 1995; Poole, 2001a). Lors d'un criblage génétique, l'opéron *mexAB* a été trouvé complémenter le défaut de croissance d'une souche n'exprimant pas le récepteur de membrane externe FpvA (Poole et al., 1993a). Cet opéron a montré être inductible par des conditions de carence en fer à la fois dans *P. aeruginosa* et dans *E. coli*, tandis que des mutants des gènes *mexA* et *mexB* étaient incapables de pousser en milieu minimum contenant un chélateur du fer. Toutes ces données laissaient suggérer un possible rôle dans la sécrétion de la pyoverdine des protéines MexA et MexB (Poole et al., 1993a). Depuis, l'implication de la pompe d'efflux MexAB-OprM dans une fonction en lien avec la pyoverdine n'a jamais été confirmée.

L'opéron *PA2389-90-opmQ*, renommé ultérieurement dans ce travail *pvdRT-opmQ*, code pour un système d'efflux tripartite de la superfamille ABC. Cet opéron est caractérisé au niveau génétique par sa localisation au sein du locus « *pvd* ». De plus, l'expression de cet opéron est directement régulée par le facteur ECF- $\sigma$  spécifique PvdS et est donc corrélée avec l'expression des gènes de synthèse de la pyoverdine, suggérant fortement aux protéines codées un rôle en lien avec ce sidérophore (Ochsner et al., 2002b). Dans ce système d'export, le gène *pvdT* code pour la pompe d'efflux de type perméase ABC, insérée dans la membrane interne par 4 segments transmembranaires putatifs. Cette protéine possède tous les motifs conservés de la cassette de liaison à l'ATP et de son hydrolyse (Davidson and Chen, 2004). Le gène *opmQ* code pour une protéine canal de membrane externe de type TolC, avec un tonneau  $\beta$  inséré dans la membrane externe et une grande extension périplasmique. PvdR constitue la protéine de fusion membranaire et joue probablement le rôle de protéine adaptatrice du système d'efflux. Elle possède un signal d'export de type I et est prédite être périplasmique (Lewenza et al., 2005). Le domaine lipoyl conservé des protéines AcrA et MacA est également retrouvé dans PvdR.

La délétion du système PvdRT-OmpQ réduit mais n'abroge pas la sécrétion de pyoverdine (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b). Par ailleurs, les mutants de délétion de ce système sont capables de pousser sur boîte contenant de l'EDDHA, un puissant chélateur de fer (Ochsner et al., 2002b). Pour toutes ces raisons, cette pompe d'efflux n'a pas été étudiée plus tôt pour sa fonction de sécrétion de la pyoverdine.

Mon deuxième objectif durant cette thèse a donc été de déterminer l'implication de cette pompe putative dans la sécrétion de la pyoverdine et d'en comprendre son rôle exact. Les données obtenues ont permis l'implication de la pompe PvdRT-OmpQ à la fois dans la sécrétion de la pyoverdine néo-synthétisée et dans le recyclage de la pyoverdine ayant transporté le fer. Les articles sont présentés par ordre de publication, sans que cela ne corresponde forcément à l'ordre d'obtention des résultats.

## **2.2 Article 2 : Identification d'une pompe d'efflux impliquée dans le recyclage de la pyoverdine vers le milieu extracellulaire**

### **2.2.1 Introduction à l'article 2**

Le mécanisme de transport de la pyoverdine a été intensivement étudié au cours des quinze dernières années.

La reconnaissance, la liaison et le transport des complexes pyoverdine-Fe formés dans le milieu extracellulaire sont effectués principalement par FpvAI, le récepteur de membrane externe de la pyoverdine (Cobessi et al., 2005a; Greenwald et al., 2008; Poole et al., 1993b). Un second récepteur, FpvB, pourrait également procurer une contribution très mineure à l'acquisition du fer, dépendante de l'état physiologique et de la phase de croissance de la bactérie ((Ghysels et al., 2004) et données du laboratoire non publiées).

Une fois internalisé, le complexe pyoverdine-Fe est dissocié, probablement par une réduction du métal dans le périplasme, et l'apo-pyoverdine est recyclée dans vers le milieu extracellulaire par une voie et un mécanisme encore inconnu (Greenwald et al., 2007; Schalk et al., 2002). La pyoverdine recyclée n'est apparemment pas modifiée lors de la dissociation, puisqu'elle est à nouveau fonctionnelle pour la chélation et le transport du fer (Schalk et al., 2002).

Les données présentées dans cet article montrent que la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ identifiée est responsable du recyclage de la pyoverdine vers le milieu extracellulaire. Des résultats équivalents ont été obtenus en parallèle par une équipe concurrente (Imperi et al., 2009).

### **2.2.2 Résumé de l'article 2**

Dans le but de comprendre si la pompe d'efflux PvdRT-OmpQ était impliquée dans la sécrétion de la pyoverdine, nous avons étudié le comportement d'un mutant  $\Delta pvd\Delta PvdRT-OpmQ$ , qui ne produit pas de pyoverdine et dont les gènes de l'opéron d'efflux *pvdRT-opmQ* ont été délétés, en comparaison d'une souche témoin  $\Delta pvd$ .

Dans un premier temps, nous avons vérifié par des expériences de transport du fer radioactif que ces souches transportaient le fer de façon comparable. Les courbes

obtenues démontrent clairement que le transport du fer par la pyoverdine n'est pas affecté par l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ.

Après incubation des souches avec du complexe pyoverdine-Fe purifié, la quantité de pyoverdine libre relarguée dans le milieu extracellulaire a été mesurée à différents temps. La sécrétion dans le milieu extracellulaire de pyoverdine recyclée n'est observée que pour la souche exprimant la pompe PvdRT-OpmQ. Lorsque la pompe est absente, le recyclage est complètement aboli, suggérant que la pompe PvdRT-OpmQ est impliquée dans le recyclage de la pyoverdine dissociée dans le périplasme.

Enfin, le comportement cellulaire de ces 2 souches incubées avec différents complexes (pyoverdine-Fe et pyoverdine-Ga) a été observé par microscopie de fluorescence. En l'absence d'incubation de complexe, aucun signal n'est détecté sur ces souches qui ne produisent pas constitutivement de pyoverdine. L'ajout de complexe pyoverdine-Fe sur les souches mutantes pour la pompe PvdRT-OpmQ entraîne une accumulation périplasmique de fluorescence, ce qui confirme que la pyoverdine est dissociée (apparition de fluorescence) mais que celle-ci reste bloquée dans le compartiment périplasmique, suggérant le seul blocage du mécanisme de sécrétion.

Le Ga<sup>3+</sup> est un métal qui ne peut être réduit. De ce fait, le complexe pyoverdine-Ga, qui, contrairement au complexe pyoverdine-Fe, est fluorescent, ne peut se dissocier par un mécanisme impliquant une réduction du métal. L'incubation avec du complexe pyoverdine-Ga montre que l'accumulation de complexe non dissocié se fait dans le périplasme et non pas dans le cytoplasme, ce qui prouve que la dissociation prend bien lieu dans le périplasme. Toutes ces données suggèrent également que le substrat de la pompe PvdRT-OpmQ, c'est-à-dire la pyoverdine dissociée, est directement capté du périplasme.

En conclusion, cet article démontre clairement que la pompe PvdRT-OmpQ est la voie utilisée par *P. aeruginosa* pour recycler vers le milieu extracellulaire la pyoverdine issue de la dissociation du complexe pyoverdine-Fe internalisé. Cette dissociation prend lieu dans le périplasme et la pyoverdine est probablement recyclée à partir de ce compartiment cellulaire.

### **2.2.3 Article 2**

# An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*

Emilie Yeterian,<sup>1</sup> Lois W. Martin,<sup>2</sup> Iain L. Lamont<sup>2\*</sup> and Isabelle J. Schalk<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>*Metaux et microorganismes: Chimie, Biologie et Applications. FRE 3211, CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry, University of Otago, PO Box 56, Dunedin, New Zealand.*

## Summary

Pyoverdine (PVDI) is a siderophore produced by *Pseudomonas aeruginosa* in order to obtain iron. This molecule is composed of a fluorescent chromophore linked to an octapeptide. Following secretion from the bacteria, PVDI chelates iron ions and the resulting Fe-PVDI complexes are taken up by the bacteria through a cell surface receptor protein. The iron is released in the periplasm and the resulting PVDI is recycled, being secreted out of the bacteria by a previously unknown mechanism. Three genes with the potential to encode an efflux system are adjacent to, and coregulated with, genes required for PVDI-mediated iron transport. Mutation of genes encoding this efflux pump (named PvdRT-OpmQ) prevented recycling of PVDI from the periplasm into the extracellular medium. Fluorescence microscopy showed that in the mutant bacteria PVDI accumulated in the periplasm. Gallium (Ga<sup>3+</sup>), a metal that cannot be removed from PVDI by reduction, is taken up by *P. aeruginosa* when chelated by PVDI. Recycling did not occur after transport of PVDI-Ga<sup>3+</sup> and fluorescence accumulated in the periplasm even when the PvdRT-OpmQ efflux pump was functional. Cellular fractionation showed that PVDI-synthesizing bacteria lacking PvdRT-OpmQ secreted PVDI but had an approximately 20-fold increase in the amount of PVD present in the periplasm, consistent with an inability to recycle PVDI. Collectively, these data show that PvdRT-OpmQ is involved in recycling of PVDI from the periplasm to the extracellular medium and recycling requires release of the metal ion from PVDI.

Received 13 October, 2009; accepted 22 October, 2009. For correspondence. \*E-mail iain.lamont@otago.ac.nz; Tel. (+64) 3479 7869; Fax (+64) 3479 7866; \*\*E-mail isabelle.schalk@unistra.fr; Tel. (+33) 3 90 24 47 19; Fax (+33) 3 90 24 48 29.

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogenic Gram-negative bacterium that is widespread in the general environment. It causes a variety of human infections and is particularly dangerous for cystic fibrosis patients and immunocompromised patients such as those with human immunodeficiency virus, cancer or severe burn wounds. This bacterium like all living organisms needs iron to grow but iron has low bioavailability, both in the general environment and during infection (Braun and Killmann, 1999; Ratledge and Dover, 2000). To overcome the problem of iron bioaccessibility *P. aeruginosa*, like many other microorganisms, secretes high-affinity iron-chelating molecules termed siderophores that form very stable soluble complexes with Fe<sup>3+</sup> ions. These are internalized into the cells by specific cell surface receptors.

Strains of *P. aeruginosa*, like other fluorescent *Pseudomonads*, produce fluorescent siderophores called pyoverdines (PVDs). Currently, more than 60 different PVDs have been identified (Meyer *et al.*, 2008). All are comprised of three distinct structural parts: a quinoline-like chromophore, responsible for the colour and fluorescence of the molecule, a peptide chain comprising 6–12 amino acids bound to the carboxylic group of the chromophore and a dicarboxylic acid or dicarboxylic amide attached to position C-3 of the chromophore (Budzikiewicz, 1997). The composition and length of the peptide part is specific to the producer strain and may be linear, or partially or entirely cyclic (Abdallah and Pattus, 2000; Budzikiewicz, 2004). Strains of *P. aeruginosa* make one of three distinct PVDs (Meyer *et al.*, 1997) and PVD-mediated iron uptake is best understood in *P. aeruginosa* strain PAO1, which produces PVDI (reviewed in (Visca *et al.*, 2007; Schalk, 2008). The ferric form of this siderophore is imported across the outer membrane by a specific receptor, FpvA1 (Poole *et al.*, 1993; Cobessi *et al.*, 2005; Schalk, 2008), in a process involving the energy-transducing protein TonB1 (Poole *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2006). Iron is released from the siderophore in the periplasm by a mechanism thought to involve iron reduction, with recycling of the siderophore that can then transport another iron ion (Greenwald *et al.*, 2007).

The mechanism(s) of export of recycled PVDI, or of newly synthesized PVDI, is not well understood. The mechanisms of export of other siderophores have also

been less well studied than mechanisms for synthesis or iron uptake, but some secretion systems have been described. These belong to one of two major superfamilies of export pumps, the ATP-Binding Cassette (ABC) transporters (Seeger and van Veen, 2009) and the major facilitator superfamily (MFS) (reviewed in Fluman and Bibi, 2009). ExiT and IrtA that export siderophores from *Mycobacterium smegmatis* (Zhu *et al.*, 1998; Farhana *et al.*, 2008) and Pchl, the exporter of pyochelin in *P. aeruginosa* (Reimann *et al.*, 2001), are ABC transporters that are involved in the transport of the siderophores across the cytoplasmic membrane. MFS exporters known to be involved in siderophore export are EntS in *E. coli* (Furrer *et al.*, 2002), AlcS in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* (Brickman and Armstrong, 2005), YhcA in *Erwinia chrysanthemi* (Franza *et al.*, 2005), LbtB in *Legionella pneumophila* (Allard *et al.*, 2006), PvsC in *Vibrio parahaemolyticus* (Tanabe *et al.*, 2006), YmfE in *Bacillus subtilis* (Miethke *et al.*, 2008) and CsbX in *Azotobacter vinelandii* (Page *et al.*, 2003), which are involved in secretion of enterobactin, alcaligin, achromobactin, legiobactin, vibrioferrin, bacillibactin and protochelin-like siderophores respectively. In Gram-negative bacteria, following export into the periplasm by MFS proteins, other proteins must be involved in export out of the cell. For secretion of enterobactin in *E. coli*, following efflux by EntS (Furrer *et al.*, 2002), the transport across the outer membrane involves TolC (Bleuel *et al.*, 2005). In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium EntS is the major exporter of enterobactin into the periplasm but the ABC transporter IroC exports enterobactin as well as the structurally similar siderophore salmochelin, showing that a single siderophore can be exported by two different efflux systems (Crouch *et al.*, 2008).

The PVDI gene locus contains three genes PA2389-2391 that are co-regulated with PVDI synthesis genes (Ochsner *et al.*, 2002). The predicted products of PA2389-91 have high levels of sequence similarity with bacterial efflux systems (reviewed in Zgurskaya *et al.*, 2009) and in particular with the MacAB-TolC efflux system that confers resistance to macrolide antibiotics when overexpressed in *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2001). MacAB is also involved in the secretion of an *E. coli* heat-stable enterotoxin (Yamanaka *et al.*, 2008). The MacAB-TolC efflux system comprises an ATP-binding cassette (ABC) transporter protein (MacB) in the cytoplasmic membrane, an outer membrane channel TolC (Koronakis *et al.*, 2000) for release of the substrate into the extracellular environment, and a periplasmic 'adaptor' protein (also termed a membrane-fusion protein) MacA that connects the inner and outer membrane proteins. All three protein components are required for this export system to be functional.

Mutations in PA2389-91 do not prevent secretion of PVDI (Ochsner *et al.*, 2002; Lamont and Martin, 2003).

Here, we test the hypothesis that instead this efflux pump (here named PvdRT-OpmQ) recycles PVDI into the extracellular medium after this siderophore has released iron in the periplasm.

## Results and discussion

### *PvdRT-OpmQ as an efflux pump*

The *pvdRTopmQ* (PA2389-91) genes are adjacent to genes required for PVDI synthesis and transport and are predicted to encode proteins with all the characteristics of an efflux pump (Winsor *et al.*, 2009). PvdT (PA2390) has 43% sequence identity (63% similarity) to MacB and, like MacB, is predicted to have four membrane-spanning helices (Lewenza *et al.*, 2005). In MacB the first of these separates a predicted ATP-binding cytoplasmic domain from a large (~200 residue) periplasmic domain (Kobayashi *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). The ATP-binding cytoplasmic domain contains the Walker A (GxxGxGKST, residues 48–56) and B motifs (IILADE, residues 172–177), as well as the linker peptide (LSGGQQQRVS, residues 152–162) and the D (GALD, residues 180–183) and Q loops (FIFQ, residues 97–100) that are part of the nucleotide binding domain (NBD) characteristic of ATP-binding cassette transporters (Davidson and Chen, 2004). PvdR (PA2389) is predicted to be periplasmically located (Phobius (Kall *et al.*, 2007), available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/phobius/>), like other adaptor (MFP) proteins in efflux systems, and in a pairwise comparison has 34% sequence identity with MacA. OpmQ is predicted to comprise a porin-like  $\beta$ -barrel located in the outer membrane with a large periplasmic extension and has 49% sequence similarity to OprM, a well-characterized efflux system outer membrane protein (Akama *et al.*, 2004).

### *PvdRT-OpmQ is not required for uptake of PVDI-Fe*

Before testing whether the efflux pump PvdRT-OpmQ is involved in recycling of PVDI, we tested whether a *pvdRTopmQ* mutant is affected for its ability to incorporate iron. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* cells (Table 1) were incubated in the presence of PVDI-<sup>55</sup>Fe. Figure 1 shows that <sup>55</sup>Fe uptake by PAO1*pvdDpvdRTopmQ* is equivalent to that of PAO1*pvdD*. Iron incorporation was abolished in the presence of the protonophore CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), indicating that the uptake is TonB dependent (Clément *et al.*, 2004). Iron uptake occurred at similar rates with strains PAO1 and PAO1*pvdRTopmQ* (data not shown). Therefore, PvdRT-OpmQ is not required for PVDI-mediated iron acquisition by *P. aeruginosa*.

**Table 1.** *P. aeruginosa* strains and plasmids used in this study.

Strain/plasmid	Genotype/phenotype	Reference
<b>Strains of <i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	Wild-type	Laboratory stock; Stover <i>et al.</i> (2000)
PAO1 <i>pvdD</i>	Pvd <sup>-</sup> ; functional efflux pump	Ackerley and Lamont (2004)
PAO1 <i>pvdRTopmQ</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	This study
PAO1 <i>pvdDpvdRTopmQ</i>	Pvd <sup>-</sup> ; mutant efflux pump	This study
<b>Plasmids</b>		
pEX18Tc	Allele replacement vector; Tc <sup>R</sup>	Hoang <i>et al.</i> (1998)
pEX18Tc:Δ <i>pvdRTopmQ</i>	<i>pvdRTopmQ</i> deletion plasmid; Tc <sup>R</sup>	This study
pUCP19	DNA cloning vector; Cb <sup>R</sup>	West <i>et al.</i> (1994)
pUCP19: <i>pvdRTopmQ</i>	pUCP19 carrying the <i>pvdRTopmQ</i> operon	This study

Preparation, PCR amplification and *in vitro* manipulation of DNA was carried out using standard procedures as described previously (Yeterian *et al.*, 2009). All products and plasmid constructs were verified by DNA sequencing. Deletion of the *pvdRTopmQ* operon was engineered using pEX18Tc (Hoang *et al.*, 1998). Flanking DNA fragments were amplified by PCR with primers incorporating introduced restriction sites (Table S1), ligated together following treatment with restriction enzymes, and cloned into pEX18Tc. The deletions were transferred into the chromosome of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa* PAO1 *pvdD* (Ackerley and Lamont, 2004) by homologous recombination, replacing the wild-type genes, as described previously (Hoang *et al.*, 1998; Yeterian *et al.*, 2009).

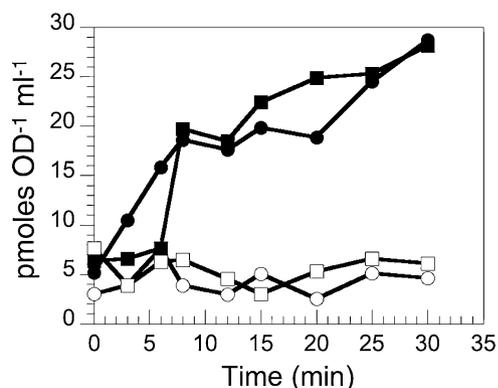
To construct plasmid pUCP:*pvdRTopmQ*, a DNA fragment spanning the entire operon was amplified from *P. aeruginosa* PAO1 genomic DNA using Expand DNA polymerase (Roche) in conjunction with PCR primers that include introduced EcoRI and HindIII restriction sites (Table S1). The resulting PCR product was digested with EcoRI and HindIII and cloned into pUCP19 (West *et al.*, 1994).

#### *PvdRT-OpmQ* exports recycled PVDI from the periplasm into the extracellular medium

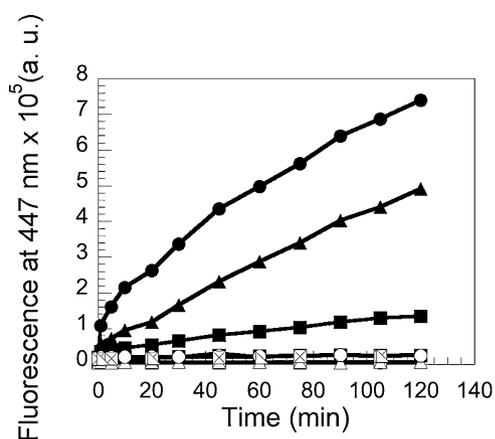
After being imported across the outer membrane by FpvA, PVDI–Fe is dissociated in the periplasm by a mechanism that is likely to involve an iron reduction, with the siderophore being recycled into the extracellular medium (Schalk *et al.*, 2002; Greenwald *et al.*, 2007). The role of PvdRT-OpmQ in recycling of PVDI was investigated. PAO1*pvdD*, PAO1*pvdDpvdRTopmQ* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (pUCP19:*pvdRTopmQ*) cells (Table 1) were incubated in the presence of PVDI–Fe. Since these cells are unable to produce PVDI, the only source of siderophore is the

PVDI–Fe complex added to the cells at the beginning of the experiment. Aliquots were collected at intervals, the cells removed and the amount of fluorescence in the growth medium monitored at 447 nm. Under the conditions used, PVDI is only fluorescent in its apo (iron-free) form, with fluorescence being quenched by iron binding (Schalk *et al.*, 1999; Folschweiller *et al.*, 2002). An increase in extracellular fluorescence was observed for PAO1*pvdD* cells (Fig. 2), which was absent in control samples without cells (data not shown), without PVDI–Fe or when the cells were incubated with CCCP as well as PVDI–Fe. This increase in fluorescence is due to recycling of metal-free PVDI from the periplasm into the extracellular medium after release of iron from PVDI–Fe in the bacteria (Schalk *et al.*, 2002). When the experiment was repeated with PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, the rate of increase in extracellular fluorescence was considerably lower (decrease of 80%) (Fig. 2), indicating that siderophore recycling was affected. When the mutation was complemented with a plasmid carrying the *pvdRTopmQ* genes PVDI recycling was restored although to a lower rate than for strain PAO1*pvdD*.

PVDI can be directly visualized in the periplasm of wild-type *P. aeruginosa* by fluorescent microscopy (Fig. 3A and previously described in Yeterian *et al.*, 2009) and also in the periplasm of PAO1*pvdRTopmQ* cells (Fig. 3E). Fluorescence is absent in PVDI-deficient mutants (PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, Fig. 3B and F). When PVDI-deficient cells were incubated with PVDI–Fe, fluorescent metal-free PVDI was detected in the periplasm by cellular fractionation (Greenwald *et al.*, 2007) but not by fluorescent microscopy (Fig. 3C), most likely because the amount of fluorescent PVDI was too low. However, when cells of the efflux pump mutant (PAO1*pvdDpvdRTopmQ*) were



**Fig. 1.** PVDI-<sup>55</sup>Fe uptake in PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ*. Cells of *P. aeruginosa* strains PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at 37°C. Transport assays were started by adding 100 nM PVD-<sup>55</sup>Fe prepared as described previously (Schalk *et al.*, 2001). Aliquots were removed at different times, filtered and the retained radioactivity counted. PAO1*pvdD*, ●; PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, ■. The experiment was repeated in the presence of 200 μM CCCP (PAO1*pvdD*, ○; PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, □).



**Fig. 2.** Involvement of PvdRT-OpmQ in recycling of PVDI. Bacterial cells were incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer, in the presence of 2  $\mu$ M PVDI-Fe at 30°C (PAO1pvdD, ●; PAO1pvdDpvdRTopmQ, ■ and PAO1pvdDpvdRTopmQ(pUCP19:pvdRTopmQ), ▲). Aliquots (1 mL) were collected at intervals, the cells removed and the fluorescence in the supernatant measured at 447 nm ( $\lambda_{\text{ext}} = 400$  nm) using a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrofluorometer. The experiment was repeated for PAO1pvdD in the absence of PVDI-Fe (◆) and for each strain in the presence of 200  $\mu$ M CCCP to inhibit PVDI-Fe uptake (PAO1pvdD, ○; PAO1pvdDpvdRTopmQ, □ and PAO1pvdDpvdRTopmQ(pUCP19:pvdRTopmQ), △). PVDI-Fe was prepared as described previously (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Folschweiller *et al.*, 2002).

incubated in the presence of PVDI-Fe, periplasmic fluorescence was clearly visible (Fig. 3G). This fluorescence is consistent with the presence of PVDI in the periplasm. These data show that in the PvdRT-OpmQ mutant, PVDI-Fe is transported into the bacteria and iron is released from the siderophore but there is greatly reduced secretion of the resulting metal free siderophore, which instead accumulates in the periplasm. When the efflux pump is functional, PVDI does not accumulate in the bacteria but instead is exported (Figs 2 and 3B).

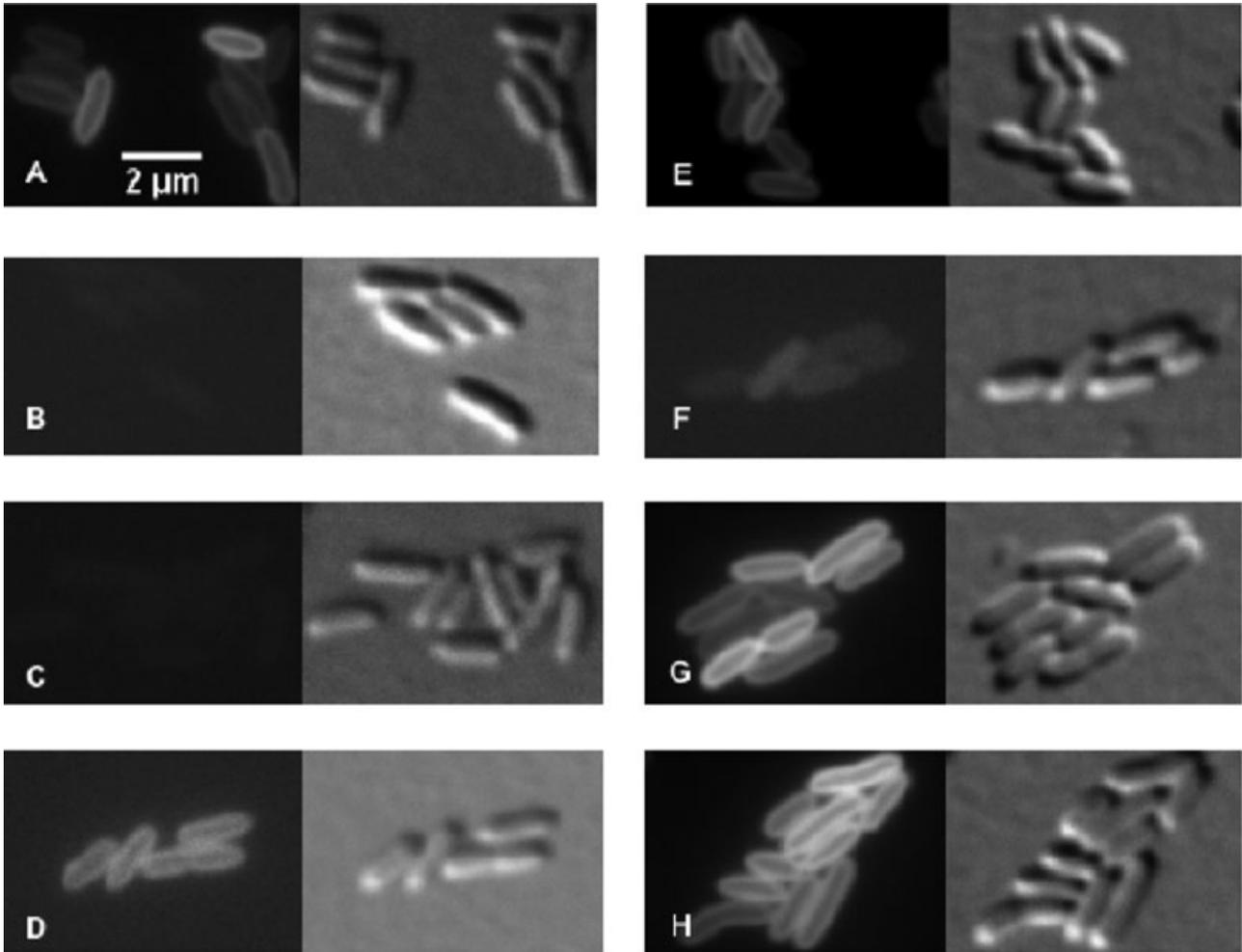
Fluorescence microscopy was also carried out with bacteria incubated in the presence of PVDI-Ga (Fig. 3D and H). Fluorescence accumulated in the periplasm even in bacteria with wild-type pvdRTopmQ. PVDI-Ga<sup>3+</sup> binds to FpvA with an affinity close to that of PVDI-Fe (K<sub>i</sub> of 16 nM; the K<sub>i</sub> for Fe<sup>3+</sup> is 6 nM under the same conditions) and is transported into *P. aeruginosa* (Folschweiller *et al.*, 2002). However, the PVD-Ga complex does not dissociate, most likely because Ga<sup>3+</sup> cannot be reduced. PVD-Ga is fluorescent (Folschweiller *et al.*, 2002). The accumulation of fluorescence in the periplasm of bacteria with a functional PvdRT-OpmQ efflux pump following incubation with PVDI-Ga (Fig. 3D) is consistent with a requirement for release of the metal from PVDI prior to recycling, most likely through metal reduction, as proposed previously (Greenwald *et al.*, 2007) and indicates that the PvdRT-OpmQ efflux system specifically secretes apo PVDI and not PVDI-Ga complexes. Moreover, it indi-

cates that PVDI-Fe dissociation occurs in the periplasm as suggested previously (Greenwald *et al.*, 2007).

All these data are consistent with a model in which iron in imported PVDI-Fe<sup>3+</sup> is reduced and then released from PVDI, with the resulting apo PVDI being recycled (secreted) by PvdRT-OpmQ. Ga<sup>3+</sup> cannot be reduced and the metal is apparently not released from PVDI (Greenwald *et al.*, 2007), and our data indicate that PVDI-Ga is not secreted or is secreted much more slowly by PvdRT-OpmQ. This implies that PvdRT-OpmQ secretes PVDI directly from the periplasm with no need for entry of the siderophore into the cytoplasm. Other efflux pumps also have the capacity to secrete substrate molecules from the periplasm (Nikaido and Takatsuka, 2009; Zgurskaya *et al.*, 2009).

#### Does PvdRT-OpmQ have a role in secretion of newly synthesized PVDI?

PVDI production was not prevented by deletion of pvdRTopmQ or any one of the genes encoding this efflux pump (Ochsner *et al.*, 2002; Lamont and Martin, 2003). Consistent with this, we found that after overnight culture PVDI is present in the extracellular medium of strain PAO pvdRTopmQ in amounts that are similar to wild-type bacteria (data not shown), showing that PvdRT-OpmQ is not essential for secretion of newly synthesized PVDI. The amount of PVDI in the periplasmic fraction of a pvdRTopmQ mutant was measured using fluorescence as described previously (Yeterian *et al.*, 2009), and surprisingly was found to be between 17 and 20 times the amount of PVDI in the periplasmic fraction of wild-type bacteria. However, the amount of PVDI accumulated in the periplasm of the mutant is less than 2% of the amount secreted into the extracellular medium. The periplasmic PVDI present in the PAOpvdRTopmQ mutant may be PVDI that has transported iron but not been recycled and could also be newly synthesized PVDI. Synthesis of this siderophore involves production of a non-fluorescent precursor that is synthesized in the cytoplasm and transported across the inner membrane by PvdE, an ABC transporter, with maturation of the precursor to form a functional chromophore in the periplasm (Yeterian *et al.*, 2009). The newly synthesized PVDI must then be transported from the periplasm into the extracellular medium. It is surprising that PvdRT-OpmQ is apparently not involved in the transport of this newly synthesized PVDI. *Pseudomonas aeruginosa* contains a large number of efflux pumps (Stover *et al.*, 2000) and it may be that PvdRT-OpmQ is involved in secretion of newly synthesized PVDI but when it is absent another efflux pump efficiently takes over the transport. Clearly, further studies will be necessary to understand the mechanisms involved in the secretion of newly synthesized PVDI.



**Fig. 3.** Visualization of periplasmic PVDI by fluorescence microscopy. For each pair of images the left picture was taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right with DIC (Differential Interference Contrast) filter (White bar = 2  $\mu$ m). The experiment was carried out with cells of strains PAO1 (A), PAO1*pvdD* (B, C, D), PAO1*pvdRTopmQ* (E) and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (F, G, H) without added siderophore (A, B, E and F) or following incubation for 45 min with 10  $\mu$ M PVDI-Fe (C, G) or PVDI-Ga (D, H) prior to mounting onto S750-agarose coated slides as described previously (Mascarenhas *et al.*, 2002). PVDI and PVDI-Fe and PVDI-Ga were prepared as described previously (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Folschweiller *et al.*, 2002). Images were acquired on a Lexica DM RXA2 (objective: Lexica HCX PL APO 100  $\times$  1.40–0.7 OIL CS) microscope with a photometric coolSNAP HQ camera. Images were captured using MetaMorph 6.0 (Universal Imaging). A twofold lower excitation intensity was used with PAO1*pvdRTopmQ* cells compared with PAO1, to avoid fluorescence saturation.

### Conclusion

The PvdRT-OpmQ system is required for recycling of PVDI from the periplasm into the growth medium following release of iron from imported PVDI-Fe by a mechanism likely to involve iron reduction. However, the PvdRT-OpmQ system was not required for secretion of newly synthesized PVDI that must be transported by another system. Further studies will be necessary to identify the secretion pathway of newly synthesized PVDI.

### Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and a grant from the ANR

(Agence Nationale de la Recherche, N°ANR-08-BLAN-0315-01). E. Yeterian had a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie.

### References

- Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2000) Siderophores and iron-transport in microorganisms. *J Chin Chem Soc* **47**: 1–20.
- Ackerley, D.F., and Lamont, I.L. (2004) Characterization and genetic manipulation of peptide synthetases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in order to generate novel pyoverdines. *Chem Biol* **11**: 971–980.
- Adams, H., Zeder-Lutz, G., Greenwald, J., Schalk, I.J., Céilia, H., and Pattus, F. (2006) Interaction of TonB with outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 5752–5761.

- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., *et al.* (2004) Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* **279**: 52816–52819.
- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**: 6391–6402.
- Allard, K.A., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (2006) IbtA and IbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J Bacteriol* **188**: 1351–1363.
- Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G.J., *et al.* (2005) TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6701–6707.
- Braun, V., and Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104–109.
- Brickman, T.J., and Armstrong, S.K. (2005) *Bordetella* AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J Bacteriol* **187**: 3650–3661.
- Budzikiewicz, H. (1997) Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z Naturforsch [C]* **52**: 713–720.
- Budzikiewicz, H. (2004) Siderophores of the *Pseudomonadaceae sensu stricto* (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr Chem Org Naturst* **87**: 81–237.
- Clément, E., Mesini, P.J., Pattus, F., Abdallah, M.A., and Schalk, I.J. (2004) The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* **43**: 7954–7965.
- Cobessi, D., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2005) The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J Mol Biol* **34**: 121–134.
- Crouch, M.L., Castor, M., Karlinsky, J.E., Kalhorn, T., and Fang, F.C. (2008) Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **67**: 971–983.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241–268.
- Farhana, A., Kumar, S., Rathore, S.S., Ghosh, P.C., Ehtesham, N.Z., Tyagi, A.K., and Hasnain, S.E. (2008) Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of *Mycobacterium tuberculosis* unravel its role in trafficking of iron. *PLoS One* **3**: e2087.
- Fluman, N., and Bibi, E. (2009) Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 738–747.
- Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M.A., Pattus, F., and Schalk, I.J. (2002) The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* **41**: 14591–14601.
- Franza, T., Mahe, B., and Expert, D. (2005) *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol* **55**: 261–275.
- Furrer, J.L., Sanders, D.N., Hook-Barnard, I.G., and McIntosh, M.A. (2002) Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**: 1225–1234.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L.A., Graumann, P.L., and Schalk, I.J. (2007) Real-time FRET visualization of ferric-pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J Biol Chem* **282**: 2987–2995.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P. (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86.
- Kall, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L. (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction – the Phobius web server. *Nucleic Acids Res* **35**: W429–W432.
- Kobayashi, N., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001) Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5639–5644.
- Kobayashi, N., Nishino, K., Hirata, T., and Yamaguchi, A. (2003) Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **546**: 241–246.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914–919.
- Lamont, I.L., and Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**: 833–842.
- Lewenza, S., Gardy, J.L., Brinkman, F.S., and 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.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V., and Graumann, P.L. (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J* **21**: 3108–3118.
- Meyer, J.M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997) Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143**: 35–43.
- Meyer, J.M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M., and Budzikiewicz, H. (2008) Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* **21**: 259–271.
- Miethke, M., Schmidt, S., and Marahiel, M.A. (2008) The major facilitator superfamily-type transporter YmfE and the multidrug-efflux activator Mta mediate bacillibactin secretion in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**: 5143–5152.

- Nikaido, H., and Takatsuka, Y. (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 769–781.
- Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., and 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.
- Page, W.J., Kwon, E., Cornish, A.S., and Tindale, A.E. (2003) The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS Microbiol Lett* **228**: 211–216.
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K., and Heinrichs, D.E. (1993) Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 4597–4604.
- Poole, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., and Dean, C.R. (1996) The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology* **142**: 1449–1458.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881–941.
- Reimann, C., Patel, H.M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C.T., and Haas, D. (2001) Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 813–820.
- 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., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (1999) Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **38**: 9357–9365.
- Schalk, I.J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2001) Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol Microbiol* **39**: 351–360.
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2002) Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **41**: 1663–1671.
- Seeger, M.A., and van Veen, H.W. (2009) Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 725–737.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959–964.
- Tanabe, T., Nakao, H., Kuroda, T., Tsuchiya, T., and Yamamoto, S. (2006) Involvement of the *Vibrio parahaemolyticus pvsC* gene in export of the siderophore vibrioferrin. *Microbiol Immunol* **50**: 871–876.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22–30.
- West, S.E., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81–86.
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E., and Brinkman, F.S. (2009) *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D483–488.
- Xu, Y., Sim, S.H., Nam, K.H., Jin, X.L., Kim, H.M., Hwang, K.Y., *et al.* (2009) Crystal structure of the periplasmic region of MacB, a noncanonic ABC transporter. *Biochemistry* **48**: 5218–5225.
- Yamanaka, H., Kobayashi, H., Takahashi, E., and Okamoto, K. (2008) MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J Bacteriol* **190**: 7693–7698.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., and Schalk, I.J. (2009) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* (in press).
- Zgurskaya, H.I., Yamada, Y., Tikhonova, E.B., Ge, Q., and Krishnamoorthy, G. (2009) Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 794–807.
- Zhu, W., Arceneaux, J.E., Beggs, M.L., Byers, B.R., Eisenach, K.D., and Lundrigan, M.D. (1998) Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes. *Mol Microbiol* **29**: 629–639.

### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Oligonucleotide primers used in this study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



## 2.2.4 Discussion de l'article 2

Les mécanismes de transport de la pyoverdine ont été très étudiés au laboratoire. Les travaux d'Isabelle Schalk ont précédemment permis de montrer qu'une fois le complexe pyoverdine-Fe dissocié, la pyoverdine est recyclée vers le périplasme dans sa forme native (Schalk et al., 2002). La voie de ce recyclage restait jusqu'à présent non identifiée.

L'étude du locus « Pvd » a permis d'identifier une pompe d'efflux à 3 composants, PvdRT-OpmQ. Cette pompe est codée en opéron, permettant aux gènes d'être co-exprimés. Les systèmes tripartites bactériens sont communément responsables de la sécrétion de petites molécules telles que des antibiotiques. La PvdRT-OpmQ identifiée présente de fortes similarités de séquences avec le système d'efflux MacAB-TolC, qui est impliqué dans la sécrétion d'une entérotoxine chez *E.coli* (Yamanaka et al., 2008). Les analyses de séquence de chacun des composants a permis de classer cette pompe dans la famille des transporteurs de type ABC, la protéine PvdR possédant tous les motifs caractéristiques de la signature ABC (Rees et al., 2009).

En adéquation avec sa localisation génomique, la fonction de sécrétion de cette pompe pour le sidérophore pyoverdine a été étudiée. La sécrétion mesurée dans le milieu extracellulaire reflète pour une part la production intrinsèque de pyoverdine par la bactérie et d'autre part la pyoverdine recyclée. Afin de discerner chacune des deux contributions, on peut utiliser soit des souches incapables de produire la pyoverdine, soit des souches incapables de transporter le fer.

Dans cet article, nous avons choisi d'étudier premièrement la capacité de recyclage de cette pompe. Le gène PvdD est essentiel à la synthèse du squelette carboné de la pyoverdine (Merriman et al., 1995). En conséquence, les souches délétées de ce gène sont pyoverdines déficientes et permettent de s'affranchir de la production intrinsèque de la bactérie.

Les premières expériences de transport de complexes pyoverdine-Fe radioactifs montrent que la délétion de l'opéron *pvdRT-opmQ* n'empêche pas le transport, avec des profils de courbes similaires à la souche de référence. Ceci indique que la délétion de la pompe PvdRT-OpmQ n'affecte pas le processus de transport du complexe ferripyoverdine.

Nous avons alors testé ces souches dans leur capacité de recyclage en mesurant la sécrétion extracellulaire de pyoverdine recyclée (fluorescente) après incubation avec des complexes pyoverdine-Fe (non fluorescents). En effet, comme cela a été montré

précédemment, le recyclage de la pyoverdine dissociée dans la bactérie se traduit par une augmentation de fluorescence dans le surnageant (Schalk et al., 2002).

Lorsque la pompe PvdRT-OpmQ est absente, il n'y a quasiment pas d'apparition de fluorescence dans le milieu extracellulaire due au relargage de pyoverdine libre. La courbe de mesure de fluorescence est similaire au profil observé en l'absence de transport, bloqué par du CCCP, un protonophore qui empêche l'utilisation par TonB du gradient électrochimique de la membrane nécessaire au transport. Cependant, tout défaut de transport ayant été éliminé, l'absence de sécrétion n'est pas due à un tel phénomène, suggérant que cette pompe PvdRT-OpmQ est impliquée dans le recyclage de la pyoverdine ou, alternativement, que la pyoverdine ne peut pas être dissociée dans la cellule. La complémentation de cette souche permet de rétablir le recyclage, confirmant que la mutation est à l'origine du phénotype observé.

La pyoverdine est recyclée dans le milieu extracellulaire, après avoir été dissociée du fer probablement par un mécanisme impliquant une réduction du métal dans le périplasma (Greenwald et al., 2007). En effet, l'équipe avait précédemment montré par fractionnement cellulaire que, lorsque la souche sauvage est incubée en présence de pyoverdine-Ga, le sidérophore n'est plus dissocié du métal et n'est plus recyclé dans le milieu extracellulaire, tandis qu'une accumulation périplasmique de pyoverdine-Ga est observée.

Dans ce travail, l'utilisation de la microscopie de fluorescence permet encore une fois de localiser *in vivo* l'apparition de fluorescence due à la pyoverdine. Lorsque le double mutant pour la production de pyoverdine et pour la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ est incubé avec du complexe pyoverdine-Fe, on observe une accumulation périplasmique de fluorescence, ce qui signifie que le complexe est bien transporté et dissocié, mais que la pyoverdine libre, donc fluorescente, ne peut pas être recyclée. L'incubation avec de la pyoverdine-Ga, complexe transportable mais non dissociable, montre une accumulation de fluorescence dans le périplasma, et non pas dans le cytoplasme, dans un mutant de délétion de la pompe et dans sa souche de référence, ce qui apporte la preuve que la dissociation de la ferripyoverdine prend lieu dans le périplasma. Ces expériences suggèrent également que le recyclage se fait à partir du compartiment périplasmique et que la pompe PvdRT-OpmQ est capable de capter la pyoverdine directement du périplasma.

Par ailleurs, le fait que des homologues au système PvdRT-OpmQ soient retrouvés dans tous les génomes des *Pseudomonas* fluorescents déjà séquencés suggère que le recyclage de la pyoverdine représente une stratégie générale de sauvegarde d'énergie adoptée par les populations de *Pseudomonas* naturels.

Enfin, ce travail permet également d'apporter un éclairage plus spécifiquement sur le mécanisme de transport. Le complexe pyoverdine-Fe est transporté dans la cellule par son récepteur de membrane externe FpvAI. Si les mécanismes de reconnaissance et de liaison au niveau du récepteur sont relativement bien compris, la translocation en elle-même reste encore sujette à débat. Les deux hypothèses principales évoquent soit un changement de conformation du bouchon permettant la formation d'un canal, soit le déplacement du bouchon vers le périplasma (Eisenhauer et al., 2005; Ma et al., 2007). Dans le cas de cette dernière hypothèse, il a été suggéré que la pyoverdine pouvait rester liée au récepteur pendant l'étape de dissociation et être recyclée par le transporteur FpvA lui-même, lors de son retour à sa conformation initiale. Le fait que la pyoverdine soit recyclée par la pompe PvdRT-OpmQ, donc une voie différente de celle de l'entrée, implique que le complexe pyoverdine-Fe est entièrement internalisé dans le périplasma.

En conclusion, cet article a permis l'identification de la voie empruntée par la pyoverdine pour son recyclage vers le milieu extracellulaire, mais apporte aussi des éléments essentiels sur les mécanismes de transport du fer.

Toutes ces données démontrent qu'après avoir été reconnus et transportés par le récepteur de membrane interne FpvAI, les complexes pyoverdine-Fe sont complètement internalisés et dissociés dans le périplasma, avant d'être recyclés dans le milieu extracellulaire par la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ.

Ces données démontrent également que cette pompe reconnaît la pyoverdine comme l'un de ces substrats, mais aussi qu'elle est capable de transporter ce sidérophore du périplasma vers le milieu extracellulaire.

## **2.3 Article 3 : Implication de la pompe PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la pyoverdine nouvellement synthétisée**

### **2.3.1 Introduction à l'article 3**

Concernant la voie de sécrétion de la pyoverdine néo-synthétisée, il n'existe quasiment pas de données dans la littérature, mis à part l'hypothèse de l'implication de l'une des 2 pompes d'efflux MexAB-OprM et PvdRT-OpmQ.

Très rapidement, la possibilité d'un rôle de MexAB-OprM dans la sécrétion de pyoverdine a pu être éliminée au cours d'expérimentations préliminaires.

Nous avons précédemment montré que la maturation de la pyoverdine est périplasmique, ce qui suggère que la sécrétion doit se faire à partir de ce compartiment cellulaire.

Par ailleurs, les premières données concernant la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ ont montré que la molécule de pyoverdine recyclée est spécifiquement reconnue et sécrétée à partir du périplasme par cette pompe.

Outre que le fait que l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ entraîne un défaut partiel de sécrétion dans le milieu extracellulaire (Ochsner et al., 2002b), nos résultats préliminaires montraient que l'absence de cette pompe entraînait également une rétention spécifiquement périplasmique de fluorescence. Cette suraccumulation cellulaire est très importante (jusqu'à 20 fois la quantité accumulée par une souche sauvage) et peut difficilement être expliquée par le seul recyclage dans un milieu extrêmement carencé en fer.

Par ailleurs, la pompe PvdRT-OpmQ est le seul système d'efflux codé dans le locus « pvd » et susceptible, de part son contexte génétique, d'avoir un rôle dans la sécrétion du sidérophore pyoverdine néo-synthétisé. De façon remarquable, pour les sidérophores dont le système de sécrétion a été identifié, les gènes codant ces systèmes sont généralement retrouvés dans le locus dédié à la synthèse du sidérophore et sont régulés par le fer.

Le débat sur l'implication de cette pompe dans la sécrétion de pyoverdine néo-synthétisée restait donc largement ouvert.

Cependant, le fait que la pyoverdine recyclée puisse s'accumuler dans le périplasme en l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ ne permettait plus de discriminer la part de recyclage et la part de pyoverdine néosynthétisée dans la suraccumulation observée. Des expérimentations supplémentaires ont donc été nécessaires pour évaluer les impacts de chacune des contributions à cette suraccumulation périplasmique. Pour cela, la souche délétée à la fois des gènes de la pompe *pvdRT-opmQ* et des gènes des

récepteurs de membrane externe *fpvA* et *fpvB* ont été construites afin d'abolir la porte d'entrée du recyclage, et donc le recyclage.

Cet article permet de montrer que la pyoverdine synthétisée de novo est sécrétée par la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ, mais aussi d'apporter quelques éléments supplémentaires sur les dernières étapes de maturation de la pyoverdine.

Les dernières expérimentations liées à ce travail ont été réalisées par Mélissa Hannauer, aidée pour l'analyse des masses par Gaëtan Mislin, membres du laboratoire.

### **2.3.2 Résumé de l'article 3**

Deux mutants du système d'efflux MexAB-OprM ont été testés dans leur capacité de sécrétion de la pyoverdine (Poole, 2003). Pour l'un, un gène codant pour une protéine de la pompe a été délété, pour le second le système de régulation génique de la pompe a été muté induisant une surproduction de la pompe. Cependant, pour aucun de ces mutants n'a été observé en fluorescence une diminution de la production et/ou de la sécrétion de la pyoverdine, permettant d'exclure un rôle de la pompe MexAB-OprM dans la sécrétion de la pyoverdine (une partie des données ne sont pas publiées).

En revanche, lorsque la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ ou l'un de ses composants est muté, la quantité de fluorescence de la fraction périplasmique isolée par fractionnement est multipliée par vingt environ en comparaison de la quantité physiologique retrouvée dans une souche sauvage. Cette suraccumulation périplasmique est aussi retrouvée en microscopie de fluorescence par une nette augmentation de l'intensité du signal de fluorescence émis.

Afin de vérifier que cette suraccumulation n'est pas due uniquement à un défaut de recyclage par la pompe d'efflux, le double mutant à la fois de la pompe et du récepteur de membrane externe *FpvA* a été testé. Le résultat est moins net en fractionnement qu'en microscopie, mais montre toujours une accumulation de fluorescence au moins doublée dans le périplasma de cette souche, ce qui suggère que la pompe PvdRT-OpmQ est aussi impliquée dans la sécrétion de pyoverdine néo-synthétisée.

Les cinétiques de production de pyoverdine sont diminuées en l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ, ce qui signifie qu'au moins une étape de la chaîne de biosynthèse ou de sécrétion est ralentie par la mutation.

La sécrétion dans le milieu extracellulaire étant également diminuée, toutes ces données suggèrent fortement une implication de la pompe PvdRT-OpmQ dans la sécrétion active de pyoverdine néo-synthétisée.

Enfin, les analyses de spectrométrie de masse montrent qu'en fait, dans le double mutant  $\Delta FpvA\Delta PvdRT-OpmQ$  mais pas dans un simple mutant  $\Delta PvdRT-OpmQ$ , la bactérie relargue un mélange de pyoverdine (minoritaire) et d'un de ces précurseur fluorescent (majoritaire) déjà identifié dans l'article 1, nommé PVDq, puisqu'il s'agit du produit sécrété en l'absence de l'enzyme périplasmique PvdQ. Ceci suggère qu'il existerait un lien entre le transport de ferripyoverdine et l'activité de l'enzyme PvdQ.

La séparation sur gradient de sucrose montre que ce précurseur est aussi largement retrouvé inséré dans les membranes externes et internes, confirmant l'hypothèse du premier article concernant la présence d'une longue chaîne carbonée acylée fixée au précurseur PVDq.

### **2.3.3 Article 3**

**Secretion of newly synthesized pyoverdine involves efflux pump PvdRT-OpmQ in**

*Pseudomonas aeruginosa*

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

<sup>b</sup>Department of Biochemistry, University of Otago, PO Box 56, Dunedin, New Zealand.

Running head: Pyoverdine secretion by an RND efflux pump

To 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 90 24 47 19; Fax: 33 3 90 24 48 29; E-mail: [isabelle.schalk@unistra.fr](mailto:isabelle.schalk@unistra.fr).

## ABSTRACT

High affinity iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is mediated by the fluorescent siderophore, pyoverdine (PVDI). The biosynthesis of this chelator begins in the cytoplasm and ends in the periplasm with the transport of a non-fluorescent precursor across the inner membrane by probably the ABC transporter PvdE. Concerning the secretion of PVDI from the periplasm into the extracellular medium it was shown that the efflux pump PvdRT-OpmQ recycles into the extracellular medium, PVDI, which has already transported iron from the extracellular medium into the periplasm via the outer membrane transporter FpvA, but was not involved in secretion of newly synthesized PVDI. In the present work, when the amount of PVDI produced was monitored by fluorescence in function of time, a 30 % decrease was observed with a PvdRT-OpmQ mutant compared to PAO1. In parallel, epifluorescence microscopy showed a clear accumulation of fluorescent siderophore in the periplasm in double PvdRT-OpmQ and FpvA mutants, unable to transport ferriPVDI. This accumulation of fluorescent siderophore is apparently due to the inability of the PvdRT-OpmQ mutant to secrete efficiently by another system the newly synthesized PVDI. Analysis of the siderophores secreted by different PAO1 mutants by mass spectrometry indicated: secretion of PVDI for PAO1, PAO1 $\Delta$ *pvdRT-opmQ* and PAO1 $\Delta$ *fpvA*, and no more PVDI secretion but secretion of a precursor for PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ*, suggesting again a role of this efflux system in PVDI secretion. Collectively, these data suggest an implication of PvdRT-OpmQ in both, the secretion of newly synthesized PVDI and in the recycling of PVDI having transported iron into the bacterial periplasm.

To get access to iron, many microorganisms secrete high-affinity iron-chelating molecules termed siderophores that form very stable soluble complexes with  $\text{Fe}^{3+}$  ions. These are internalized into the cells by specific cell-surface receptors. Fluorescent Pseudomonads, produce fluorescent siderophores called pyoverdines (PVDs) and so far, more than 60 different PVDs have been described (1). All are comprised of three distinct structural parts: a quinoline chromophore derived from 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline that confers color and fluorescence to the molecule, a peptide chain comprising 6-12 amino acids bound to the carboxylic group of the chromophore and a dicarboxylic acid or dicarboxylic amide attached to position C-3 of the chromophore (2). The peptide differs among strains by the number, composition, and configuration of amino acids (3). Strains of *P. aeruginosa* make one of three distinct PVDs (PVDI, II and III (4)) and PVD-synthesis is best understood in *P. aeruginosa* strain PAO1, which produces PVDI. However, available evidence indicates that analogous biosynthetic pathways give rise to other PVDs in other strains and species (reviewed in (5)). PVDI synthesis involves first the assembling in the cytoplasm of a non fluorescent precursor by nonribosomal peptide synthetases (NRPSs), with other enzymes giving rise to the substrates (common and non-common amino acids) for the NRPS enzymes (5). The transport of the non-fluorescent precursor across the inner membrane involves PvdE, which is an “export” ABC transporter essential for PVDI production (6-8). Afterwards, different steps of PVDI maturation occur in the periplasm with among them formation of the chromophore, that confers fluorescence to the siderophore (6). Fluorescent microscopy and chemical analyzes of the siderophore content of the periplasm indicated that a fluorescent precursor, PVDIp, is stored in this cell compartment (6). Mutation of periplasmic enzymes PvdN, PvdO and PvdP abolished accumulation of this precursor in the periplasm and PVDI production (6), indicating the involvement of these proteins in the chromophore formation or in a step preceding it. Final

maturation or synthesis of PVDI, involving the periplasmic enzyme PvdQ, occurs just prior to secretion into the extracellular medium (6).

The mechanism of export of PVDs across the outer membrane is not well understood. *PvdRT-opmQ* genes located in *pvd* locus and co-expressed with PVDI synthesis genes (9) code for an efflux pump involved in the recycling of PVDI into the extracellular medium (10, 11) after PVDI-Fe uptake across the outer membrane (12-14) and iron release into the periplasm (11, 15). PvdRT is of the same family as MacAB, with PvdT being the inner membrane protein and PvdR the periplasmic adaptor. OpmQ is predicted to comprise a porin-like  $\beta$ -barrel located in the outer membrane with a large periplasmic extension. Surprisingly, mutations of PvdRT-OpmQ do not prevent secretion of newly synthesized PVDI (10, 11, 16, 17). Another efflux pump (MexAB-OprM) has also been proposed to be involved in PVDI secretion (18) but its role has been recently refuted. The mechanisms of export across the outer membrane of other siderophores have also been less well studied than mechanisms for synthesis or ferrisiderophore uptake. For secretion of enterobactin in *E. coli*, following efflux by EntS (19) into the periplasm, the transport across the outer membrane involves TolC (20). For all other known siderophores, only the proteins involved in the translocation across the inner membrane have been identified but not those involved in the transport across the outer membrane.

In the present work, we show that PvdRT-OpmQ does not only recycle PVDI having transported iron, but is also involved in the secretion of newly synthesized PVDI. In a strain unable to transport PVDI-Fe and therefore, which has no accumulation of PVDI due to iron uptake, fluorescent PVDI accumulated in the periplasm of cells in the absence of PvdRT-OpmQ expression (PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ*). Moreover, such a mutant released in the extracellular medium no more PVDI but a precursor.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals.** Chemicals were purchased from Sigma unless otherwise stated. PVDI was prepared as described previously (21, 22).

**Bacterial strains and growth.** The strains of *P. aeruginosa* used in this study are described in Table 1. Strains were grown at 30°C in succinate medium (composition in g/L is: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; sodium succinate, 4.0 and the pH was adjusted to 7.0 by addition of NaOH, ).

### Genetic manipulations.

Strain *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta fpvA \Delta pvdRTopmQ$  was engineered by allele replacement of the wild-type *pvdRTopmQ* locus in PAO1  $\Delta fpvA$  using the deletion plasmid pEXTc:: $\Delta pvdRTopmQ$ , as described previously (11). Mutation of *fpvB* in PAO1 $\Delta fpvA$  and PAO1 $\Delta fpvA \Delta pvdRTopmQ$  was carried out using methods described previously for targeted gene deletion in *P. aeruginosa* (11, 23). Briefly, plasmid pEXGm:: $\Delta fpvB$  was constructed by amplifying PCR fragments upstream and downstream from *fpvB* using primers 5'-CGCAAGCTTGAAGTTGGAGACGCCGATCC-3'/5'-

CGCCTGCAGTGTCCCTGGATGGCG-3' (upstream) and 5'-

CGCCTGCAGGGACCGCCGGCGTGC-3'/ 5'-CGCGGATCCGGAGGCCCGGGCGAAG-3' (downstream) (introduced restriction sites shown in bold), digesting the resulting PCR

products with *Pst*I, and cloning the resulting DNA into pEXGm that had been digested with

*Hind*III and *Bam*HI. Sequencing of the resulting plasmid pEXGm $\Delta fpvB$  ensured the absence

of any unintended mutations. A kanamycin resistance cassette from pNRE1 (24) was cloned

into the unique *Pst*I site in pEXGm $\Delta fpvB$ , giving rise to pEXGm:: $\Delta fpvB$ ::Km.

pEXGm:: $\Delta fpvB$ ::Km was transferred into *P. aeruginosa* by conjugation from *E. coli*, and

subsequent deletion of the *fpvB* gene was obtained following sucrose selection. Bacteria containing the *fpvB* mutation were identified by PCR.

**Image acquisition.** Cells grown overnight in succinate medium were then mounted onto S750-agarose coated slides, as described previously (6, 11). Images were acquired on a on a Nikon 50i (objective : CFI Achroplan 100X A ON 1,25 DT 0,18) microscope with a numerique 12 bits DS-Fi1 camera. Images were captures using imaging software NIS elements.

**Cell fractionation.** Periplasm and cytoplasm fractions were prepared as described previously except for the incubation with 10  $\mu$ L of 100 mg/mL Lysozym (Euromedex), which was carried out at 0°C for 1 h. Spheroplasts were resuspended in 750  $\mu$ l of cold water by vortexing, and the resulting suspension was incubated for 1 h at room temperature with benzonase (1  $\mu$ l of a 50-fold dilution of benzonase  $\geq$ 250 units/ $\mu$ l from Sigma). The cytoplasmic fractions were isolated by ultracentrifugation (40 minutes at 120,000 g). Pellets were resuspended in about 3.5 ml of 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 % sucrose buffer, with a Potter-Elvehjem homogenizer. The resulting suspension was applied to the top of a sucrose gradient containing, from bottom to top: Tris-70% sucrose (4 ml), Tris-50% sucrose (4 ml) and (iii) Tris-20% sucrose (4 ml). The sucrose gradient was centrifuged in a Beckman SW40 rotor, at 35,000 rpm, for 15 hours. We then collected 1 ml fractions from the sucrose gradient. Fractions containing inner membranes and outer membranes were collected and analyzed by SDS-PAGE (12 % polyacrylamide gel)(data not shown) and by fluorescence.

**Fluorescence spectroscopy.** Fluorescence experiments were carried out using a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrofluorometer. To follow PVDI production, the cells, after overnight growth in iron-limited medium, were washed with 2 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and resuspended in the same buffer to a final OD<sub>600</sub> of 1, stirred in a 1 mL cuvette and the fluorescence monitored. The excitation wavelength ( $\lambda_{exc}$ ) was set at 400 nm, and the emission of fluorescence ( $\lambda_{em}$ ) was measured at 447 nm.

**Measurement of PVD production.** To follow the PVDI production during growth, PAO1 cells were washed once with succinate media, resuspended in the same buffer to a final OD<sub>600</sub> of 0.1 and incubated at 30°C. At different times, 1 mL aliquots were removed and the OD at 400 and 600 nm monitored. Afterwards, the cells were pelleted and the OD at 400 nm monitored in both, the supernatant (extracellular medium) and the cells resuspended in fresh succinate medium.

**Purification and characterization of PVDI and its precursors:** PVDI and its precursors were purified on a column of octadecylsilane (Lichroprep RP 18, 40-63  $\mu$ m, Merck) as described previously (6). Electrophoretic analysis of pyoverdines on cellulose acetate membranes (Midifilm, Biomidi) was carried out using a horizontal electrophoresis tank in 100 mM pyridin-acetic acid pH 5.0 at a constant voltage (300 V) for 30 min (21). Samples were analyzed using LC-MS at the Service de Spectrométrie de Masse de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg. Samples were dissolved in water at 10-5M concentrations, injected on an Agilent 1200RRLC fitted with a Thermo HypersilGold C18 column (1 x 3 x 1.9 cm) and analyzed in positive ESI mode performed on an Agilent 6520 Accurate mass QToF spectrometer.

## RESULTS

***PvdRT-OpmQ mutants accumulate newly synthesized PVDI in the periplasm.*** Previously it was shown that the peripheral fluorescence observed by in PAO1 cells is due to the presence of PVDI<sub>p</sub>, a PVDI precursor, which accumulates in the periplasm (6) and this fluorescence can be visualized by epifluorescence microscope, and quantified following cellular fractionation (Figure 1) (6, 11). Deletion of *pvdRT-opmQ* or of any one of the genes encoding this efflux pump resulted in an important increase of the fluorescence present in the periplasm compared to PAO1 (Figure 1). This could be visualized here by epifluorescence microscope by modulating the energy of the excitation wavelength. When excited with a low energy, the fluorescence in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants could still be seen by epifluorescence microscope but not anymore in PAO1 (Figure 1), indicating a higher amount of fluorescent siderophore in the periplasm of this strain compared to PAO1. This observation was confirmed by cellular fractionation (Figure 2). Complementation with pUCP22::*pvdRTopmQ* restored periplasmic fluorescence to wild-type levels (Figures 1 and 2). In Figure 2, small amounts of fluorescence (5 % of that found in the periplasm) were detected in the cytoplasm, most likely due to contamination from the periplasm during cellular fractionation as shown previously for PAO1 (6). All these data suggest that the siderophore accumulates in the periplasm instead of being secreted. Mutation of MexAB-OprM, which has been described previously as being involved in PVDI secretion (18), showed no increase of fluorescent siderophore in the periplasm (Figure 2), suggesting that this efflux pump is not involved in PVDI secretion.

The fluorescence accumulated in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants may be due to PVDI that has transported iron but could not be recycled as described previously with a *pvdRTopmQ* mutant unable to produce PVDI (strain *pvdRTopmQΔpvdD*, (10, 11)) and/or to accumulation of newly synthesized PVDI. Two PVDI-Fe outer membrane transporters have been described, FpvA and FpvB, however PVD-<sup>55</sup>Fe is in our experimental growth condition

transported only by FpvA (unpublished data). FpvA has been describe also as being involved in the regulation of PVD production (25), which explains that PAO1 $\Delta$ *fpvA* and PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvA* strains produce 70 % less PVD than PAO1 (Figure 3). Surprisingly, a double FpvA and FpvB mutant produced more PVDI than PAO1 $\Delta$ *fpvB*. In order to identify the origin of the fluorescence accumulated in the periplasm of strain PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ*, the experiment of fluorescent microscopy was repeated with strains unable to incorporate PVDI-Fe (PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvA* and PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvAfpvB*). Despite their inability to assimilate PVDI-Fe, these strains accumulated fluorescence in the periplasm, corresponding probably to newly synthesized siderophore (Figure 4A and 4B for epifluorescence microscopy and for cellular fractionation respectively). The epifluorescence microscopy approach showed a higher amount of periplasmic fluorescens in the efflux pump mutants than in PAO1 cells: when excited with an energy avoiding fluorescence saturation in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants, no more fluorescence was seen in the periplasm of PAO1 cells (Figure 4A). This suggests an accumulation of newly synthesized siderophore in the absence of PvdRT-OpmQ. Cellular fractionation data were less percussive, however an accumulation of fluorescence at 450 nm was observed for the PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvA* mutant, indicating as well that newly synthesized PVDI must accumulate in the periplasm. With the triple mutant PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvAfpvB*, we were unable to get spheroplasts and to separate the periplasm from the cytoplasm, because of complete unexplained cell lyses. According to the data presented in Figure 4, observation of single cells by fluorescence microscopy seems to be a more sensitive approach to study small fluorescence variation in bacteria, than the cellular fractionation approach, which monitors the fluorescence variation for a large amount of cells. The data presented in Figure 3 shows clearly this fluorescence variation is very small: the amount of fluorescence present in the cells or bound to them being very low compared to the large amount of fluorescent released into the extracellular medium even by *pvdRT-opmQ*

mutants. Moreover, spheroplasts preparation involves different steps and adds some other source of errors. However, both approaches, epifluorescence microscopy, which appeared to be highly sensitive, and cellular fractionation led us to hypothesize that PvdRT-OpmQ is required for secretion of newly synthesized PVDI as well as for PVDI recycling. However, since all the *pvdRT-opmQ* mutants studied in this work still produce fluorescent PVDI (Figure 3), in the absent PvdRT-OpmQ another system takes over the secretion of the siderophore but with a slightly lower efficiency.

***PvdRT-OpmQ* mutation affects siderophore production.** The total fluorescence (fluorescence present in the cells and fluorescence present in the extracellular medium) of resuspended cells was measured as a function of time (Figure 5). Since the fluorescence is due to the presence of the PVDI chromophore, this kinetic actually corresponds to the kinetic of chromophore formation in the bacterial cells. The rate of increase of fluorescence was greater for wild-type bacteria than for the *pvdRT-opmQ* mutant strain, and was increased to near-wild-type levels following complementation of the mutation by plasmid-borne *pvdRT-opmQ*. These data suggest that the rate of formation of PVDI is reduced by the *pvdRT-opmQ* mutation, at least in the first hours of culture growth. After 24 hours culture in succinate medium, a culture of *pvdRtopmQ* is green like a PAO1 culture when observed with naked eyes. However, when the fluorescence is monitored there is a difference in the amount of PVDI produced (Figure 3B): PAO1*pvdRtopmQ* produces 30 % less PVDI than PAO1. Mutation of MexAB-OprM showed no decrease in the amount of PVDI produced (data not shown), suggesting again that this efflux pump is not involved in PVDI secretion.

**PAO1 $\Delta$ *pvdRtopmQ* $\Delta$ *fpvA* secretes a PVDI precursor and no PVDI.** Previous studies have shown that mutation in *Bacillus subtilis*, of the YmfE major facilitator superfamily (MFS)-

type transporter involved an eightfold reduced secretion of bacillibactin, the major siderophore produced by this bacterium and, on the other hand, a 25-fold increased secretion of the bacillibactin precursor 2,3-dihydroxybenzoate (26). To identify the siderophore produced by PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* and PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvA*, the strains were grown in iron-limited succinate medium, the extracellular culture fractions slightly purified and analyzed by mass spectrometry and on cellulose acetate membranes (Figure 6). PAO1 and PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* produced mostly the two isoforms of PVDI the succinamide and succinic forms (Figure 6), molecular mass of 1333.592 and 1334.641 respectively and a form, which does not migrate on the cellulose acetate membranes. The absence of just the efflux pump does not affect the nature of PVDI secreted and therefore its biosynthesis. Interestingly, the double mutant PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ* produced absolutely no more PVDI but only two precursor, PVDIq (molecular mass 1560,854), previously described for the strain PAO1 $\Delta$ *pvdQ* (6) and another molecule with a mass of 1558,837, being probably an isoform of PVDIq. Both molecules did not migrate on cellulose acetate membranes. PvdQ is a periplasmic acylase involved in a so far unknown step of the maturation of PVDI in the periplasm. The absence of PVDI production (succinamide and succinic forms) for PAO1 $\Delta$ *pvdQ* indicates that this enzyme must be involved in the periplasmic maturation of PVDIq into PVDI. According to the exact mass measurements, PVDIq could be PVDI with a C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>O-O-ester chain. This explains the presence of fluorescence characteristic of PVDI bound to the bacterial inner and outer membranes separated on sucrose gradient (Figure 7). In the absence of PvdRT-OpmQ, this fluorescence is increased in both membranes. Altogether, these findings indicate as well that PvdRT-OpmQ is involved in PVDI secretion and that complete maturation of the siderophore occurs probably just before secretion. When the siderophore is secreted by another efflux system than PvdRT-OpmQ, the siderophore maturation by PvdQ stays uncompleted in PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *fpvA* and less efficient PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ*.

## DISCUSSION

Previous studies have clearly shown that *P. aeruginosa* releases from the periplasm into the extracellular medium, both newly synthesized PVDI and recycled PVDI that has already transported iron ions into the bacterial periplasm (15, 27). Recently our group and the one of P. Visca have shown that recycling of PVDI after iron transport, involves efflux pump PvdRT-OpmQ (10, 11): mutation of this pump abolished completely PVDI recycling. Investigation of the involvement of PvdRT-OpmQ into the secretion of newly synthesized PVDI appeared to be more difficult. Production of PVDI by *P. aeruginosa* strains gives a characteristic yellow-green color to the cultures. Mutation of the PvdRT-OpmQ efflux pump does not change the apparent color of the bacterial culture. However, when the amount of PVDI produced by such a mutant was monitored precisely by emission of fluorescence at 450 nm or by the absorbance at 400 nm, a 30 % decrease of the siderophore production was observed (Figure 3 and 5). However, Imperi et al by using strains unable to incorporate PVDI-Fe (*fpvA* and *fpvB* mutants) and cellular fractionation, came to the conclusion that PvdRT-OpmQ was not involved in the secretion of newly synthesized PVDI, because of the absence of PVDI accumulation in the periplasm of these strains (10). In the present work, using also *FpvA* and *FpvB* mutants, cellular fractionation and epifluorescence microscopy, we observed accumulation of fluorescence corresponding to newly synthesized PVDI in cells unable to express PvdRT-OpmQ. Previously, epifluorescence microscopy allowed us to show that PAO1 stores a fluorescent PVDI precursor in its periplasm (6). Here by modulating the energy of the excitation wavelength, we were able to detect variation in the amount of PVDI precursor present in the periplasm of single cells. When energy, avoiding fluorescence saturation in PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ* and PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* cells, was chosen, no more fluorescence could be detected in the periplasm of PAO1, PAO1 $\Delta$ *fpvA* and PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* (Figure 1 and 4A), indicating that this second group of cells has less

PVDI precursor in the periplasm than cells unable to express PvdRT-OpmQ. The cellular fractionation showed also an accumulation of siderophore in the periplasm of PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ* compared to PAO1 $\Delta$ *fpvA* (Figure 4B). Imperi et al. had carried out the same cellular fractionation, but discussed only the variation of the fluorescence in the periplasmic fraction of PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ* compared with PAO1 (10). Since an *FpvA* mutant produces 70 % less PVDI than PAO1 $\Delta$ *fpvA*, the reference in such an experiment should be the *fpvA* mutant. The present work indicated also that epifluorescence microscopy is a more sensitive approach to monitor small fluorescence variation in the periplasm of single bacterial cells than cellular fractionation, which monitors a variation for a large amount of cells in a system where the fluorescence variation is small compared to the total fluorescence produced (Figure 3).

Mass spectrometry and migration on cellulose acetate membrane analyses of the fluorescent siderophores produced by the double mutant *fpvA* and *pvdRT-opmQ* showed no more PVDI release into the extracellular medium, but only secretion of two precursors with a higher molecular weight compared to PVDI: 1560.854 and 1558.837 being respectively PVDIq a previously described precursor of PVDI (6), and probably an isoform of PVDIq. Previously it was shown that PVDIq is able to chelate iron and transport it in PAO1 (6). According to the exact mass, these two precursors seem to have a long hydrophobic chain, which must be removed just before siderophore release into the extracellular medium. PvdQ, a periplasmic acylase may be involved in the release of this chain (6). This enzyme was shown to be an acylase for quorum sensing signal molecules, which prefers long-chain AHLs such as C10 to C14 (28, 29). Bacterial membrane analyses of PAO1 and *pvdRTopmQ* mutants showed the presence of fluorescence in the membrane, suggesting that PVDI precursor may be present in the periplasm and bound to the membranes, and liberated by PvdQ just before its secretion by PvdRT-OpmQ into the extracellular medium. Surprisingly, the absence of either just

PvdRT-OpmQ or FpvA has no effect on the nature of PVDI released into the extracellular medium and therefore on the PvdQ activity. Only the absence of both FpvA and PvdRT-OpmQ disturbed the PVDI synthesis and no more PVDI was secreted, indicating that PvdQ is only inactive in the PVDI biosynthesis in the absence of both FpvA and PvdRT-OpmQ. These three proteins, PvdRT-OpmQ, FpvA and PvdQ, must be in close interaction and may be partners of a large membrane machinery with the different proteins being involved directly or indirectly in ferrisiderophore uptake (FpvA), siderophore recycling (PvdRT-OpmQ) and secretion of newly synthesized siderophore (PvdRT-OpmQ and PvdQ). However, in all the PvdRT-OpmQ mutants studied here, PVDI or PVDI precursors were still released in the extracellular medium indicating that they can be released from the periplasm into the extracellular medium by another(s) efflux system of *P. aeruginosa*.

In conclusion, all our data indicate that the PvdRT-OpmQ system enables recycling of PVDI from the periplasm following iron release from the siderophore by a mechanism involving iron reduction and it is also suitable for export of newly synthesized PVDI after the final steps of biosynthesis have taken place in the periplasm (Figure 8). However in the absence of this efflux system another one can take over the secretion of PVDI or PVDI precursors. However PvdRT-OpmQ and FpvA are both necessary for the activity of PvdQ in PVDI biosynthesis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), a grant from the ANR (Agence Nationale de la Recherche, N°ANR-08-BLAN-0315-01) and the association “ABCF Mucoviscidose”. E. Yeterian had a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie.

## REFERENCES :

1. Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schafer, M., & Budzikiewicz, H. (2008) *Biometals* **21**, 259-271.
2. Budzikiewicz, H. (1997) *Z Naturforsch [C]* **52**, 713-720.
3. Budzikiewicz, H. (2004) *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products* **87**, 81-237.
4. Meyer, J. M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1997) *Microbiology* **143** ( Pt 1), 35-43.
5. Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007) *Trends Microbiol.* **15**, 22-30.
6. Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2009) *Amino Acids* **in press**.
7. McMorran, B. J., Merriman, M. E., Rombel, I. T., & Lamont, I. L. (1996) *Gene* **176**, 55-59.
8. Saurin, W., Hofnung, M., & Dassa, E. (1999) *Journal of molecular evolution* **48**, 22-41.
9. Ochsner, U., Snyder, A., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8312-8317.
10. Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20440-20445.
11. Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2009) *Environ Microbiol Report* **in press**.
12. Schalk, I. J. (2008) *J Inorg Biochemi* **102**, 1159-1169.
13. Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 351-360.
14. Schalk, I. J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (1999) *Biochemistry* **38**, 9357-9365.
15. Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L. A., Graumann, P. L., & Schalk, I. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2987-2995.
16. Lamont, I. L. & Martin, L. W. (2003) *Microbiology* **149**, 833-842.
17. Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 1277-1287.
18. Poole, K., Heinrichs, D. E., & Neshat, S. (1993) *Mol. Microbiol.* **10**, 529-544.
19. Furrer, J. L., Sanders, D. N., Hook-Barnard, I. G., & McIntosh, M. A. (2002) *Mol. Microbiol.* **44**, 1225-1234.
20. Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G. J., Nies, D. H., & Grass, G. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 6701-6707.
21. Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A. Z., & Abdallah, M. A. (1994) *Inorg. Chem.* **33**, 6391-6402.
22. Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M. A., Pattus, F., & Schalk, I. J. (2002) *Biochemistry* **41**, 14591-14601.
23. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., & Schweizer, H. P. (1998) *Gene* **212**, 77-86.
24. Markie, D., Hill, D. F., & Poulter, R. T. M. (1986) *Proceedings of the Otago Medical School* **64**, 69-70.
25. Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J., & Lamont, I. L. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 1177-1190.
26. Miethke, M., Schmidt, S., & Marahiel, M. A. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 5143-5152.

27. Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2002) *Biochemistry* **41**, 1663-1671.
28. Bokhove, M., Jimenez, P. N., Quax, W. J., & Dijkstra, B. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 686-691.
29. Huang, J. J., Petersen, A., Whiteley, M., & Leadbetter, J. R. (2006) *Appl Environ Microbiol* **72**, 1190-1197.
30. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., *et al.* (2000) *Nature* **406**, 959-964.
31. Li, X. Z., Zhang, L., & Poole, K. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 2987-2991.
32. Shen, J., Meldrum, A., & Poole, K. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 3268-3275.
33. West, S. E., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K., & Runyen-Janecky, L. J. (1994) *Gene* **148**, 81-86.

**TABLE**

<b>Strain/ Plasmid</b>	<b>Genotype/ phenotype</b>	<b>Reference</b>
<i>Strains of P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type	Laboratory stock; (30)
PAO1 <i>pvdQ</i>	Pvd <sup>-</sup>	(Lamont and Martin 2003)
PAO1 <i>pvdR</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	(11)
PAO1 <i>pvdT</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	(11)
PAO1 <i>oprQ</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	(11)
PAO1 <i>pvdRToprQ</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	(11)
PAO1 <i>pvdDpvdRToprQ</i>	Pvd <sup>-</sup> ; mutant efflux pump	(11)
K1119	<i>mexAmexB</i> mutant	(31)
PAO <i>fpvA</i>	FpvA <sup>-</sup>	(Shirley and Lamont, 2009)
PAO <i>fpvA fpvB</i>	FpvA- FpvB-	This study
PAO <i>fpvA pvdRToprQ</i>	FpvA-; mutant efflux pump	This study
PAO <i>fpvA fpvB pvdRToprQ</i>	FpvA- FpvB-; mutant efflux pump	This study
<i>Plasmids</i>		
pEX18Gm	Allele replacement vector; Gm <sup>R</sup>	(23)
pJSS2	<i>fpvA</i> (PA2398) deletion plasmid; Tc <sup>R</sup>	(32)
pEX18Gm::Δ <i>fpvB</i>	<i>fpvB</i> (PA4168) deletion plasmid; Gm <sup>R</sup>	This study
pEX18Gm::Δ <i>fpvB</i> ::Km <sup>R</sup>	<i>fpvB</i> (PA4168) deletion plasmid; Gm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	This study
pUCP22	DNA cloning vector; Gm <sup>R</sup>	(33)
pUCP22:: <i>pvdRToprQ</i>	pUCP22 carrying the <i>pvdRToprQ</i> operon	(11)

Table 1: *P. aeruginosa* strains and plasmids used in this study.

## FIGURES LEGEND

### **Figure 1: Epifluorescence microscopy of *P. aeruginosa* PAO1 and *pvdRTopmQ* mutants.**

**Pannel A.** The first and second pictures (A and B) were taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right one with DIC (Differential Interference Contrast) filter (White bar = 2  $\mu$ m). An eight-fold higher excitation intensity was used in picture A compared to picture B. At high excitation intensity, the fluorescence present in the periplasm of PAO1 can be visualized, however this energy saturates the periplasmic fluorescence for the *pvdRTopmQ* mutants (data not shown). At lower energy, no more fluorescence is seen in PAO1 (picture B), but clearly a fluorescence remains in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants (pictures in pannel B).

**Pannel B.** For each pair of images the left picture was taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right with DIC (Differential Interference Contrast) filter (White bar = 2  $\mu$ m). The energy of the excitation intensity used was equivalent to the one used in figure B of pannel A.

**Figure 2 : Effects of efflux pump mutations on fluorescence in the cytoplasmic and periplasmic fractions of *P. aeruginosa* after an overnight culture.** Periplasmic and cytoplasmic fractions were prepared as described in Experimental Procedures. Samples were excited at 400 nm and the fluorescence was monitored at 447 nm. The observed fluorescence is proportional to the amount of PVDI or PVDI precursor present in each sub-cellular fraction. The data are means of three independent experiments. Cytoplasm, black bars; periplasm, hatched bars.

**Figure 3: PVDI production (grey bares) and secretion (white bares).** Cells are grown in succinate medium. After 24 h cultures, the fluorescence was monitored at 450 nm and the

absorbance corresponding to bacterial growth at 600 nm (grey bars). After cell centrifugation, the fluorescence was also monitored at 450 nm on the supernatant (white bars).

**Figure 4: A. Fluorescence microscopy of *P. aeruginosa* PAO1 and mutants uable to express pvdRT-OpmQ and FpvA and FpvB.** For each pair of images the left picture was taken with Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450 (filter specification) and the right with DIC (Differential Interference Contrast) filter (White bar = 2  $\mu$ m). It is important to note that the same excitation intensity was used with all strains in order to compare the fluorescence intensity present in the periplasm.

**B. Accumulation of fluorescence in the periplasm of strains unable to express PvdRT-OprQ and the PVDI-Fe outer membrane transporters FpvA.** The experiment was carried out as described in the legend of figure 2. Cytoplasm, black bars; periplasm, hatched bars. The data are means of three independent experiments.

**Figure 5 : A. Effect of *pvdRTopmQ* mutation on the kinetic of PVDI production.** Strains PAO1 ( $\Delta$ ), PAO1*pvdRTopmQ* ( $\square$ ), PAO1*pvdRTopmQ*(pUCP19::*pvdRTopmQ*) ( $\circ$ ) and PAO1*pvdRTopmQ*(pUCP19) ( $\diamond$ ) were diluted in succinate medium to an OD<sub>600</sub> of 1, incubated at 30°C. The fluorescence was monitored at 447 nm (excitation 400 nm).  $(F-F_0)/F_0$  was used for the presentation of these data because of the high fluorescence of PAO1*pvdRTopmQ* cells even at  $t_0$  compared to PAO1 (F and  $F_0$  being respectively the fluorescence at time t and  $t_0$ ).

**Figure 6: A. Structure of PVDI succinamide and succinic forms. B. Isoelectrofocusing migration of PVDs on cellulose acetate membranes.** The black line indicates where the samples were loaded onto the membrane. Siderophores were purified from the extracellular

medium of strains PAO1, PAO1 $\Delta$ fpvA, PAO1pvdRTopmQ, PAO1pvdRTopmQ $\Delta$ fpvA and PAO1 $\Delta$ pvdQ. **C. Mass spectrometry analyses of purified fluorescent siderophores.** The samples analyzed on cellulose acetate (B) membranes were analyzed ...

**Figure 7 : Presence of fluorescent PVDI bound to bacterial membrane in PAO1 and PAO1 $\Delta$ pvdRTopmQ.** After spheroplasts preparations, the membranes were isolated and inner (grey bares) and outer membranes (hashed bares) were separated on sucrose gradient as described in the experimental section.

**Figure 8: Proposed model for PVDI secretion in *P. aeruginosa*.** PVDI synthesis involves formation in the cytoplasm of a non fluorescent precursor called ferribactin, which is transported across the inner membrane by PvdE, an ABC transporter (6). Ferribactin is then transformed into PVDI by a process involving the periplasmic enzymes PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ (6), before its secretion across the outer membrane by the efflux system PvdRT-OpmQ. Once PVDI-Fe is formed in the extracellular medium, the complex is transported into the periplasm by the specific outer membrane transporter FpvA (12). Iron is released from the siderophore in the periplasm by a mechanism thought to involve reduction of the iron ((15) and this study). Apo PVDI is then exported into the extracellular medium by PvdRT-OpmQ. Only PVDI is fluorescent, PVDI-Fe and ferribactin are not.

Figure 1:

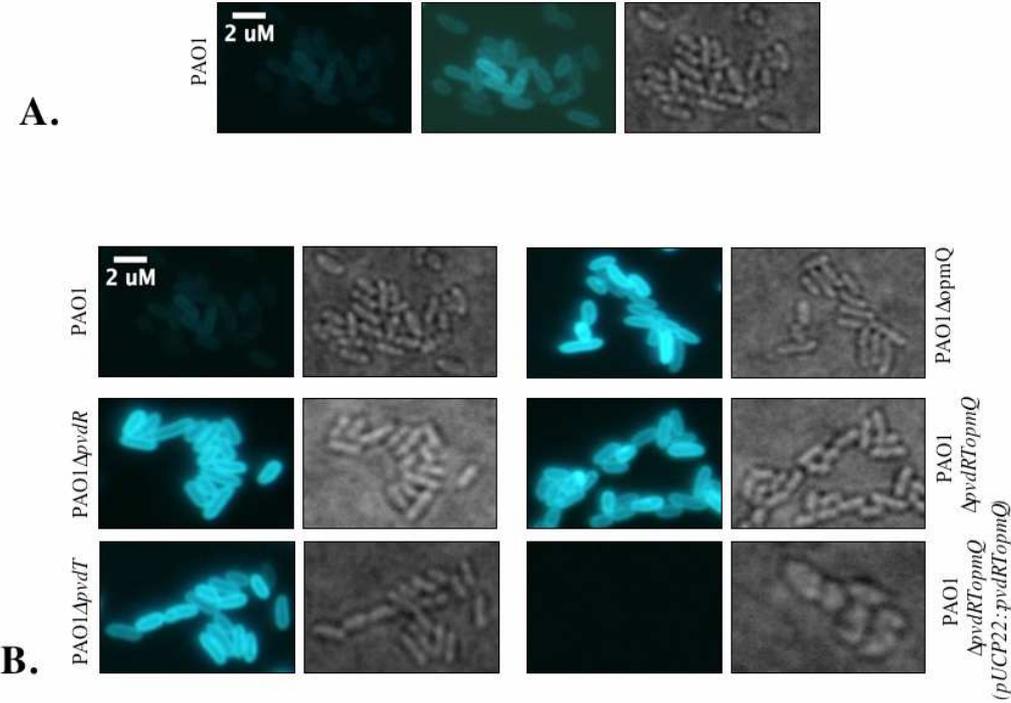


Figure 2

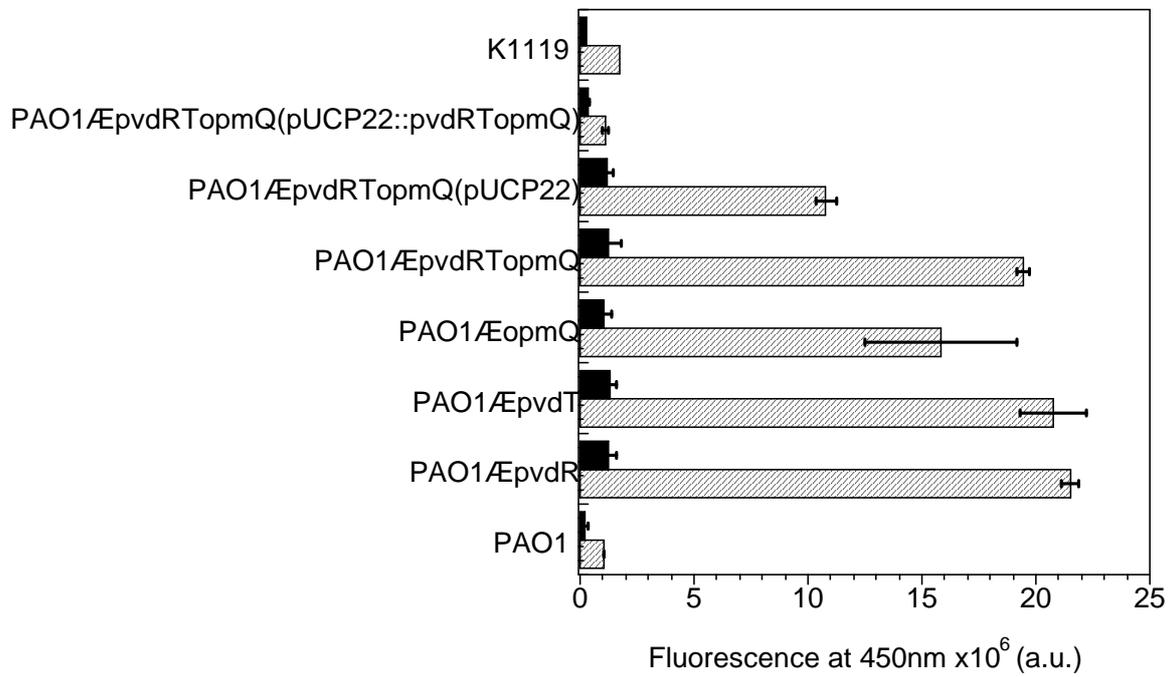
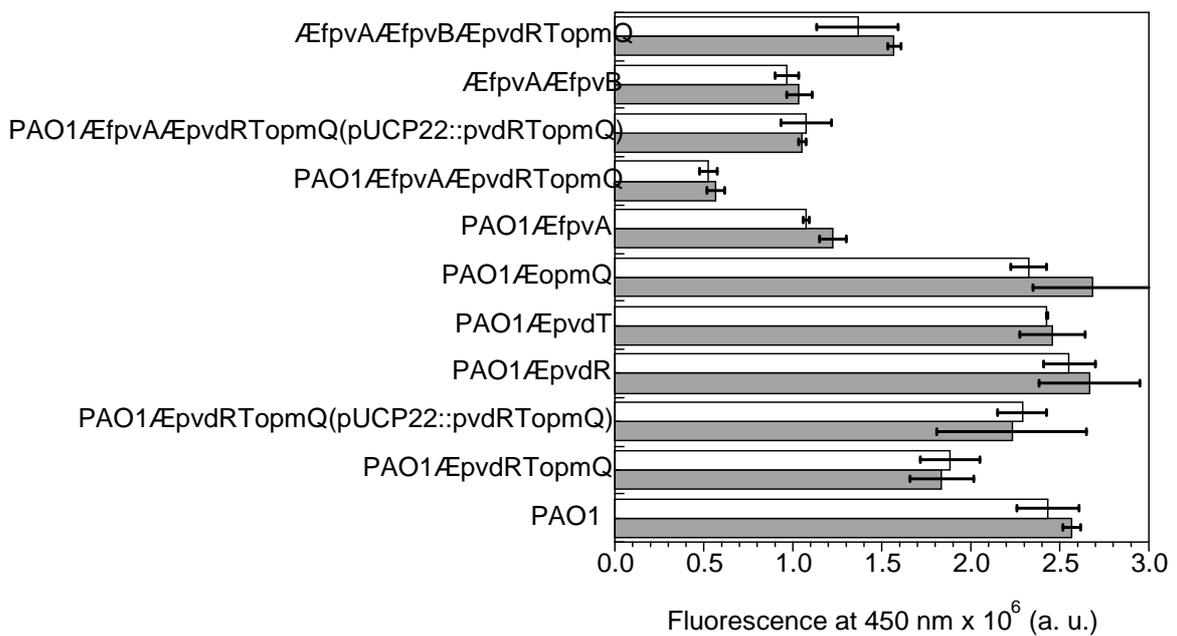
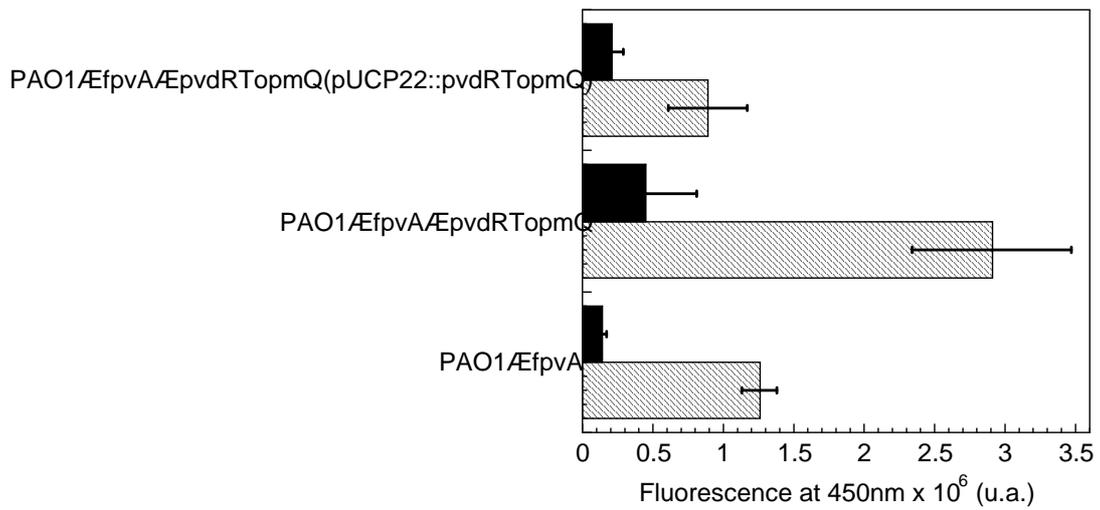
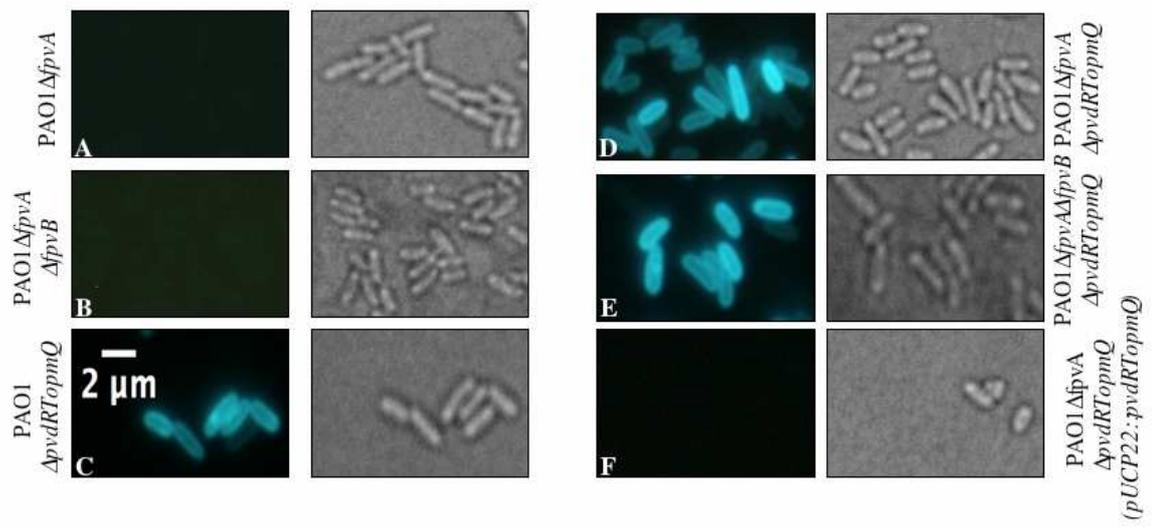


Figure 3:



**Figure 4**

**A.**



**B.**

Figure 5

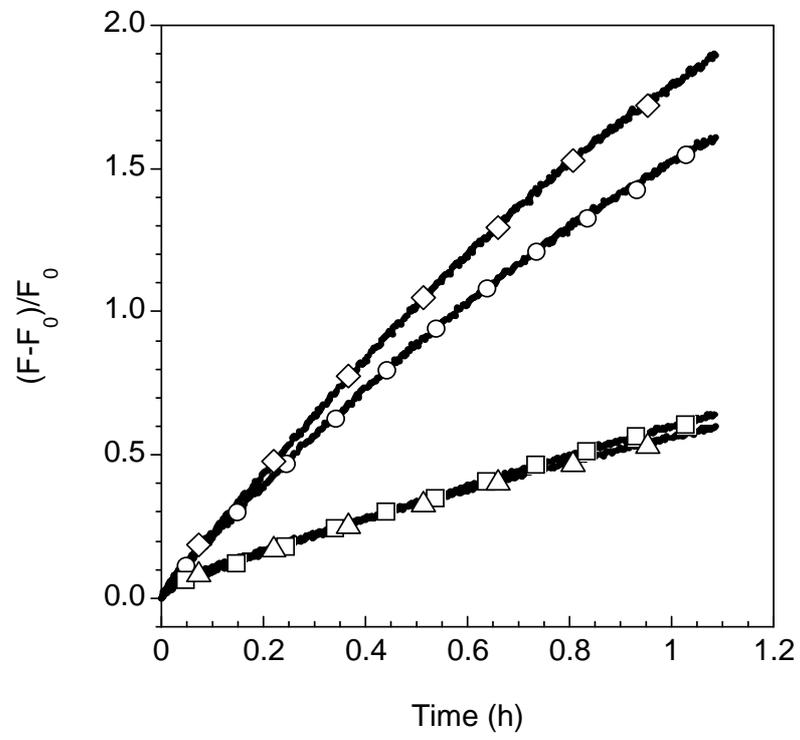
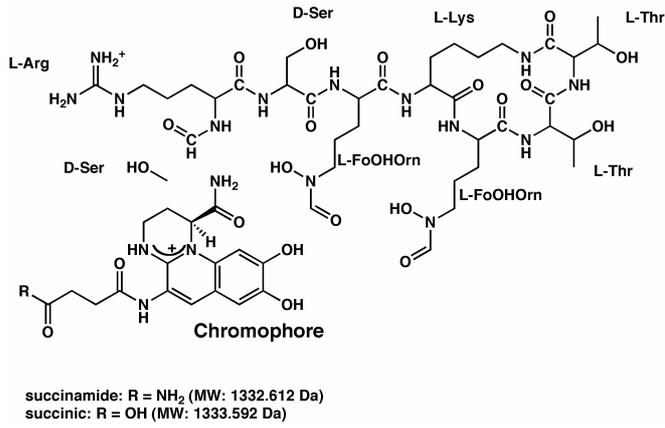
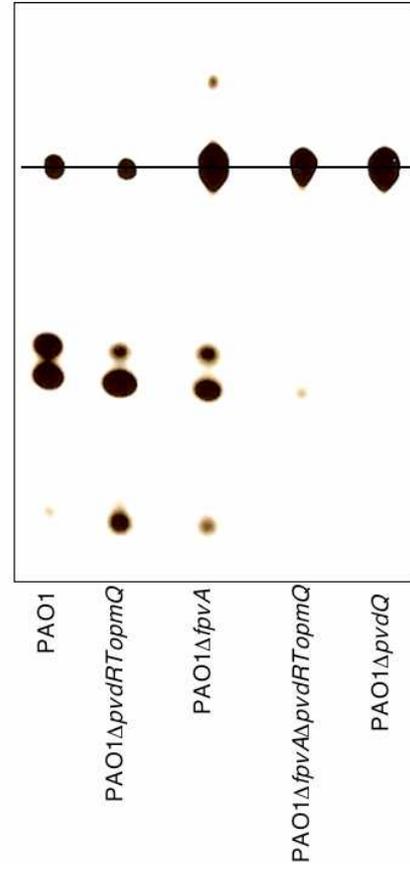


Figure 6 :



A.



B.

Figure 7:

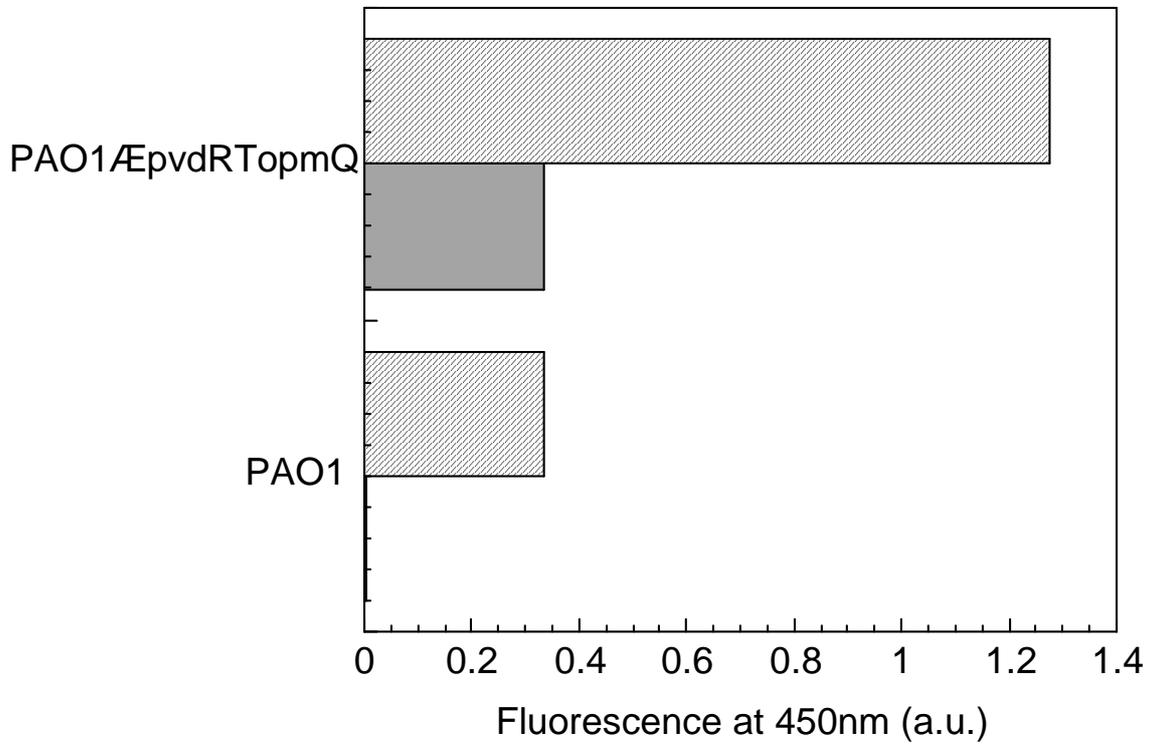
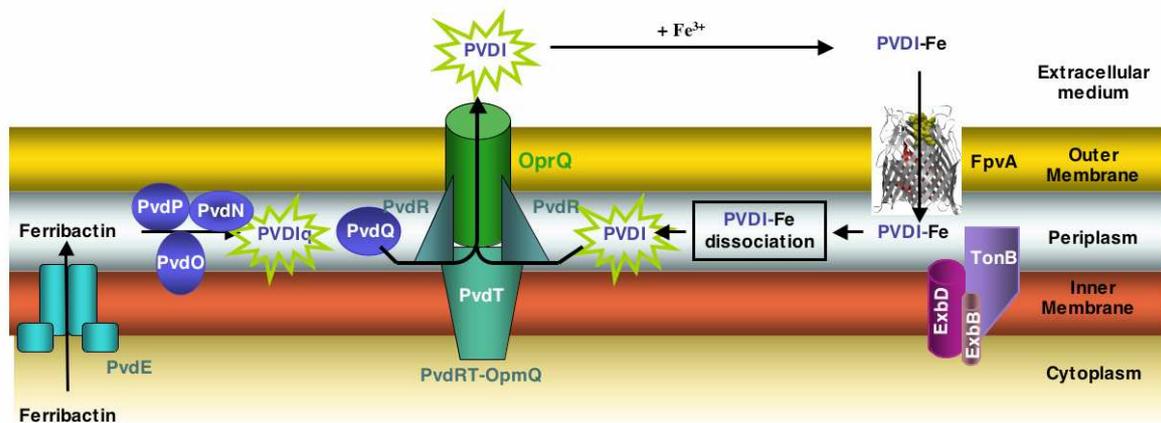


Figure 8



Mass spectrometry

There will be a figure /+ table

Mutants	M/z
<b>PAO1</b>	<u>1332.612 (47%), 1333.592 (61%), 1361.585 (57%), 1363.603 (100%), 1364.631 (10%), 1564.847 (3%)</u>
<b>PAO1<math>\Delta</math>pvdRTopmQ<math>\Delta</math>fpvA</b>	<u>1334.623 (45%), 1363.599 (22%), 1532.823 (2%), 1514.851 (3%), <b>1558.837 (83%), 1560.854 (100%)</b></u>
<b>PAO1<math>\Delta</math>pvdQ</b>	<u>1532.823 (13%), 1514.851 (2%), <b>1558.846 (100%), 1560.858 (90%)</b></u>



### 2.3.4 Discussion de l'article 3

Dans l'article précédent, nous avons montré que le système d'efflux tripartite PvdRT-OpmQ est impliqué dans le recyclage de la pyoverdine déjà utilisée pour le transport du fer, permettant de proposer que cette pompe reconnaît spécifiquement la pyoverdine et l'exporte activement comme l'un de ses substrats à partir du périplasma, où se localise la dissociation, vers l'extérieur de la cellule. Par ailleurs, nous avons préalablement déterminé que les dernières étapes de maturation de la pyoverdine prenaient place dans le périplasma. Le rôle de la pompe PvdRT-OpmQ a donc aussi été étudié pour son rôle spécifique dans la sécrétion.

Par microscopie de fluorescence, nous avons précédemment montré qu'une certaine quantité physiologique de pyoverdine nouvellement synthétisée ou son précurseur proche s'accumulait dans le périplasma d'une souche sauvage de *P. aeruginosa* PAO1. En l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ ou l'un de ces composants, l'intensité de ce marquage périplasmique est décuplée. Cette suraccumulation de pyoverdine a pu être quantifiée par fractionnement cellulaire, montrant dans ces souches mutantes une augmentation de la fluorescence contenue dans le périplasma de l'ordre de 17 à 20 fois ce qui est retenu dans une souche sauvage.

Cette suraccumulation dans le périplasma peut avoir deux origines : un recyclage important ou alors un défaut dans la sécrétion. Comme nos conditions de culture sont extrêmement carencées en fer, très peu de complexe pyoverdine-Fe se forme et donc, vraisemblablement, peu de pyoverdine va pouvoir être internalisée et rester bloquée dans le périplasma. La part de la fluorescence vue dans le périplasma due au recyclage pourrait donc être minime en rapport à la production intrinsèque de la bactérie. Cette suraccumulation semble donc suggérer que la mutation de cette pompe entraîne une difficulté importante de sécrétion de pyoverdine néo-synthétisée.

Ceci est confirmé par les données que nous obtenons lorsque la voie du recyclage est abolie par la délétion du gène des récepteurs de membrane externe de la pyoverdine FpvAI et FpvB. Dans ce cas, l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ montre toujours en microscopie de fluorescence une nette suraccumulation périplasmique, suggérant fortement un défaut de sécrétion du sidérophore néo-synthétisé. La quantification par fractionnement apporte un résultat dans le même sens mais moins évident, à savoir un simple doublement de la fluorescence retrouvée dans les fractions périplasmiques d'un double mutant  $\Delta FpvA\Delta pompe$  en comparaison de la souche de référence  $\Delta FpvA$ . Ces derniers résultats ne sont pas complètement concluants car il y a une très grosse différence de production de pyoverdine entre une souche  $\Delta FpvA$  et une souche sauvage.

En effet, l'absence de FpvA empêche l'activation de la cascade de signalisation permettant l'expression des gènes de biosynthèse de la pyoverdine, ce qui amoindrit la quantité de fluorescence accumulée dans le périplasme et majore les erreurs liées aux manipulations. Afin que les résultats de fractionnement soient plus probants, l'expérience pourrait être refaite en utilisant des souches auxquelles seraient également délétés le gène *fpvR*, permettant ainsi d'avoir une production constante de pyoverdine et dans des quantités similaires à une souche sauvage.

Par ailleurs, l'analyse des masses et du front de migration sur membranes d'acétate de cellulose montrent que la souche  $\Delta$ FpvA $\Delta$ pompe produit et sécrète dans le milieu extracellulaire majoritairement le précurseur PVDq. Ce précurseur pourrait être moins fluorescent que la pyoverdine finale, comme cela a été suggéré dans l'article 1, ce qui pourrait être également une explication à cette faible variation de fluorescence périplasmique par rapport à la souche de référence  $\Delta$ FpvA qui, elle, produit de la pyoverdine mature. Une deuxième explication pourrait aussi être que ce précurseur reste accroché aux membranes par une queue acylée putative lors du fractionnement, ce qui justifie cette différence de fluorescence entre le fractionnement et la microscopie *in vivo*, qui permet de visualiser la fluorescence globale du périplasme.

Ajoutées à la diminution de la sécrétion, toutes ces données montrent néanmoins que la rétention périplasmique de fluorescence est au moins en partie due à un problème de sécrétion de la pyoverdine ou de son précurseur fluorescent périplasmique nouvellement produit par la bactérie.

L'étude des cinétiques de fluorescence montrent qu'en l'absence de la pompe d'efflux, la suraccumulation observée n'est pas due à une surproduction de pyoverdine par la bactérie, puisqu'au contraire, il est observé une baisse de production de 30%. Ceci permet de suggérer qu'une étape soit de biosynthèse, soit de sécrétion est affectée par cette mutation.

D'autre part, la délétion de la pompe PvdRT-OpmQ entraîne un défaut visible de sécrétion (baisse d'environ 50% de la fluorescence du milieu extracellulaire), bien que le blocage de la sécrétion ne soit pas complet (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b). Lorsque la pompe est absente, la quantité de fluorescence retrouvée dans les membranes est multipliée par plus de quatre en comparaison d'une souche sauvage. Cette fluorescence, vraisemblablement due au précurseur PVDq, déjà identifié dans l'article 1, qui posséderait une longue chaîne acylée lui permettant de s'insérer dans la membrane, suggère également que la délétion de la pompe joue un rôle dans la sécrétion de pyoverdine nouvellement produite.

Globalement, l'ensemble de ces résultats suggère donc fortement que cette pompe est responsable de la sécrétion active de la pyoverdine néo-synthétisée.

Le rôle éventuel de cette pompe d'efflux dans la sécrétion de la pyoverdine a longtemps été écarté à cause de cette sécrétion partielle persistante, après la délétion de tout ou partie des éléments composant ce système (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b).

Une première explication à ce phénomène pourrait être que, lorsque l'une des parties de la pompe est manquante, la ou les partie(s) restante(s) se recombinent avec les composants d'une autre pompe. En effet, une caractéristique des systèmes d'efflux tripartite est leur capacité à se recombinaison avec des composants d'autres pompes en l'absence d'un des composants du système. Ce type de recombinaison concerne principalement le canal de membrane externe qui semble peu spécifique par rapport au type de pompe et au substrat. Ainsi, chez *E. coli*, TolC peut être recruté et interagir à la fois avec des pompes de type ABC, MFS et RND (Koronakis et al., 2004; Tikhonova et al., 2009). Il en est de même pour OprM chez *P. aeruginosa* qui peut interagir avec plusieurs pompes RND de type Mex.

Cependant, ce type de phénomène ne peut pas expliquer complètement cette sécrétion partielle de pyoverdine. En effet, quelque soit la mutation, y compris une délétion complète des 3 gènes, cela conduit à un phénotype similaire, suggérant plutôt l'intervention d'un système alternatif. Dans ce cas, il pourrait s'agir soit d'un système capable de prendre le relais pour la sécrétion spécifique de pyoverdine, soit de protéines de sécrétion qui peuvent laisser fuir de façon passive et/ou non spécifique de la pyoverdine agissant dans le cadre d'un phénomène de sauvegarde et de maintien de l'intégrité osmotique du périplasma. Il existe chez *P. aeruginosa* de nombreuses pompes dédiées à la détoxification du périplasma, telles que les pompes Mex, qui pourraient délester le périplasma de ce trop-plein de molécule accumulée.

Le fait que la délétion de la pompe PvdRT-OpmQ ne bloque pas complètement la sécrétion de pyoverdine n'est pas totalement surprenant. En effet, pour tous les sidérophores dont le système de sécrétion a été identifié, la mutation de l'appareil de sécrétion n'abolit jamais totalement le relargage dans le milieu extracellulaire du sidérophore et/ou d'un de ses produits de dégradation (Bleuel et al., 2005; Franza et al., 2005; Miethke et al., 2008; Tanabe et al., 2003). En cas de blocage du système de sécrétion d'un sidérophore, les bactéries montrent différents phénotypes. Dans le cas de l'entérobactine chez *E. coli*, dans lequel il existe un système de dégradation spécifique de l'entérobactine, on observe le relargage à travers la membrane externe des produits de dégradation de l'entérobactine qui n'a pas pu être sécrété, suggérant qu'il existe un système supplémentaire qui nettoie le périplasma des fragments de catécholates générés (Bleuel et al., 2005). Dans le cas de la bacillibactine chez *Bacillus subtilis*, il y a

une très forte proportion de précurseur sécrété, en conjugaison de la diminution de la sécrétion du sidérophore mature (Miethke et al., 2008).

Dans le système pyoverdine, les analyses de spectrométrie de masse montrent qu'en fait, dans le double mutant  $\Delta FpvA\Delta PvdRT$ -OpmQ mais pas dans un simple mutant  $\Delta PvdRT$ -OpmQ, la bactérie relargue dans le milieu extracellulaire un mélange de pyoverdine (minoritaire) et d'un de ces précurseur fluorescent (majoritaire) nommé PVDq puisqu'il s'agit du produit sécrété en l'absence de l'enzyme périplasmique PvdQ. Ceci suggère qu'il existerait un lien étroit entre le transport de ferripyoverdine par FpvA et l'activité de l'enzyme PvdQ.

La structure exacte de PVDq est encore à l'étude au laboratoire et pourrait amener de nouveaux éléments pour la compréhension des étapes de biosynthèse de la pyoverdine.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier le système responsable de la sécrétion de la pyoverdine nouvellement synthétisée.

Cette suraccumulation périplasmique de fluorescence lorsque la pompe d'efflux est absente montre que le substrat de la pompe est pris en charge au niveau du périplasma et directement sécrété à partir de ce compartiment cellulaire. De plus, il n'y a pas d'apparition de fluorescence dans le cytoplasme, ce qui signifie bien que la pyoverdine, une fois maturée dans le périplasma, ne repasse pas dans le cytoplasme pour être exportée.

Cette suraccumulation périplasmique est par ailleurs totalement concordante avec une sécrétion de la pyoverdine en deux temps et une ou plusieurs étapes de maturation périplasmique.

# **Troisième partie**

Discussion générale et perspectives

Conclusion



---

## Discussion générale et perspectives

---

La pyoverdine est un sidérophore majeur pour la survie et la virulence de *P. aeruginosa*. Cette molécule d'une taille relativement importante et de structure complexe nécessite pour sa biosynthèse de nombreuses étapes. Une partie de la synthèse de la pyoverdine a déjà été décryptée dans la souche PAO1. Cependant plusieurs questions importantes concernant cette synthèse restaient encore irrésolues. Par ailleurs, les mécanismes liés à la sécrétion du sidérophore demeuraient largement méconnus.

La première partie de ce travail de thèse a permis de démontrer qu'une partie de la maturation de la pyoverdine se localise dans le périplasme, impliquant une sécrétion en deux étapes. Dans un deuxième temps, nous avons identifié la pompe d'efflux responsable de l'expulsion, à partir du périplasme, du sidérophore aussi bien néo-synthétisé que recyclé, vers milieu extracellulaire.

### ***De la mise en évidence d'une maturation périplasmique...***

La voie de biosynthèse de la pyoverdine débute dans le cytoplasme, dans lequel est assemblé le squelette peptidique. Un intermédiaire de synthèse cytoplasmique, la ferribactine, a été isolé en concordance avec ce schéma (Hohlneicher et al., 2001). La différence principale entre la ferribactine et la pyoverdine se situe au niveau de la structure du chromophore et de ces groupements chélatants. Les étapes tardives de maturation permettant de transformer la ferribactine en pyoverdine restaient plus énigmatiques. Ce travail apporte des éléments significatifs de compréhension de ces étapes tardives.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'une partie au moins de la maturation, et notamment la cyclisation du chromophore, se localise dans le périplasme. Cette maturation implique les enzymes périplasmiques PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ.

Ce travail montre clairement que les protéines PvdN, PvdO et PvdP catalysent dans le périplasme une ou plusieurs étapes réactionnelles impliquées dans la cyclisation du chromophore ou dans une étape la précédant.

L'organisation génomique des gènes *pvdMNO* et *pvdP* est conservée dans plusieurs génomes de *Pseudomonas* (Ravel and Cornelis, 2003). Des homologues aux protéines codées par ces gènes ne sont retrouvés que dans les *Pseudomonas* fluorescents, suggérant que ces enzymes sont impliquées dans la maturation de la partie qui confère sa fluorescence à la pyoverdine, c'est-à-dire le chromophore.

Cependant, le rôle exact des enzymes PvdN, PvdO et PvdP dans la maturation de la pyoverdine n'a pas pu être déterminé. Dans la séquence de maturation proposée par P. Visca (figure 24, page 55) (Visca et al., 2007), si celle-ci est valide, les enzymes PvdN, PvdO et PvdP pourraient donc avoir un rôle dans une ou plusieurs étapes clé de la cyclisation. Les fonctions déjà suggérées pour ces enzymes ne permettent pas de cibler leur intervention sur l'une ou l'autre des étapes réactionnelles proposées par P. Visca (Ochsner et al., 2002b). Par exemple, PvdO est prédite *in silico* être une Fe<sup>3+</sup> réductase, mais est pourtant clairement impliquée dans une étape réactionnelle de la formation du chromophore ou dans une étape la précédant.

Pour comprendre la fonction de ces enzymes, il serait intéressant de les purifier et d'étudier leur action sur différents substrats afin déterminer de leur activité enzymatique spécifique. La détermination de leur structure apporterait aussi des éléments clés de compréhension de leur mode d'action (reconnaissance du substrat, activité enzymatique,...). Par ailleurs, l'identification par spectrométrie de masse des structures des différents intermédiaires générés par les mutations de chacune des enzymes pourrait permettre de mieux comprendre l'enchaînement réactionnel aboutissant à la formation du chromophore et de donner la chronologie des différentes réactions catalysées par les enzymes qui interviennent successivement.

L'ordre séquentiel d'intervention des protéines PvdN, PvdO et PvdP n'a pu être établi, mais il est aussi envisageable que plusieurs réactions de maturation se fassent de manière concomitantes. La seule évidence sur ce sujet est que, parmi les protéines identifiées, l'enzyme PvdQ intervient en dernier dans la séquence de maturation.

L'enzyme PvdQ possède une activité acylase spécifique aux longues chaînes carbonées (Huang et al., 2003). Cette activité a été démontrée biochimiquement et confirmée par la structure de l'enzyme PvdQ réalisée récemment par le groupe de W. Quax (Bokhove et al.).

L'analyse de la molécule produite par une souche mutante du gène *pvdQ* nous a permis d'identifier un nouvel intermédiaire de biosynthèse, nommé PVDq. D'après nos données de masse, ce précurseur, dont le chromophore serait au moins en partie formé, porte une longue chaîne acylée à un emplacement encore indéterminé. La structure exacte de ce précurseur est actuellement en cours d'analyse dans le laboratoire de H. Budziewicz et permettra de répondre à ces interrogations. Le rôle probable de cette longue chaîne

carbonée acylée serait l'ancrage du précurseur à la membrane interne pendant la maturation. Avant sa sécrétion, cette queue acylée sera clivée pour donner la forme mature de pyoverdine. Toutes les données disponibles suggèrent fortement que cette fonction pourrait être assignée à PvdQ.

Par ailleurs, il reste dans le locus « pvd » un certain nombre de gènes qui codent pour des protéines dont le rôle n'a pas encore été identifié. D'autres enzymes pourraient également être impliquées dans le processus de maturation de la pyoverdine.

On retrouve notamment le gène *pvdM*, qui forme un opéron avec *pvdN* et *pvdO*, et qui est également essentiel pour la synthèse de pyoverdine (Lamont and Martin, 2003; Ochsner et al., 2002b). PvdM est donc co-exprimé avec PvdN et PvdO et avec les gènes de biosynthèse de la pyoverdine, puisque l'opéron est régulé par le facteur sigma PvdS. PvdM serait une protéine périplasmique insérée dans la membrane interne par une hélice transmembranaire. Cette protéine possède des similarités de séquence avec des dipeptidases. L'étude du rôle de PvdM, qui n'a pas été investigué dans cette thèse, pourrait apporter des éléments supplémentaires de compréhension dans la maturation périplasmique de la pyoverdine.

Le gène *mbtH* (*PA2412*) est lui aussi essentiel à la production de pvd (Ochsner et al., 2002b) et pourrait aussi jouer un rôle dans la maturation de la pyoverdine. Aucune fonction n'a pu être assignée à l'enzyme MbtH, mais le gène codant cette protéine est retrouvée dans plusieurs génomes de *Pseudomonas* (Ravel and Cornelis, 2003)

Il se pourrait aussi que les gènes *pvcABCD*, qui n'ont pas eu de fonctions biochimiques assignées, contribuent à cette étape de maturation, sans pour autant y être essentiels (Stintzi et al., 1996).

Si les étapes réactionnelles conduisant à la cyclisation du chromophore nécessitent incontestablement la présence d'enzymes périplasmiques, il est aussi probable que les propriétés physico-chimiques du périplasma, bien différentes de celles du cytoplasme influent sur le processus de maturation. En effet, il est envisageable qu'un certain nombre de réactions chimiques puissent être catalysées par le milieu chimique du périplasma bien moins réducteur que celui du cytoplasme.

Enfin, il serait intéressant de caractériser biochimiquement le précurseur périplasmique identifié, PVDp. En effet, la forme majoritaire isolée et stockée dans le périplasma est encore légèrement différente en masse et en charge de la pyoverdine finale retrouvée dans le milieu extracellulaire. Il est également possible que des modifications chimiques mineures de la molécule se produisent au cours du passage du milieu périplasmique réducteur au milieu extracellulaire oxydant.

### **... A une sécrétion en 2 temps**

Cette phase de maturation dans le périplasme implique nécessairement que la sécrétion de la pyoverdine s'effectue en deux étapes à travers la double membrane bactérienne : une première phase d'**exportation** vers le périplasme, puis, dans un deuxième temps, la **sécrétion** proprement dite vers le milieu extracellulaire. Nos données montrent que ce mécanisme fait intervenir un transporteur ABC et une pompe d'efflux tripartite successivement.

La phase d'export à travers la membrane interne implique très probablement le transporteur ABC PvdE. PvdE exporterait vers le périplasme une forme précurseur non fluorescente cytoplasmique de la pyoverdine, qui pourrait être la ferribactine précédemment identifiée. L'identification du substrat exact de PvdE reste à mener, mais sera difficile techniquement. Le seul précurseur précoce cytoplasmique qui a pu être isolé biochimiquement est la ferribactine, ce qui ne signifie pas obligatoirement qu'il s'agit de cette molécule qui est transportée vers le périplasme, et non pas une autre pseudobactine non fluorescente.

Concernant la sécrétion vers le milieu extracellulaire, nous ne disposons, à mon arrivée au laboratoire, d'aucune piste probante de recherche sur ce sujet. L'étude de la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ a permis de montrer que cette pompe est impliquée à la fois dans la sécrétion vers le milieu extracellulaire de la pyoverdine néo-synthétisée, mais également dans le recyclage de la pyoverdine utilisée pour importer le fer dans la cellule. Globalement, cette pompe constitue donc la porte de sortie générale de la pyoverdine hors de la cellule.

Le recyclage de la pyoverdine avait été mis en évidence il y a une dizaine d'années, sans que la voie de ce mécanisme ait pu être identifiée. La démonstration de l'utilisation de la pompe PvdRT-OpmQ pour le recyclage de la pyoverdine est sans ambiguïté et constitue une avancée importante au niveau moléculaire pour la compréhension de ce processus. Sur le plan mécanistique, nous montrons que le recyclage de la pyoverdine se fait par une voie différente de celle de l'entrée, impliquant le relargage dans le périplasme du complexe transporté par le récepteur FpvA. Enfin, la microscopie de fluorescence, nous a également permis de localiser au niveau cellulaire la dissociation dans le périplasme. Concernant ce processus de recyclage, un point important restant encore à être déterminé se situe au niveau de l'identité de la réductase impliquée.

L'implication de la pompe PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la pyoverdine néo-synthétisée a été difficile à mettre en évidence, le phénotype mutant de ce système n'apportant pas des résultats nets, d'autres systèmes pouvant prendre le relais. L'identification de cette pompe constitue une première étape dans la compréhension des mécanismes moléculaires de sécrétion de ce sidérophore. La pompe PvdRT-OpmQ est le premier système de sécrétion de sidérophore dont l'ensemble des partenaires ont été intégralement identifiés. Cependant, de nombreuses questions subsistent quant à son fonctionnement.

Une étude publiée en même temps que la nôtre suggère que seule la pyoverdine recyclée est transportée par la pompe PvdRT-OpmQ (Imperi et al., 2009). Or la pyoverdine néo-synthétisée et la pyoverdine recyclée sont des formes probablement très similaires voir identiques au niveau structural. Il paraît surprenant que la poche de liaison à la pyoverdine dans la protéine de membrane interne puisse être spécifique à la pyoverdine recyclée uniquement. Contrairement, nos données démontrent que les deux formes de pyoverdine sont sécrétées par la même voie.

En revanche, la poche de reconnaissance semble relativement sélective pour certaines molécules uniquement puisque la pompe PvdRT-OpmQ ne permet pas le transport d'antibiotiques appartenant à différentes classes (tétracyclines, aminoglycosides,  $\beta$ -lactames, macrolides et chloramphénicol) (Imperi et al., 2009). Ceci laisse penser que la pyoverdine est le substrat spécifique de la pompe PvdRT-OpmQ. Les gènes codant la pompe PvdRT-OpmQ sont conservés dans tous les génomes des *Pseudomonas* fluorescents, ce qui suggérerait que la spécificité se trouverait au niveau du chromophore qui est conservé dans toutes les formes de pyoverdine.

Il serait néanmoins intéressant de définir quels sont les déterminants structuraux qui induisent cette spécificité et de déterminer quelle est la nature biochimique de la poche de liaison au substrat et son encombrement stérique.

Les exporteurs ABC sont généralement décrits comme prenant leur substrat du cytoplasme ou de la bicouche lipidique. Or, que ce soit dans le cas de la pyoverdine recyclée ou de la pyoverdine néo-synthétisée, en l'absence de la pompe PvdRT-OpmQ, l'accumulation (ou la suraccumulation) se fait dans le périplasma, ce qui suggère fortement que cette pompe est capable de capter son substrat du périplasma pour l'expulser hors de la cellule. La possibilité que des pompes de type ABC soient capables de reconnaître et d'extruder leur substrat à partir du périplasma a déjà été suggérée dans le cas de la pompe MacAB-TolC (Yamanaka et al., 2008).

Ce passage par le périplasma a été démontré pour les systèmes de type RND, qui ont été beaucoup plus étudiés (pour revue (Lomovskaya et al., 2007)). Les pompes de

membrane interne RND possèdent en effet une cavité périplasmique permettant le passage du substrat, qui est ensuite excrété par efflux (Yu et al., 2003b). Cependant, les études structurales des transporteurs ABC montrent que, contrairement aux RND, les boucles périplasmiques sont très courtes (Hollenstein et al., 2007). On peut donc s'interroger sur les modalités de prise en charge du substrat au niveau du périplasme.

Des études structurales de la protéine de membrane interne PvdT permettraient comprendre exactement où se situe la porte d'entrée du substrat et de déterminer la poche de liaison du substrat ainsi que sa spécificité et son mode de reconnaissance. La résolution des structures des deux autres partenaires de cette pompe permettrait aussi de répondre en partie à différentes questions : comment se fait le mécanisme d'assemblage de la pompe, les composants s'assemblent-ils suite à un signal (par exemple en réponse à la présence du substrat), quelle est la stœchiométrie des différents composants, quel est leur fonctionnement individuel et collectif, quel est le mécanisme de pompage ?

Une autre alternative pour répondre à ces questions très mécanistiques serait d'exploiter les propriétés de fluorescence du substrat de cette pompe, la pyoverdine, qui pourrait alors servir de marqueur moléculaire. Ainsi, la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ pourrait constituer un modèle d'étude de la mécanistique des pompes d'efflux de type ABC.

On peut aussi envisager l'ajout d'étiquettes fluorescentes aux différentes protéines du complexe et du système pyoverdine pour en étudier les interactions moléculaires. Enfin, en utilisant la capacité de recyclage de cette pompe, on pourrait construire des protéines chimères afin d'identifier les domaines structuraux essentiels à l'activité de cette pompe et de chacun de ses composants.

Par ailleurs, chez *P. aeruginosa*, la pyoverdine est aussi un facteur de virulence, nécessaire à l'infection de l'hôte, et une molécule signal pour la production d'autres facteurs de virulence (Lamont et al., 2002; Visca et al., 2007). La pompe à efflux PvdRT-OpmQ est donc impliquée, de façon indirecte dans la virulence. La compréhension de la mécanistique du système de sécrétion de la pyoverdine pourrait être utilisée à des fins de recherches médicales pour lutter contre cette bactérie pathogène pour l'homme.

### ***Vers la mise en évidence d'un nouveau niveau de régulation ?***

Au bilan, la biosynthèse et la sécrétion des sidérophore induisent un coût énergétique probablement très élevé pour la bactérie (Greenwood and Luke, 1978; Raymond et al., 2003). Il convient donc pour celle-ci d'en contrôler, à différents niveaux,

la production, mais aussi probablement la sécrétion. Chez *P. aeruginosa*, le recyclage et l'utilisation de sidérophores hétérologues font certainement partie de ces stratégies d'économies d'énergie.

Le lien étroit entre l'enzyme PvdQ, le récepteur de membrane externe FpvAI et la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ mis en évidence dans ce travail pourrait former un nouveau niveau de régulation. Dans ce système, PvdQ semble avoir un rôle central puisque, de façon très intéressante, dans le double mutant  $\Delta FpvA\Delta pompe$ , le principal produit relargué est le précurseur PVDq, suggérant que l'enzyme PvdQ est alors inactivée.

L'activation du récepteur de membrane externe FpvA par la liaison et le transport de ferripyoverdine, signifiant qu'il y a du fer dans l'environnement, entraîne des changements conformationnels importants au niveau du récepteur. Ceux-ci pourraient constituer, d'une manière ou d'une autre, un signal permettant de déclencher ou d'augmenter l'activité de l'enzyme PvdQ et donc la maturation de précurseur en vue de sa sécrétion.

Il existe dans le génome de *P. aeruginosa* plusieurs acylases allant jusqu'à 35 % d'identité de séquence avec PvdQ, qui auraient pu potentiellement prendre le relais en l'absence de PvdQ. Cependant, le gène *pvdQ* est strictement essentiel à la production de pyoverdine, suggérant une réelle spécificité de l'enzyme codée. On retrouve des homologues de *pvdQ* dans de nombreux génomes de *Pseudomonas* fluorescents, ce qui tend aussi à montrer son importance dans une fonction générale de la biosynthèse de la pyoverdine.

De façon surprenante, le gène *pvdQ* ne possède pas de promoteur dépendant du facteur sigma PvdS, contrairement à la majorité des gènes de production de la pyoverdine. Il possède en revanche une boîte Fur, impliquant que la transcription de ce gène se fait dès la détection de conditions de restriction en fer.

Enfin, un possible lien entre l'activité de PvdQ et le quorum sensing chez *P. aeruginosa* a précédemment été évoqué, sans que ceci n'ait été démontré *in vivo* (Huang et al., 2003).

Un lien entre PvdQ et le quorum sensing, l'activation de PvdQ par FpvA ayant détecté du fer dans l'environnement ou encore l'accumulation physiologique de pyoverdine dans le périplasme, dans le cadre d'un système de stockage à court terme, pourraient faire partie de ces stratégies de contrôle et d'économies pour la bactérie.



---

## Conclusion générale

---

Cette thèse pose les bases moléculaires de la sécrétion et du recyclage de la pyoverdine et permet une compréhension générale première de ces mécanismes dans *P. aeruginosa*.

La sécrétion de la pyoverdine s'effectue en 2 temps, séparés par une étape intermédiaire de maturation périplasmique, avec l'export probablement par PvDE d'un précurseur cytoplasmique de la pyoverdine à travers la membrane interne, puis la sécrétion à travers la membrane externe par la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ de la pyoverdine mature vers le milieu extracellulaire, où elle pourra chélater le fer de l'environnement.

Dans le périplasme, le précurseur de la pyoverdine subit la cyclisation de son chromophore, dans laquelle interviennent les enzymes PvdN, PvdO et PvdP, puis une étape de maturation catalysée par PvdQ, probablement le clivage d'une chaîne latérale acyle.

Enfin, dans la continuité de l'étude des mécanismes de transport du fer par la pyoverdine menés au laboratoire, ce travail montre également que la pyoverdine, une fois dissociée du fer dans le périplasme, est recyclée vers le milieu extracellulaire par la pompe PvdRT-OpmQ, donc par la même voie que la sécrétion.

Toutes les données apportées par la contribution de cette thèse permettent de proposer un schéma général des voies de maturation, de sécrétion et de recyclage de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* (figure 33):

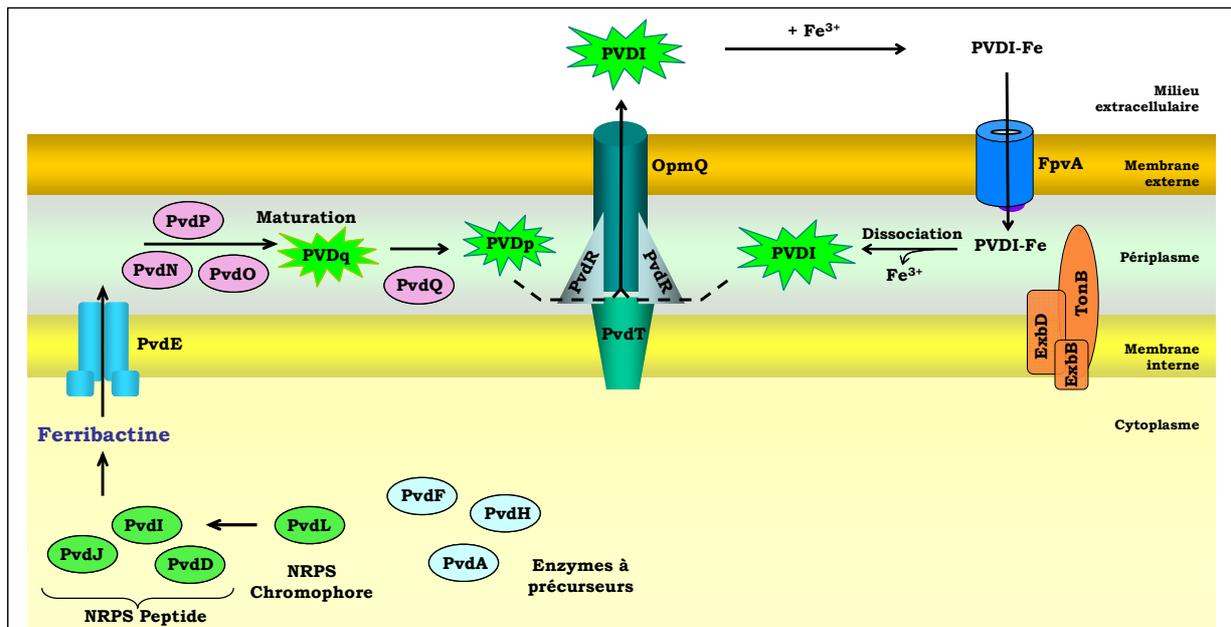


Figure 33 : Proposition d'un modèle pour les étapes tardives de biosynthèse de la pyoverdine et son export vers le milieu extracellulaire à partir des données obtenues dans cette thèse.

La ferribactine ou un autre précurseur cytoplasmique non fluorescent est transporté dans le périplasma par le transporteur ABC de membrane interne PvdE. Ce précurseur subit alors des étapes de maturation par les enzymes PvdN, PvdO et PvdP, conduisant au précurseur fluorescent PVDq. L'action de l'acylase PvdQ est alors nécessaire pour obtenir le composé de pyoverdine néo-synthétisé PVDp. Cette pyoverdine est ensuite sécrétée par la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ dans le milieu extracellulaire. Après chélation du fer, le complexe pyoverdine-Fe est transporté dans le périplasma de la bactérie par le récepteur de membrane externe FpvAI. Là, il est dissocié et la pyoverdine est recyclée dans le milieu extracellulaire par la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ.

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., and Iwata, S. (2003). Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* (New York, NY) *301*, 610-615.
- Ackerley, D.F., Caradoc-Davies, T.T., and Lamont, I.L. (2003). Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *185*, 2848-2855.
- Adams, H., Zeder-Lutz, G., Schalk, I., Pattus, F., and Celia, H. (2006). Interaction of TonB with the outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *188*, 5752-5761.
- Adhikari, P., Kirby, S.D., Nowalk, A.J., Veraldi, K.L., Schryvers, A.B., and Mietzner, T.A. (1995). Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *The Journal of biological chemistry* *270*, 25142-25149.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004a). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *The Journal of biological chemistry* *279*, 52816-52819.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004b). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* *279*, 25939-25942.
- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994). Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem*, 6391-6402.
- Albrecht-Gary, A.M., and Crumbliss, A.L. (1998). Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Metal ions in biological systems* *35*, 239-327.
- Allard, K.A., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (2006). IbtA and IbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *Journal of bacteriology* *188*, 1351-1363.
- Anderson, D.S., Adhikari, P., Nowalk, A.J., Chen, C.Y., and Mietzner, T.A. (2004). The hFbpABC transporter from *Haemophilus influenzae* functions as a binding-protein-dependent ABC transporter with high specificity and affinity for ferric iron. *Journal of bacteriology* *186*, 6220-6229.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews* *27*, 215-237.
- Ankenbauer, R., Hanne, L.F., and Cox, C.D. (1986). Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdine production. *Journal of bacteriology* *167*, 7-11.
- Aumercier, M., Murray, D.M., and Rosner, J.L. (1990). Potentiation of susceptibility to aminoglycosides by salicylate in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *34*, 786-791.
- Barchini, E., and Cowart, R.E. (1996). Extracellular iron reductase activity produced by *Listeria monocytogenes*. *Archives of microbiology* *166*, 51-57.
- Baysse, C., Budzikiewicz, H., Uria Fernandez, D., and Cornelis, P. (2002). Impaired maturation of the siderophore pyoverdine chromophore in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 deficient for the cytochrome c biogenesis protein CcmC. *FEBS letters* *523*, 23-28.
- Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., and Lamont, I.L. (2003). Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence

- factor production and siderophore receptor synthesis. *Molecular microbiology* 47, 195-207.
- Blair, J.M., and Piddock, L.J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current opinion in microbiology* 12, 512-519.
- Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G.J., Nies, D.H., and Grass, G. (2005). TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 187, 6701-6707.
- Bokhove, M., Nadal Jimenez, P., Quax, W.J., and Dijkstra, B.W. The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 686-691.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., and Walmsley, A.R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *The Biochemical journal* 376, 313-338.
- Braun, V. (1997). Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. *Biological chemistry* 378, 779-786.
- Braun, V. (2003). Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* 8, s1409-1421.
- Braun, V. (2006). Energy transfer between biological membranes. *ACS chemical biology* 1, 352-354.
- Braun, V., and Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS letters* 529, 78-85.
- Braun, V., Gaisser, S., Herrmann, C., Kampfenkel, K., Killmann, H., and 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. *Journal of bacteriology* 178, 2836-2845.
- Braun, V., Mahren, S., and Ogierman, M. (2003). Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Current opinion in microbiology* 6, 173-180.
- Braun, V., Mahren, S., and Sauter, A. (2006). Gene regulation by transmembrane signaling. *Biometals* 19, 103-113.
- Brickman, T.J., and Armstrong, S.K. (2005). *Bordetella* AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *Journal of bacteriology* 187, 3650-3661.
- Brickman, T.J., and McIntosh, M.A. (1992). Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *The Journal of biological chemistry* 267, 12350-12355.
- Brillet, K., Journet, L., Celia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., and 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.
- Brillet, K., Meksem, A., Lauber, E., Reimann, C., and 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, 326-331.
- Brinkman, K.K., and Larsen, R.A. (2008). Interactions of the energy transducer TonB with noncognate energy-harvesting complexes. *Journal of bacteriology* 190, 421-427.
- Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature structural biology* 6, 56-63.
- Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS microbiology reviews* 10, 209-228.

- Budzikiewicz, H., Schafer, M., Fernandez, D.U., Matthijs, S., and Cornelis, P. (2007). Characterization of the chromophores of pyoverdins and related siderophores by electrospray tandem mass spectrometry. *Biometals* 20, 135-144.
- Carrano, C.J., Drechsel, H., Kaiser, D., Jung, G., Matzanke, B., Winkelmann, G., Rochel, N., and Albrecht-Gary, A.M. (1996). Coordination Chemistry of the Carboxylate Type Siderophore Rhizoferrin: The Iron(III) Complex and Its Metal Analogs. *Inorganic chemistry* 35, 6429-6436.
- Cescau, S., Cwerman, H., Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., and Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals* 20, 603-613.
- Challis, G.L., Ravel, J., and Townsend, C.A. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry & biology* 7, 211-224.
- Chang, C., Mooser, A., Pluckthun, A., and Wlodawer, A. (2001). Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *The Journal of biological chemistry* 276, 27535-27540.
- Chimento, D.P., Mohanty, A.K., Kadner, R.J., and Wiener, M.C. (2003). Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nature structural biology* 10, 394-401.
- Chipperfield, J.R., and Ratledge, C. (2000). Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals* 13, 165-168.
- Clement, E., Mesini, P.J., Pattus, F., and 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., Folschweiller, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2005a). The crystal structure of the pyoverdinin outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 angstroms resolution. *Journal of molecular biology* 347, 121-134.
- Cobessi, D., Celia, H., and Pattus, F. (2005b). Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology* 352, 893-904.
- Cobessi, D., Meksem, A., and Brillet, K. Structure of the heme/hemoglobin outer membrane receptor ShuA from *Shigella dysenteriae*: heme binding by an induced fit mechanism. *Proteins* 78, 286-294.
- Cornelis, P., and Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdins. *Environmental microbiology* 4, 787-798.
- Cornelissen, C.N. (2003). Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 8, d836-847.
- Cox, C.D. (1980). Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 142, 581-587.
- Crosa, J.H., and Walsh, C.T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 223-249.
- Crouch, M.L., Castor, M., Karlinsey, J.E., Kalhorn, T., and Fang, F.C. (2008). Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 67, 971-983.
- Cuiv, P.O., Clarke, P., Lynch, D., and O'Connell, M. (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. *Journal of bacteriology* 186, 2996-3005.
- Cuiv, P.O., Keogh, D., Clarke, P., and 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. *Journal of bacteriology* 189, 284-287.

- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R., and Lamont, I.L. (1995). Cloning and characterization of *pvdS*, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *Journal of bacteriology* *177*, 2744-2750.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual review of biochemistry* *73*, 241-268.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* *443*, 180-185.
- de Chial, M., Ghysels, B., Beatson, S.A., Geoffroy, V., Meyer, J.M., Pattery, T., Baysse, C., Chablain, P., Parsons, Y.N., Winstanley, C., *et al.* (2003). Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* *149*, 821-831.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K., and Masse, E. (2009). Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *The EMBO journal* *28*, 1551-1561.
- Dhungana, S., Anderson, D.S., Mietzner, T.A., and Crumbliss, A.L. (2005). Kinetics of iron release from ferric binding protein (FbpA): mechanistic implications in bacterial periplasm-to-cytosol Fe<sup>3+</sup> transport. *Biochemistry* *44*, 9606-9618.
- Dorrestein, P.C., Poole, K., and Begley, T.P. (2003). Formation of the chromophore of the pyoverdine siderophores by an oxidative cascade. *Organic letters* *5*, 2215-2217.
- Dorsey, C.W., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., and Actis, L.A. (2003). Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology (Reading, England)* *149*, 1227-1238.
- Drake, E.J., and Gulick, A.M. (2008). Three-dimensional structures of *Pseudomonas aeruginosa* PvcA and PvcB, two proteins involved in the synthesis of 2-isocyano-6,7-dihydroxycoumarin. *Journal of molecular biology* *384*, 193-205.
- Eick-Helmerich, K., and Braun, V. (1989). Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *Journal of bacteriology* *171*, 5117-5126.
- Eisenhauer, H.A., Shames, S., Pawelek, P.D., and Coulton, J.W. (2005). Siderophore transport through *Escherichia coli* outer membrane receptor FhuA with disulfide-tethered cork and barrel domains. *The Journal of biological chemistry* *280*, 30574-30580.
- Elkins, C.A., and Nikaido, H. (2003). 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist Updat* *6*, 9-13.
- Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology* *181*, 6223-6229.
- Evans, J.S., Levine, B.A., Trayer, I.P., Dorman, C.J., and Higgins, C.F. (1986). Sequence-imposed structural constraints in the TonB protein of *E. coli*. *FEBS letters* *208*, 211-216.
- Faraldo-Gomez, J.D., and Sansom, M.S. (2003). Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 105-116.
- Ferguson, A.D., Amezcuca, C.A., Halabi, N.M., Chelliah, Y., Rosen, M.K., Ranganathan, R., and Deisenhofer, J. (2007). Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 513-518.
- Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Esser, L., van der Helm, D., and Deisenhofer, J. (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science (New York, NY)* *295*, 1715-1719.
- Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K., and Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science (New York, NY)* *282*, 2215-2220.
- Finking, R., and Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annual review of microbiology* *58*, 453-488.

- Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M.A., Pattus, F., and Schalk, I.J. (2002). The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 41, 14591-14601.
- Franza, T., Mahe, B., and Expert, D. (2005). *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular microbiology* 55, 261-275.
- Furrer, J.L., Sanders, D.N., Hook-Barnard, I.G., and McIntosh, M.A. (2002). Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Molecular microbiology* 44, 1225-1234.
- Garcia-Herrero, A., Peacock, R.S., Howard, S.P., and 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. *Molecular microbiology* 66, 872-889.
- Garcia-Herrero, A., and 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*. *Molecular microbiology* 58, 1226-1237.
- Ge, L., and Seah, S.Y. (2006). Heterologous expression, purification, and characterization of an l-ornithine N(5)-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 188, 7205-7210.
- Ghosh, J., and Postle, K. (2005). Disulphide trapping of an in vivo energy-dependent conformation of *Escherichia coli* TonB protein. *Molecular microbiology* 55, 276-288.
- Ghysels, B., Dieu, B.T., Beatson, S.A., Pirnay, J.P., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., and Cornelis, P. (2004). FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* 150, 1671-1680.
- Graham, L.L., Beveridge, T.J., and Nanninga, N. (1991). Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends in biochemical sciences* 16, 328-329.
- Grass, G. (2006). Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* 19, 159-172.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L., Graumann, P.L., and Schalk, I.J. (2007). Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *The Journal of biological chemistry* 282, 2987-2995.
- Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.M., Schalk, I.J., and Pattus, F. (2009). FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Molecular microbiology* 72, 1246-1259.
- Greenwald, J., Zeder-Lutz, G., Hagege, A., Celia, H., and Pattus, F. (2008). The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FpvA. *Journal of bacteriology* 190, 6548-6558.
- Greenwood, K.T., and Luke, R.K. (1978). Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in *Escherichia coli* K-12. Properties of enterochelin esterase. *Biochimica et biophysica acta* 525, 209-218.
- Guerinot, M.L. (1994). Microbial iron transport. *Annual review of microbiology* 48, 743-772.
- Gumbart, J., Wiener, M.C., and Tajkhorshid, E. (2007). Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophysical journal* 93, 496-504.
- Hancock, R.E. (1998). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1, S93-99.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L., Shanzer, A., and Schalk, I.J. The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and recycling of the modified desferrichrome. *Journal of bacteriology* 192, 1212-1220.

- Hannavy, K., Barr, G.C., Dorman, C.J., Adamson, J., Mazengera, L.R., Gallagher, M.P., Evans, J.S., Levine, B.A., Trayer, I.P., and Higgins, C.F. (1990). TonB protein of *Salmonella typhimurium*. A model for signal transduction between membranes. *Journal of molecular biology* 216, 897-910.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology* 4, 172-177.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., and Winkelmann, G. (2003). Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3677-3682.
- Harding, R.A., and Royt, P.W. (1990). Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of general microbiology* 136, 1859-1867.
- Harrington, J.M., and Crumbliss, A.L. (2009). The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *Biometals* 22, 679-689.
- Hartmann, A., and Braun, V. (1980). Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *Journal of bacteriology* 143, 246-255.
- Hay, B.P., Dixon, D.A., Vargas, R., Garza, J., and Raymond, K.N. (2001). Structural criteria for the rational design of selective ligands. 3. Quantitative structure-stability relationship for iron(III) complexation by tris-catecholamide siderophores. *Inorganic chemistry* 40, 3922-3935.
- Helmann, J.D. (2002). The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Advances in microbial physiology* 46, 47-110.
- Hersman, L., Lloyd, T., and Sposito, G. (1995). Siderophore promoted dissolution of hematite. *Geochim Cosmochim Acta* 59: 3327-3330.
- Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9994-9999.
- Higgs, P.I., Larsen, R.A., and Postle, K. (2002). Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Molecular microbiology* 44, 271-281.
- Higgs, P.I., Myers, P.S., and Postle, K. (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *Journal of bacteriology* 180, 6031-6038.
- Hirai, T., Heymann, J.A., Shi, D., Sarker, R., Maloney, P.C., and Subramaniam, S. (2002). Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nature structural biology* 9, 597-600.
- Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G.L., Vincent, M., Gallay, J., and Schalk, I.J. (2005). Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 280, 20222-20230.
- Hohlneicher, U., Schafer, M., Fuchs, R., and Budzikiewicz, H. (2001). Ferribactins as the biosynthetic precursors of the *Pseudomonas* siderophores pyoverdins. *Zeitschrift fur Naturforschung* 56, 308-310.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current opinion in structural biology* 17, 412-418.
- Huang, J.J., Han, J.I., Zhang, L.H., and Leadbetter, J.R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology* 69, 5941-5949.
- Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M., and Leadbetter, J.R. (2006). Identification of QuiP, the product of gene PA1032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology* 72, 1190-1197.
- Hunt, T.A., Peng, W.T., Loubens, I., and Storey, D.G. (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* alternative sigma factor PvdS controls exotoxin A expression and is

- expressed in lung infections associated with cystic fibrosis. *Microbiology (Reading, England)* *148*, 3183-3193.
- Iglewski, B.H., Sadoff, J., Bjorn, M.J., and Maxwell, E.S. (1978). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *75*, 3211-3215.
- Imperi, F., Ciccocanti, F., Perdomo, A.B., Tiburzi, F., Mancone, C., Alonzi, T., Ascenzi, P., Piacentini, M., Visca, P., and Fimia, G.M. (2009). Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics* *9*, 1901-1915.
- Jacques, J.F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., and Masse, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* *62*, 1181-1190.
- James, H.E., Beare, P.A., Martin, L.W., and Lamont, I.L. (2005). Mutational analysis of a bifunctional ferrisiderophore receptor and signal-transducing protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *187*, 4514-4520.
- Jaskula, J.C., Letain, T.E., Roof, S.K., Skare, J.T., and Postle, K. (1994). Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. *Journal of bacteriology* *176*, 2326-2338.
- Jones, P.M., and George, A.M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* *61*, 682-699.
- Jones, R.C., Yau, S.C., Iley, J.N., Smith, J.E., Dickson, J., Elsegood, M.R., McKee, V., and Coles, S.J. (2009). Synthesis of the pyoverdinin chromophore by a biomimetic oxidative cyclization. *Organic letters* *11*, 1519-1522.
- Julich, M., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., Meyer, J.M., and Gardan, L. (2001). The structure of the pyoverdinin isolated from various *Pseudomonas syringae* pathovars. *Zeitschrift fur Naturforschung* *56*, 687-694.
- Kammler, M., Schon, C., and Hantke, K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *175*, 6212-6219.
- Kampfenkel, K., and Braun, V. (1992). Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *Journal of bacteriology* *174*, 5485-5487.
- Karlsson, M., Hannavy, K., and Higgins, C.F. (1993). ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Molecular microbiology* *8*, 389-396.
- Kawaharajo, K., Homma, J.Y., Aoyama, Y., Okada, K., and Morihara, K. (1975). Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *The Japanese journal of experimental medicine* *45*, 79-88.
- Klebba, P.E. (2003). Three paradoxes of ferric enterobactin uptake. *Front Biosci* *8*, s1422-1436.
- Koebnik, R. (2005). TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends in microbiology* *13*, 343-347.
- Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annual review of biochemistry* *73*, 467-489.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* *405*, 914-919.
- Koster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in microbiology* *152*, 291-301.
- Koster, W. (2005). Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci* *10*, 462-477.
- Kovacevic, S., Tobin, M.B., and Miller, J.R. (1990). The beta-lactam biosynthesis genes for isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase are expressed from a single transcript in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of bacteriology* *172*, 3952-3958.

- Kratzschmar, J., Krause, M., and Marahiel, M.A. (1989). Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *Journal of bacteriology* *171*, 5422-5429.
- Krewulak, K.D., and Vogel, H.J. (2007). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et biophysica acta*.
- Krieg, S., Hucho, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lecroisey, A., Wandersman, C., Delpech, P., and Welte, W. (2009). Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 1045-1050.
- Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B., and Zgurskaya, H.I. (2008). Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB. *Journal of bacteriology* *190*, 691-698.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 7072-7077.
- Lamont, I.L., and Martin, L.W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* *149*, 833-842.
- Larsen, R.A., Deckert, G.E., Kastead, K.A., Devanathan, S., Keller, K.L., and Postle, K. (2007). His(20) provides the sole functionally significant side chain in the essential TonB transmembrane domain. *Journal of bacteriology* *189*, 2825-2833.
- Larsen, R.A., Letain, T.E., and Postle, K. (2003). In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* *49*, 211-218.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine* *10*, 599-606.
- Law, C.J., Maloney, P.C., and Wang, D.N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annual review of microbiology* *62*, 289-305.
- Lehoux, D.E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2000). Genomics of the 35-kb *pvd* locus and analysis of novel *pvdIJK* genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* *190*, 141-146.
- Lemieux, M.J., Huang, Y., and Wang da, N. (2005). Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. *Journal of electron microscopy* *54 Suppl 1*, i43-46.
- Leoni, L., Ciervo, A., Orsi, N., and Visca, P. (1996). Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *Journal of bacteriology* *178*, 2299-2313.
- Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., and Visca, P. (2000). Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *182*, 1481-1491.
- Letain, T.E., and Postle, K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* *24*, 271-283.
- Lewenza, S., Gardy, J.L., Brinkman, F.S., and 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 research* *15*, 321-329.
- Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K. (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *39*, 1948-1953.
- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008). Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Molecular microbiology* *67*, 458-472.

- Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C.R., Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006). The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *188*, 1882-1891.
- Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M.F., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2007). A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 4612-4617.
- Locher, K.P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J.P., and 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.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H.I., Totrov, M., and Watkins, W.J. (2007). Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 56-65.
- Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D.C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massis, L.M., Ferreira, L.C., *et al.* (2007). Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *The Journal of biological chemistry* *282*, 397-406.
- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V., and Graumann, P.L. (2002). Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *The EMBO journal* *21*, 3108-3118.
- Masse, E., and Arguin, M. (2005). Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends in biochemical sciences* *30*, 462-468.
- Masse, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003a). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & development* *17*, 2374-2383.
- Masse, E., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003b). Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Current opinion in microbiology* *6*, 120-124.
- Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G., and Arguin, M. (2007). Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in microbiology* *10*, 140-145.
- Masse, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* *187*, 6962-6971.
- Matzanke, B.F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein, A.X., and Hantke, K. (2004). FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* *43*, 1386-1392.
- McMorran, B.J., Kumara, H.M., Sullivan, K., and Lamont, I.L. (2001). Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* *147*, 1517-1524.
- McMorran, B.J., Merriman, M.E., Rombel, I.T., and Lamont, I.L. (1996). Characterisation of the *pvdE* gene which is required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* *176*, 55-59.
- Merriman, T.R., Merriman, M.E., and Lamont, I.L. (1995). Nucleotide sequence of *pvdD*, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa*: PvdD has similarity to peptide synthetases. *Journal of bacteriology* *177*, 252-258.
- Meyer, J.M. (2000). Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of microbiology* *174*, 135-142.
- Meyer, J.M., and Abdallah, M.A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of general microbiology* *107*.
- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., and Holder, I.A. (1996). Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* *64*, 518-523.

- Meyer, J.M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1997). Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology (Reading, England)* 143 ( Pt 1), 35-43.
- Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and Reimann, C. (2005). PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Molecular microbiology* 58, 495-509.
- Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 413-451.
- Miethke, M., Schmidt, S., and Marahiel, M.A. (2008). The major facilitator superfamily-type transporter YmfE and the multidrug-efflux activator Mta mediate bacillibactin secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 190, 5143-5152.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H.I., and Ghosh, P. (2006). Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Structure* 14, 577-587.
- Mislin, G.L., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., and Schalk, I.J. (2006). Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology* 357, 1437-1448.
- Miyazaki, H., Kato, H., Nakazawa, T., and Tsuda, M. (1995). A positive regulatory gene, *pvdS*, for expression of pyoverdine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Mol Gen Genet* 248, 17-24.
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernandez, D.U., Schafer, M., Ravel, J., *et al.* (2002). Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Molecular microbiology* 45, 1673-1685.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587-593.
- Nader, M., Dobbelaere, W., Vincent, M., Journet, L., Adams, H., Cobessi, D., Gallay, J., and 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. *The Journal of biological chemistry* 270, 26723-26726.
- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* 78, 119-146.
- Ochsner, U.A., Snyder, A., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002a). Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8312-8317.
- Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002b). GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Molecular microbiology* 45, 1277-1287.
- Ogierman, M., and Braun, V. (2003). Interactions between the outer membrane ferric citrate transporter FecA and TonB: studies of the FecA TonB box. *Journal of bacteriology* 185, 1870-1885.
- Oglesby, A.G., Farrow, J.M., 3rd, Lee, J.H., Tomaras, A.P., Greenberg, E.P., Pesci, E.C., and Vasil, M.L. (2008). The influence of iron on *Pseudomonas aeruginosa* physiology: a regulatory link between iron and quorum sensing. *The Journal of biological chemistry* 283, 15558-15567.
- Oldham, M.L., Davidson, A.L., and Chen, J. (2008). Structural insights into ABC transporter mechanism. *Current opinion in structural biology* 18, 726-733.
- Ollis, A.A., Manning, M., Held, K.G., and Postle, K. (2009). Cytoplasmic membrane protonmotive force energizes periplasmic interactions between ExbD and TonB. *Molecular microbiology* 73, 466-481.

- Page, W.J., Kwon, E., Cornish, A.S., and Tindale, A.E. (2003). The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catecholate siderophore export. *FEMS microbiology letters* 228, 211-216.
- Palma, M., Worgall, S., and Quadri, L.E. (2003). Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Archives of microbiology* 180, 374-379.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1-34.
- Parsek, M.R., and Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual review of microbiology* 57, 677-701.
- Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S., and Saier, M.H., Jr. (1997). A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS microbiology letters* 156, 1-8.
- Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M., and Coulton, J.W. (2006). Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science (New York, NY)* 312, 1399-1402.
- Poole, K. (2001a). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 3, 255-264.
- Poole, K. (2001b). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current opinion in microbiology* 4, 500-508.
- Poole, K., Heinrichs, D.E., and Neshat, S. (1993a). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Molecular microbiology* 10, 529-544.
- Poole, K., and McKay, G.A. (2003). Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci* 8, d661-686.
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K., and Heinrichs, D.E. (1993b). Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 175, 4597-4604.
- Poole, K., Young, L., and Neshat, S. (1990). Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 172, 6991-6996.
- Poole, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., and Dean, C.R. (1996). The *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 6), 1449-1458.
- Postle, K., and Kadner, R.J. (2003). Touch and go: tying TonB to transport. *Molecular microbiology* 49, 869-882.
- Postle, K., and Larsen, R.A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals* 20, 453-465.
- Postle, K., and Skare, J.T. (1988). *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *The Journal of biological chemistry* 263, 11000-11007.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews* 32, 38-55.
- Rached, E., Hooper, N.M., James, P., Semenza, G., Turner, A.J., and Mantei, N. (1990). cDNA cloning and expression in *Xenopus laevis* oocytes of pig renal dipeptidase, a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *The Biochemical journal* 271, 755-760.
- Ratledge, C., and Dover, L.G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* 54, 881-941.
- Ravel, J., and Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in microbiology* 11, 195-200.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A., and Kim, S.S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3584-3588.

- Redly, G.A., and Poole, K. (2003). Pyoverdine-mediated regulation of FpvA synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a probable extracytoplasmic-function sigma factor, FpvI. *Journal of bacteriology* *185*, 1261-1265.
- Redly, G.A., and 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. *Journal of bacteriology* *187*, 5648-5657.
- Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 218-227.
- Richens, D.T. (2005). Ligand substitution reactions at inorganic centers. *Chemical reviews* *105*, 1961-2002.
- Rombel, I.T., and Lamont, I.L. (1992). DNA homology between siderophore genes from fluorescent pseudomonads. *Journal of general microbiology* *138*, 181-187.
- Rombel, I.T., McMorrnan, B.J., and Lamont, I.L. (1995). Identification of a DNA sequence motif required for expression of iron-regulated genes in pseudomonads. *Mol Gen Genet* *246*, 519-528.
- Saier, M.H., Jr., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jahn, P.S., Lew, K., Liu, J., *et al.* (1999). The major facilitator superfamily. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* *1*, 257-279.
- Sansom, M.S. (1999). Membrane proteins: A tale of barrels and corks. *Curr Biol* *9*, R254-257.
- Sauter, A., Howard, S.P., and Braun, V. (2003). In vivo evidence for TonB dimerization. *Journal of bacteriology* *185*, 5747-5754.
- Schäfer, H., Taraz, K., and Budzikiewicz, H. (1991). *Z Naturforsch* *46c*, pp. 398-406.
- Schalk, I.J. (2008). Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *Journal of inorganic biochemistry* *102*, 1159-1169.
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and 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., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2001). Iron-free pyoverdin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Molecular microbiology* *39*, 351-360.
- Schalk, I.J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M.A., and 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.
- Schalk, I.J., Lamont, I.L., and Cobessi, D. (2009). Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* *22*, 671-678.
- Schneider, E., and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS microbiology reviews* *22*, 1-20.
- Sennauser, G., Bukowska, M.A., Briand, C., and Grutter, M.G. (2009). Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology* *389*, 134-145.
- Shen, J., Meldrum, A., and Poole, K. (2002). FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *184*, 3268-3275.
- Shultis, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N., and Wiener, M.C. (2006). Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science (New York, NY)* *312*, 1396-1399.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., and Ames, G.F. (1991). Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *The Journal of biological chemistry* *266*, 18714-18719.

- Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P., and Quax, W.J. (2006). Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity* 74, 1673-1682.
- Smith, E.E., Sims, E.H., Spencer, D.H., Kaul, R., and Olson, M.V. (2005). Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 187, 2138-2147.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & biology* 6, 493-505.
- Stintzi, A., Cornelis, P., Hohnadel, D., Meyer, J.M., Dean, C., Poole, K., Kourambas, S., and Krishnapillai, V. (1996). Novel pyoverdine biosynthesis gene(s) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology (Reading, England)* 142 ( Pt 5), 1181-1190.
- Stintzi, A., Johnson, Z., Stonehouse, M., Ochsner, U., Meyer, J.M., Vasil, M.L., and Poole, K. (1999). The pvc gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. *Journal of bacteriology* 181, 4118-4124.
- Storz, G., and Imlay, J.A. (1999). Oxidative stress. *Current opinion in microbiology* 2, 188-194.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., *et al.* (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000a). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infection and immunity* 68, 1834-1839.
- Takase, H., Nitani, H., Hoshino, K., and Otani, T. (2000b). Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infection and immunity* 68, 4498-4504.
- Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyoshi, S., Shinoda, S., and Yamamoto, S. (2003). Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 185, 6938-6949.
- Tanabe, T., Nakao, H., Kuroda, T., Tsuchiya, T., and Yamamoto, S. (2006). Involvement of the *Vibrio parahaemolyticus* pvsC gene in export of the siderophore vibrioferrin. *Microbiology and immunology* 50, 871-876.
- Taraz, K., Seinsche, D., and Budzikiewicz, H. (1991). [Pseudobactin and pseudobactin A variants: new pyoverdine type peptide siderophores from *Pseudomonas fluorescens* "E2"]. *Zeitschrift fur Naturforschung* 46, 522-526.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine* 119, S3-10; discussion S62-70.
- Tikhonova, E.B., Dastidar, V., Rybenkov, V.V., and Zgurskaya, H.I. (2009). Kinetic control of TolC recruitment by multidrug efflux complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16416-16421.
- Tikhonova, E.B., and Zgurskaya, H.I. (2004). AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *The Journal of biological chemistry* 279, 32116-32124.
- Touze, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Molecular microbiology* 53, 697-706.
- Tseng, C.F., Burger, A., Mislin, G.L., Schalk, I.J., Yu, S.S., Chan, S.I., and Abdallah, M.A. (2006). Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of

- the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *J Biol Inorg Chem* *11*, 419-432.
- Tsuda, M., Miyazaki, H., and Nakazawa, T. (1995). Genetic and physical mapping of genes involved in pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of bacteriology* *177*, 423-431.
- van Oeffelen, L., Cornelis, P., Van Delm, W., De Ridder, F., De Moor, B., and Moreau, Y. (2008). Detecting cis-regulatory binding sites for cooperatively binding proteins. *Nucleic acids research* *36*, e46.
- Vandenende, C.S., Vlasschaert, M., and Seah, S.Y. (2004). Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* *186*, 5596-5602.
- Vasil, M.L., and Ochsner, U.A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular microbiology* *34*, 399-413.
- Visca, P., Ciervo, A., and Orsi, N. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *176*, 1128-1140.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in microbiology* *15*, 22-30.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular microbiology* *45*, 1177-1190.
- Visca, P., Serino, L., and Orsi, N. (1992). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants blocked in the synthesis of pyoverdine. *Journal of bacteriology* *174*, 5727-5731.
- Voulhoux, R., Filloux, A., and Schalk, I.J. (2006). Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: the Tat system is required for PvdN but not for FpvA transport. *Journal of bacteriology* *188*, 3317-3323.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology* *58*, 611-647.
- Wasielewski, E., Tzou, D.L., Dillmann, B., Czaplicki, J., Abdallah, M.A., Atkinson, R.A., and Kieffer, B. (2008). Multiple conformations of the metal-bound pyoverdine PvdI, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: a nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* *47*, 3397-3406.
- Weinberg, E.D. (1997). The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspectives in biology and medicine* *40*, 578-583.
- Wiener, M.C. (2005). TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Current opinion in structural biology* *15*, 394-400.
- Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and Vasil, M.L. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 9792-9797.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., and Vasil, M.L. (2001). Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* *69*, 5385-5394.
- Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2000). Characterization of an ECF sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and biophysical research communications* *273*, 578-583.
- Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2006). Mutational analysis of an extracytoplasmic-function sigma factor to investigate its interactions with RNA polymerase and DNA. *Journal of bacteriology* *188*, 1935-1942.
- Wilson, M.J., McMorran, B.J., and Lamont, I.L. (2001). Analysis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-function sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* *183*, 2151-2155.
- Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions* *30*, 691-696.

- Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., and 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. *Journal of molecular biology* 368, 398-406.
- Yamanaka, H., Kobayashi, H., Takahashi, E., and Okamoto, K. (2008). MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of bacteriology* 190, 7693-7698.
- Yin, Y., He, X., Szewczyk, P., Nguyen, T., and Chang, G. (2006). Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science (New York, NY)* 312, 741-744.
- Yu, E.W., Aires, J.R., and Nikaido, H. (2003a). AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *Journal of bacteriology* 185, 5657-5664.
- Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., and Koshland, D.E., Jr. (2003b). Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science (New York, NY)* 300, 976-980.
- Yue, W.W., Grizot, S., and Buchanan, S.K. (2003). Structural evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *Journal of molecular biology* 332, 353-368.
- Yum, S., Xu, Y., Piao, S., Sim, S.H., Kim, H.M., Jo, W.S., Kim, K.J., Kweon, H.S., Jeong, M.H., Jeon, H., *et al.* (2009). Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump. *Journal of molecular biology* 387, 1286-1297.
- Zgurskaya, H.I. (2009). Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly. *Future microbiology* 4, 919-932.
- Zgurskaya, H.I., Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B., Lau, S.Y., and Stratton, K.L. (2003). Mechanism of antibiotic efflux in Gram-negative bacteria. *Front Biosci* 8, s862-873.
- Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7190-7195.
- Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular microbiology* 37, 219-225.
- Zgurskaya, H.I., Yamada, Y., Tikhonova, E.B., Ge, Q., and Krishnamoorthy, G. (2009). Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1794, 794-807.
- Zhao, Q., Li, X.Z., Mistry, A., Srikumar, R., Zhang, L., Lomovskaya, O., and Poole, K. (1998). Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 2225-2231.
- Zhao, Q., and Poole, K. (2000). A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes. *FEMS microbiology letters* 184, 127-132.
- Zhu, W., Arceneaux, J.E., Beggs, M.L., Byers, B.R., Eisenach, K.D., and Lundrigan, M.D. (1998). Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes. *Molecular microbiology* 29, 629-639.

## Résumé

En conditions de carence en fer, *P. aeruginosa* produit majoritairement un sidérophore fluorescent, la pyoverdine. Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire, sécrétées par les bactéries dans le milieu extracellulaire et capables de chélater le fer ferrique avec une très forte affinité. Lorsque le complexe ferrisidérophore est formé, il est transporté dans la cellule bactérienne via des voies spécifiques d'assimilation.

La pyoverdine est constituée d'un peptide de huit acides aminés en partie cyclisé et d'un chromophore, qui confère à la molécule ses propriétés de fluorescence. La biosynthèse de la pyoverdine est réalisée par un mécanisme non ribosomique dans le cytoplasme et aboutit à la formation d'un précurseur peptidique non fluorescent.

Dans cette thèse, nous montrons que ce précurseur cytoplasmique non fluorescent est exporté dans le périplasma par le transporteur ABC PvdE. Par différentes techniques impliquant des fractionnements cellulaires et de la microscopie de fluorescence, nous montrons également que ce précurseur subit dans le périplasma plusieurs étapes de maturation, catalysées par les enzymes PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ. Cette étude a par ailleurs permis d'isoler et de caractériser un nouvel intermédiaire de synthèse. Dans ce travail, nous mettons également en évidence dans cette bactérie une accumulation de pyoverdine ou de son précurseur dans le périplasma, ceci se traduisant en microscopie de fluorescence par un anneau de fluorescence périplasmique.

Enfin, nous avons identifié la pompe d'efflux, PvdRT-OpmQ, responsable de la sécrétion de la pyoverdine du périplasma vers le milieu extracellulaire. Cette pompe est également impliquée dans le recyclage hors de la cellule de la pyoverdine ayant transporté du fer.

## Summary

Under iron-limited conditions, *P. aeruginosa* produces majoritarily a fluorescent siderophore called pyoverdine. Siderophores are molecules of low molecular weight, secreted into the extracellular medium by the bacteria in order to get access to iron. Siderophores have a high affinity for ferric iron. Once the ferrisiderophore complexes formed they are transported back into the bacterial cells via specific assimilation pathways.

Pyoverdine is composed of a fluorescent chromophore linked to a partly cyclic octapeptide. Its biosynthesis involves non-ribosomal mechanisms taking place in the cytoplasm, and ends in the formation of a non-fluorescent peptidic precursor.

In this thesis, we have shown that this cytoplasmic non-fluorescent precursor is exported into the periplasm by the ABC PvdE transporter. Using cellular fractionation and fluorescence microscopy techniques, we have also shown that this precursor undergoes, in the periplasm, several stages of maturation, which are catalyzed by PvdN, PvdO, PvdP and PvdQ enzymes. This work has also permitted to isolate and characterize a new intermediary of synthesis. Fluorescence microscopy allowed us to show that pyoverdine or pyoverdine precursor accumulate in the periplasm. This can be visualized on bacteria by a periplasmic fluorescent ring.

Finally, the efflux pump PvdRT-OpmQ involved in the secretion of pyoverdine from the periplasm to the extracellular medium has been identified. This pump is also involved in the recycling of pyoverdine having already transported iron into periplasm.