

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

**THESE**

Présentée le **5 octobre 2011** pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Science du vivant

Spécialité : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la biologie

**Études des mécanismes moléculaires impliqués dans  
l'acquisition du fer par la pyoverdine et le  
ferrichrome chez *Pseudomonas aeruginosa***

Par **Mélissa Hannauer**

**Composition du jury :**

Rapporteur externe 1 :

Pr Alain Filloux

Rapporteur externe 2 :

Dr Hilde De Reuse

Examineur interne :

Pr Petra Hellwig

Examineur externe 1 :

Pr Marc Fontecave

Examineur externe 2 :

Dr Dominique Expert

Directeur de thèse :

Dr Isabelle Schalk



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier profondément le Dr Isabelle Schalk de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces 4 années de thèse. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la science et la recherche, de m'avoir appris à avoir un esprit critique et surtout à prendre du recul par rapport aux résultats obtenus. J'ai beaucoup appris durant toutes ces années. Merci de m'avoir soutenue pour la 4<sup>ème</sup> année. Cette année supplémentaire m'a permis de mûrir vis-à-vis de mon travail et d'acquérir l'expérience nécessaire pour continuer dans mon parcours professionnel. Merci de la confiance et du soutien que tu m'as accordé durant toutes ces années, j'ai adoré travailler avec toi.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble des membres du jury (Pr Alain Filloux, Dr Hilde de Reuse, Pr Petra Hellwig, Pr Marc Fontcave et Dr Dominique Expert) pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Gaëtan avec qui j'ai pu découvrir les joies de la spectrométrie de masse et qui a toujours été prêt à m'expliquer les merveilles de la chimie. Je remercie aussi Valérie qui a toujours été de bon conseil particulièrement en ce qui concerne les combats avec l'administration de la fac. Je remercie également Thierry qui m'a fait découvrir le monde de l'enseignement à travers les TP d'écologie microbienne. J'ai apprécié de travailler avec toi.

Je tiens particulièrement à remercier Françoise qui a eu la patience de corriger ce manuscrit mais aussi le courage d'affronter avec moi l'ICP-AES. Eh oui les manips d'une centaines de tubes qu'il fallait ensuite analyser à Colmar que du bonheur!!! Faut croire que l'appareil ne nous aimait pas trop, pas plus que celui de Croenenbourg d'ailleurs!!!! Entre les torches bouchées, celles qui restaient allumées quoi 5min et les bugs d'ordinateurs on aura tout eu!!!

Je désirerais ensuite dire un grand merci à Véro « alias SuperVega », mon mentor en Bio Mol. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eu ainsi que celles un peu moins scientifiques mais tout aussi intéressantes ☺. Si j'avais des questions, tu étais toujours disponible pour m'aider et en discuter. Je suis heureuse que tu ai rejoint l'équipe car sans toi mes journées auraient été bien moins sympathiques. J'aurai aussi moins fait de

sport (partenaire de jogging) et sans oublier les sorties au Caracalla. Bon sur la fin, le jogging on a un peu laissé tomber mais c'est vrai que tu ne cours qu'en boucle lol. C'est vraiment dommage que tu ais emménagé sur Illkirch alors que j'étais partie car on aurait pu se faire des soirées sympa. Enfin merci d'avoir toujours été là même dans les moments où j'étais prête à tout arrêter.

Je voudrais aussi remercier Karl avec qui j'ai eu de bons moments de complicité et de fous rires dont je me souviendrais toujours. Merci de m'avoir supporté pendant 1 an et demi dans le bureau pendant la période relativement stressante qu'est la rédaction. Bon après vu la quantité de gâteau que j'ai fait ce n'était pas trop dur non plus.

Je souhaiterais finalement remercier Laurent qui sait mettre une sacrée ambiance au labo avec son humour bien décalé. J'ai adoré la minute culture général je me demande d'où tu sors certaines de tes infos. Merci aussi à Claire avec qui j'ai bien discuté sur pas mal de choses et qui m'a fait connaître le covoiturage que j'ai expérimenté avec succès. Ça m'as fait plaisir de faire votre connaissance. Je remercie Laurence, ma première stagiaire que je n'oublierai jamais. Grâce à toi j'ai pu apprendre ce qu'est de gérer quelqu'un et je pense que je m'en suis pas trop mal sortie. Je suis ravie de t'avoir rencontré.

Merci à Véro, Laurence et Karl pour ces sorties ciné et after qui ont égayé mes soirées de célibataire géo ☺!!!!

Je remercie également tous les autres membres de l'équipe pour leur bonne humeur et gentillesse.

Je souhaite faire un petit clin d'œil à Fatima avec qui j'ai eu des discussions très intéressantes souvent interdites aux -18 ;-). Je remercie également Christelle, Renaud et Olivier avec qui j'ai eu plaisir à discuter.

Je voudrais remercier Claire, notre gestionnaire, à qui j'ai envoyé, je ne sais combien de commandes et Jacky notre homme à tout faire et comique à ses heures perdues. Je remercie également tous les membres passé et présent de l'unité que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces 4 années de thèses.

Merci à mon ami Alex de m'avoir supporté et d'avoir été là quand j'en avais besoin. Je sais que c'est pas facile de me supporter mais après toutes ces années tu devrais être habitué



non ?? Merci à ma meilleur amie Céline qui malgré la distance à toujours été là et m'a surtout permis de me changer les idées quand il le fallait. Même si tu ne comprenais pas grand choses à mes manips, tu as toujours été là pour discuter. Merci pour ce super week end chez toi qui m'a fait un bien fou et m'a permis de me détendre un peu durant ma rédaction. Je tiens aussi à remercier Marie et Séverine qui ont partagé avec moi et quasiment en même temps les difficultés, angoisses et stress de la rédaction. Ça fait du bien de savoir que tout le monde est dans la même galère avec les mêmes préoccupations.

Merci papa d'avoir été avec moi comme tu le pouvais. Je sais que tu es très occupé par ton travail et que tu essayes d'être présent autant que possible.

Je remercie chaleureusement et du fond du cœur mon mari qui a eu le courage et la patience de me supporter durant ces 4 années de thèses. Tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter et me motiver lors de mes périodes de doute. Malgré les crises de larmes et de stress, tu a toujours été à mes côtés sans jamais douter de moi. Tu as également pris le temps de corriger ce manuscrit et ce tout en étant en détachement en Afghanistan. Sans toi je n'aurai pas eu le courage de mener ce travail à terme. Je te remercie tout simplement d'être là, de m'épauler, me motiver et aussi de me pousser à continuer dans cette voie et surtout merci de croire en moi !!!

Finalement, je dédie ce manuscrit à ma maman sans qui je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Tu as su me guider et me motiver dans mes choix. Tu as toujours tout fait pour que je puisse continuer dans cette voie même si ça n'a pas toujours été facile. Tu as toujours cru en moi contrairement à moi qui suis très pessimiste et pense toujours tout rater. Eh bien me voilà à présenter mon doctorat. Qui aurait cru que j'arriverai jusque là ? Tu as toujours été là pour me reconforté pendant mes périodes de stress. Merci à Francis et toi de m'avoir hébergé durant les derniers mois de ma thèse qui ne sont pas forcément les plus faciles. Merci à vous deux de m'avoir soutenue malgré mes crises de stress et d'avoir fait preuve de tant de patience. Cette période chez vous m'a permis justement de me détacher un peu du boulot et de penser à autre chose car je n'étais plus seule le soir.

Pour finir, voici la petite photo gagnante du concours MN-Duck organisé par la société Macherey-Nagel !!!! Merci à Françoise, Laurence et Véro d'avoir participé à l'élaboration de la maquette !!!!



# **SOMMAIRE**

## **Présentation générale**

### **Partie 1 : Introduction**

#### **Chapitre 1 : Introduction générale**

I.	Le fer	4
II.	Les sidérophores	4
III.	Les autres métaux	5
IV.	La résistance aux métaux	7

#### **Chapitre 2 : Le transport du fer chez *Pseudomonas aeruginosa***

I.	L'organisme d'étude : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
II.	Les sidérophores utilisés par <i>P. aeruginosa</i>	12
	A. Les Pyoverdines	12
	B. La Pyoverdine produite par <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) : Pvd	13
	C. La pyochéline	14
	D. Les sidérophores exogènes utilisés par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	15
III.	La voie Pvd chez <i>P. aeruginosa</i>	17
	A. Biosynthèse et sécrétion de la Pvd	17
	B. Transport du fer par la voie Pvd	25
	C. La régulation de l'expression des gènes de la voie Pvd	33
IV.	La voie Pch chez <i>P. aeruginosa</i>	39
	A. Biosynthèse de la Pch	39
	B. Transport du fer par la Pch	40
	C. La régulation de l'expression des gènes de la voie Pch	41
V.	Le transport par les sidérophores exogènes	43
	A. L'entérobactine	43
	B. Le citrate	43
	C. La desferrioxamine	44
	D. Le desferrichrome	44
	E. La cépabactine	44

#### **Chapitre 3 : Le transport du fer chez *Escherichia coli***

I.	Le transport du fer via l'entérobactine	47
	A. Biosynthèse et sécrétion de l'entérobactine	47
	B. Transport du complexe entérobactine-fer dans la cellule bactérienne	49
II.	Le transport du fer via le ferrichrome	51
	A. Le transport à travers la membrane externe	51
	B. Le transport à travers la membrane interne et dissociation	52

## **Partie 2 : Résultats**

### **Chapitre 4 : Etude de l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la Pvd et l'efflux de complexe Pvd-Métaux (article 1 et 2)**

Article 1 : implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée.

I.	Introduction de l'article 1	56
II.	Discussion de l'article 1	57

Article 2 : Implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans le recyclage de complexe Pvd-Métaux

I.	Introduction de l'article 2	61
II.	Discussion de l'article 2	63

### **Chapitre 5 : Étude du mécanisme de transport du fer via la Pvd chez *P. aeruginosa* (Article 3 et résultats complémentaires)**

Étude de l'implication de la pompe à efflux dans le signal de FRET

I.	Introduction	69
II.	Résultats / Discussion	71

Étude du mécanisme de translocation du complexe Pvd-Fe à travers FpvA

I.	Introduction	74
II.	Résultats / Discussion	76

### **Chapitre 6 : Etude de la voie d'acquisition du fer par le desferrichrome chez *P. aeruginosa* (article 3)**

I.	Introduction de l'article 3	85
II.	Discussion de l'article 3	86

### **Chapitre 7 : Etude de l'effet de l'arséniate sur le transport du fer par les sidérophores chez *P. aeruginosa* et *E. coli***

I.	Introduction	90
II.	Résultats / Discussion	92

## **Partie 3 : Conclusions et perspectives**

## **Partie 4 : Matériels et méthodes**

### **Chapitre 7 : Techniques utilisées pendant cette thèse**

I.	Purification de la Pvd	107
II.	Propriétés spectrales des sidérophores utilisés	107
III.	Techniques de spectroscopie et de microscopie de fluorescence	111
IV.	Transport du fer et bioaccumulation de métaux	110
V.	Construction de mutants ponctuels	117

### **Annexes**



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<b>Figure 1 :</b> Groupements fonctionnels utilisés par les sidérophores pour chélater le fer	5
<b>Figure 2 :</b> Représentation du transport et des mécanismes de résistance au nickel, au cuivre, au zinc, à l'arséniate, au cadmium et au mercure	8
<b>Figure 3 :</b> <i>P. aeruginosa</i> observée au microscope électronique	11
<b>Figure 4 :</b> Structure des pyoverdines constituant les différents groupes	13
<b>Figure 5 :</b> Structure de la Pvd produite par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	14
<b>Figure 6 :</b> Structure des deux diastéréoisomère de la Pch produits par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	15
<b>Figure 7 :</b> Sidérophores exogènes utilisés par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	16
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique du locus Pvd	17
<b>Figure 9 :</b> Fonctionnement des NRPS	18
<b>Figure 10 :</b> Synthèse de la Pvd	20
<b>Figure 11 :</b> Maturation du chromophore	20
<b>Figure 12 :</b> Structure aux rayons X de la protéine PvdQ	21
<b>Figure 13 :</b> Structure aux rayons X de MacB	24
<b>Figure 14 :</b> Structure aux rayons X de MacA	24
<b>Figure 15 :</b> Structure aux rayons X de OprM	24
<b>Figure 16 :</b> Mécanisme de sécrétion de l'entérotoxine chez <i>E. coli</i>	25
<b>Figure 17 :</b> Structure aux rayons X du récepteur FpvA en interaction ou non avec son sidérophore	27
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique de la structure primaire du récepteur FpvA	27
<b>Figure 19 :</b> Représentation compacte de la structure du récepteur FpvA vue du dessus	31
<b>Figure 20 :</b> Devenir du complexe Pvd-Fe dans le périplasme	32
<b>Figure 21 :</b> Visualisation par microscopie de fluorescence de l'accumulation périplasmique de la Pvd	33
<b>Figure 22 :</b> Structure aux rayons X de la protéine Fur	34
<b>Figure 23 :</b> Régulation du système Pvd	37
<b>Figure 24 :</b> La voie pvd chez <i>P. aeruginosa</i>	38
<b>Figure 25 :</b> Représentation schématique du locus comprenant les gènes impliqués dans la voie Pch	39
<b>Figure 26 :</b> Synthèse de l'acide salicylique par PchA et PchB	40

<b>Figure 27 :</b> Structure aux rayons X du récepteur FptA-Pch-Fe	41
<b>Figure 28 :</b> Structure de la pyochéline en complexe avec le fer dans la structure cristalline de FptA	41
<b>Figure 29 :</b> La voie Pch chez <i>P. aeruginosa</i>	42
<b>Figure 30 :</b> Voies de transport du fer par les sidérophores exogènes utilisés par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	45
<b>Figure 31 :</b> Structure de l'entérobactine	48
<b>Figure 32 :</b> La biosynthèse de l'entérobactine	48
<b>Figure 33 :</b> La voie entérobactine chez <i>E. coli</i>	50
<b>Figure 34 :</b> Structure aux rayons X de FhuA	52
<b>Figure 35 :</b> Structure aux rayons X de la protéine FhuD	53
<b>Figure 36 :</b> La voie desferrichrome chez <i>E. coli</i>	53
<b>Figure 37 :</b> Structure du précurseur PvdQ	59
<b>Figure 38 :</b> Visualisation par FRET des interaction FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe lors du transport du fer par la Pvd	70
<b>Figure 39 :</b> Suivi du transport du complexe Pvd-Fe par FRET dans des mutants de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ	72
<b>Figure 40 :</b> Localisation des différentes mutations sur le bouchon de FpvA	76
<b>Figure 41 :</b> Incorporation de <sup>55</sup> Fe pas les différentes souches	77
<b>Figure 42 :</b> Suivi du transport du complexe Pvd-Fe par FRET	78
<b>Figure 43 :</b> Suivi de la dissociation du complexe Pvd-Fe dans les différents mutants	80
<b>Figure 44 :</b> Schéma récapitulatif du mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe à travers le récepteur FpvA	82
<b>Figure 45 :</b> Dosage de la quantité d'ATP présente dans les cellules	92
<b>Figure 46 :</b> Incorporation de <sup>55</sup> Fe chez <i>E. coli</i>	94
<b>Figure 47 :</b> Incorporation de <sup>55</sup> Fe chez <i>P. aeruginosa</i> par les sidérophores exogènes	95
<b>Figure 48 :</b> Incorporation de <sup>55</sup> Fe chez <i>P. aeruginosa</i> par les sidérophores endogènes	95
<b>Figure 49 :</b> Effet de l'arséniate sur le signal de FRET	96
<b>Figure 50 :</b> Effet de l'arséniate sur la dissociation et le recyclage de la Pvd	97
<b>Figure 51 :</b> Caractéristiques spectrales de la Pvd	108
<b>Figure 52 :</b> Spectre d'émission de fluorescence des différents complexes de Pvd-Métaux	109
<b>Figure 53 :</b> Spectre d'émission de fluorescence de complexes Pch-Métaux	109
<b>Figure 54 :</b> Caractéristiques spectrales du composé RL1194	110



<b>Figure 55 :</b> Méthode utilisée pour la construction des mutants	118
<b>Tableau 1 :</b> Métaux essentiels pour certaines fonctions biologiques	6
<b>Tableau 2 :</b> Familles de protéines importantes pour le transport et l'efflux des métaux	6
<b>Tableau 3 :</b> Quantification relative de la Pvd et de ses précurseurs présents dans le surnageant de culture de différents mutant de PAO1	59
<b>Tableau 4 :</b> Toxicité de l'arséniate sur la souche PAO1	92
<b>Tableau 5 :</b> Souches utilisées pendant cette thèse	112
<b>Tableau 6 :</b> Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée	120
<b>Tableau 7 :</b> Oligonucléotides utilisés pour le séquençage	120
<b>Tableau 8 :</b> Plasmides utilisés et obtenus lors de cette étude	121



## ABRÉVIATIONS

aa	: Acides aminés
ABC	: ATP Binding Cassette
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
AHL	: N-Acyl Homosérine Lactone
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adénosine TriPhosphate
CCCP	: Carbonyl Cyanide 3-ChloroPhenylhydrazone
CDF	: Cation Diffusion Facilitator
CFP	: Cyan Fluorescent Protein
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DHB	: 2,3-dihydrobenzoïque
DHBS	: 2,3-dihydroxy- <i>N</i> -benzoyl- <i>L</i> -serine
DIP	: 2,2Dipyridyl
DIC	: Differential Inteference Contrast
dNTP	: DésoxyriboNucléotide TriPhosphate
DTT	: Dithiothreitol
DO	: Densité Optique
ECF	: ExtraCytoplasmic Function
EDTA	: Acide Éthylène Diamine Tétra Acétique
FRET	: Fluorescence Résonance Energy Transfert
FUR	: Ferric Uptake Regulator
ICP-AES	: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectra
IS	: Iron Starvation
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MFS	: Major Facilitator Superfamily
MIC	: Minimal Inhibition Concentration
MIT	: Metal Inorganic Transport
NRPS	: Non Ribosomal Peptide Synthetase
PCR	: Polymérase Chain Reaction
Pvd	: Pyoverdine

Pch : Pyochéline  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
RND : Resistance Nodulation cell Division  
Trp : Tryptophane  
ZUR : Zinc Uptake Regulator

Le fer est un élément essentiel à la croissance de tout organisme vivant, car il intervient dans de nombreux processus biologiques tels que le métabolisme de l'oxygène, le transfert d'électrons ou encore la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Malgré sa forte abondance sur terre (4<sup>ème</sup> élément de la croûte terrestre), le fer présente une faible biodisponibilité à pH physiologique. En présence d'oxygène, il précipite sous forme d'hydroxydes de fer très peu solubles. De ce fait, la concentration en fer libre, biodisponible, dans l'environnement est de l'ordre de  $10^{-9}$  M. Une concentration bien trop faible pour la croissance bactérienne qui nécessite des concentrations de l'ordre du micromolaire. Durant une infection, ce problème est encore accentué. En effet, chez l'hôte, le fer est séquestré par des molécules chélatrices comme la ferritine, la transferrine ou encore les hèmes et la concentration de fer libre est estimée de l'ordre de  $10^{-18}$  M. Pour contourner cette faible biodisponibilité du fer, les bactéries Gram-négatives ont développé différentes stratégies pour croître en milieu carencé en fer. L'une d'elle consiste en l'acquisition du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) présent en conditions anoxiques ou acides. Une autre stratégie consiste à récupérer directement le fer de l'hème, de la transferrine ou l'hémoglobine de l'hôte, durant une infection, en exprimant à la surface de la cellule bactérienne des récepteurs spécifiques de ces molécules. Enfin, une dernière stratégie, et qui a fait l'objet de cette thèse, consiste à synthétiser et sécréter de petites molécules chélatrices de poids moléculaire de 200 à 2000 Da, appelé sidérophores. Ces sidérophores sont caractérisés par une très forte affinité pour le fer, pouvant aller jusqu'à  $10^{42}$  M<sup>-1</sup> dans le cas de l'entérobactine, un sidérophore produit par *E. coli*. Grâce à leur forte affinité pour le fer, les sidérophores sont capables de solubiliser le fer et de le transporter vers le cytoplasme des bactéries. Dans la rhizosphère, la concentration de sidérophores est estimée entre le micromolaire et le milimolaire et actuellement plus de 500 sidérophores de structure différentes ont été répertoriés. Lors d'une infection, les sidérophores produit par le pathogène sont considérés comme des facteurs de virulence et vont subtiliser le fer des molécules de stockage ou de transport du fer de l'hôte. Après chélation du fer par le sidérophore, le complexe ferrique est transporté à travers la paroi bactérienne via des transporteurs spécifiques.

Au laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement à l'acquisition du fer par les sidérophores chez *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram-négatif, pathogène opportuniste. Elle est responsable de 10 à 20 % des infections nosocomiales et d'infections pulmonaires graves chez les malades atteints de la mucoviscidose. En condition de carence en fer, cette bactérie synthétise et sécrète deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline (Pch). En plus de ces deux sidérophores endogènes, *P. aeruginosa* est également

capable d'utiliser des sidérophores exogènes produits par d'autres micro—organismes présents dans leur environnement.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à l'acquisition du fer par les sidérophores Pvd et ferrichrome chez *P. aeruginosa*. Le ferrichrome est un sidérophore produit par *Ustilago sphaerogena* et non par *P. aeruginosa*, mais pouvant être utilisé par cette dernière. Cette voie a été largement étudiée chez *E. coli* et quasiment rien n'était connu des protéines impliquées dans cette voie chez *P. aeruginosa*. Notre objectif était de comparer les similitudes et les différences mécanistiques pour l'acquisition du fer par ce sidérophore chez ces deux micro-organismes. J'ai ainsi identifié différentes protéines impliquées dans cette voie chez *P. aeruginosa*. Concernant la voie Pvd, j'ai identifié la pompe à efflux PvdRT-OpmQ impliquée dans la sécrétion de la Pvd vers le milieu extracellulaire. Je me suis ensuite intéressée à l'implication de cette pompe dans les mécanismes de résistance aux métaux chez *P. aeruginosa*. En effet, de plus en plus de données du laboratoire indiquent que les sidérophores seraient produit par les micro-organismes non seulement pour acquérir le fer mais également pour lutter contre la toxicité de métaux autres que le fer. Enfin, en parallèle de cette étude de la pompe PvdRT-OpmQ, j'ai développé et utilisé des outils de fluorescence pour étudier le mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe par le récepteur de membrane externe FpvA.

Ce manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première est une synthèse bibliographique décrivant les métaux et leurs interactions avec les micro-organismes (chapitre 1), l'acquisition du fer chez *P. aeruginosa* (chapitre 2) et chez *E. coli* (chapitre 3). La seconde partie de ce manuscrit décrit les résultats obtenus durant cette thèse : les données concernant la voie Pvd sont rassemblées dans les chapitres 4 et 5 et ceux concernant la voie ferrichrome dans le chapitre 6. Une étude de l'effet de l'arséniate sur les différentes voies d'acquisition du fer par les sidérophores chez *P. aeruginosa* et *E. coli* sera présenté dans le chapitre 7. Les différentes techniques utilisées durant cette thèse sont décrites dans un dernier chapitre.

**Chapitre 1 :**  
**Les métaux et les micro-organismes**





## I. Le fer

Le fer est le 4<sup>ème</sup> élément le plus important de la croûte terrestre (4,7% en masse) après l'oxygène (49,5%), le silicium (25,8%) et l'aluminium (7,8%). Dans l'environnement, le fer est présent essentiellement sous forme d'hydroxydes de fer ou sous forme d'alliages peu biodisponibles.

Le fer est un élément essentiel pour la croissance de la majorité des organismes vivant, à l'exception de certains *Lactobacilli* (Imbert and Blondeau, 1998), des agents de la maladie de Lyme : *Borrelia burgdorferi* (Posey and Gherardini, 2000), et de la syphilis : *Treponema pallidum* (Posey et al., 1999). Il intervient en tant que co-facteur dans de nombreux processus métaboliques comme la synthèse des acides nucléiques (Dougherty and Downs, 2006), la photosynthèse (Okamura et al., 1975), la phosphorylation oxydative (Schafer et al., 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou le transfert d'électron (Andrews et al., 2003; Wandersman and Delepelaire, 2004). Le fer est essentiel à la vie mais paradoxalement, ce métal est très peu biodisponible. Il est retrouvé majoritairement sous deux formes :  $Fe^{2+}$  qui est la forme ferreuse et  $Fe^{3+}$  qui est la forme oxydée ferrique plus stable que le fer ferreux. En effet, le  $Fe^{3+}$  précipite en présence d'oxygène et à pH physiologique et la concentration de fer libre est estimée à environ  $10^{-9}$  M (Ratledge and Dover, 2000). Dans l'hôte, cette concentration est de l'ordre de  $10^{-18}$  M, alors que les micro-organismes nécessitent une concentration de  $10^{-6}$  M pour une croissance optimale (Bullen, 1981). Afin de surmonter cette faible biodisponibilité du fer, les micro-organismes aérobies ont mis en place plusieurs stratégies. La plus répandue consiste à produire et à sécréter des molécules de faibles poids moléculaire (<2500 Da) appelées sidérophores.

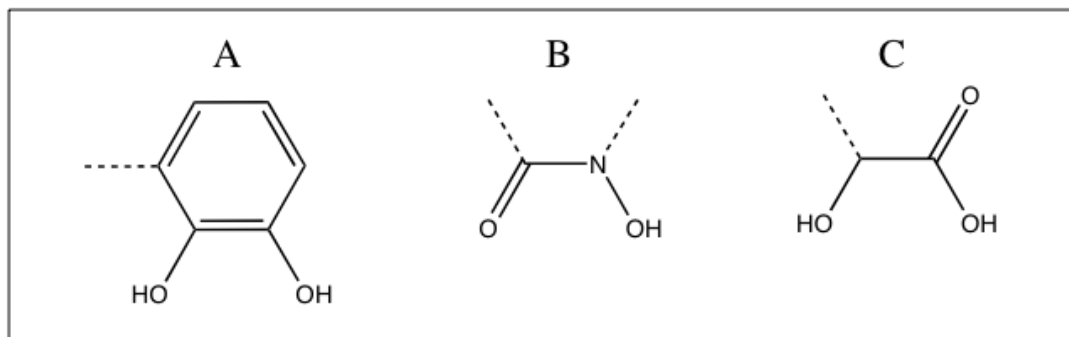
## II. Les sidérophores

Les sidérophores sont des chélateurs spécifiques du fer synthétisés par les bactéries et les champignons en milieu aérobie et en conditions de carence en fer. Leur rôle est de solubiliser le fer afin de le rendre accessible à la cellule bactérienne. Ces molécules ont un poids moléculaire compris entre 200 à 2000 Da et sont caractérisées par une forte affinité pour le fer ferrique ( $10^{42}$  M<sup>-1</sup> dans le cas de l'entérobactine). Actuellement, plus de 500 sidérophores ont été caractérisés chimiquement (Boukhalfa and Crumbliss, 2002) et ont été

classés en trois grandes familles selon les groupements fonctionnels utilisés pour chélater le fer : les hydroxamates, les  $\alpha$ -hydroxycarboxyliques et les phénols/catéchols (Faraldo-Gomez and Sansom, 2003) (Figure 1). Cependant, certains sidérophores ne peuvent être classés dans aucune de ces trois familles, du fait de leur structure complexe et de l'implication de plusieurs groupements différents dans la chélation du fer.

Les bactéries sont capables d'utiliser leur propre sidérophore (sidérophore endogène) mais également ceux synthétisés par d'autres micro-organismes et présents dans l'environnement (sidérophore exogène). *E. coli* peut, par exemple utiliser en plus de l'entérobactine (sidérophore endogène), le ferrichrome produit par le champignon *Ustilago sphaerogena*.

Les sidérophores, en plus d'être de bons agents chélateurs du fer, participent à la virulence des bactéries pathogènes (Ratledge and Dover, 2000). En effet, de par leur forte affinité pour le fer, les sidérophores sont capables de récupérer le fer de l'hôte, tel que le fer lié à la lactoferrine et à la transferrine et de permettre ainsi la croissance bactérienne (Sriyosachati and Cox, 1986). Chez le phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*, il a été montré qu'un mutant déficient dans la production des deux sidérophores endogènes est très affecté dans sa pathogénécité (Expert et al., 1996).



**Figure 1 : Groupements fonctionnels utilisés par les sidérophores pour chélater le fer**  
A : Phénol/catéchol ; B : Hydroxamate ; C :  $\alpha$ -hydroxycarboxylique

### III. Les autres métaux

Certains métaux tels que le cadmium, l'étain ou le mercure sont toxiques pour les bactéries, alors que d'autres sont requis à l'état de trace pour le métabolisme comme le zinc, le cobalt, le nickel ou le cuivre (Nies, 1992). En tout, 13 métaux sont considérés comme essentiels à la vie (Tableau 1). Ces métaux sont des co-facteurs de différents processus enzymatiques (Tableau 1) et sont principalement présents dans des protéines appelées

métalloprotéines ou métallo enzymes. Cependant si ces métaux sont présents en quantité trop importante, ils deviennent toxiques pour la bactérie. Ceci explique l'existence de systèmes de régulation de l'homéostasie des métaux très complexes et de systèmes de résistance aux métaux. Le système de régulation de la quantité en fer qui est effectué par la protéine Fur est le plus connu (Bagg and Neilands, 1987; Hantke, 2001) mais d'autres protéines équivalentes à Fur existent pour d'autres métaux tels que Zur pour  $Zn^{2+}$  (Patzner and Hantke, 1998) ou TroR pour  $Mn^{2+}$  (Posey et al., 1999).

Ces métaux, plus solubles que le fer, pénètrent dans la bactérie par les porines au niveau de la membrane externe puis sont transportés activement dans la cellule par des transporteurs ATP dépendant, des ATPase de type A ou P ou encore par des MIT (Metal Inorganic Transport) (Paulsen et al, 1998 ; Nies, 1999) (Tableau 2).

Métaux	Activité biologique
$Ca^{2+}$	Structure, porteur de charge, messenger
$Co^{2+}$	Oxydase, transfert de groupement alkyle
$Cr^{2+}/Cr^{3+}$	Inconnue
$Cu^{2+}$	Oxydase, transport de l'oxygène, dismutase, transfert d'électron, réductase, oxygénase
$K^{+}$	Balance osmotique, porteur de charge
$Mg^{2+}$	Structure, hydrolase, isomérase
$Mn^{2+}$	Oxydase, réductase, structure, photosynthèse
$Mo^{6+}$	Oxydase, nitrogénase
$Na^{+}$	Balance osmotique, porteur de charge
$Ni^{2+}$	Hydrogénase, hydrolase
$V^{5+}$	Oxydase, nitrogénase
$Zn^{2+}$	Structure, hydrolase

**Tableau 1 : Métaux essentiels pour certaines fonctions biologiques**

Le fer n'est pas représenté car discuté précédemment.

Famille de transporteur	Type de transport	Énergie	Ions métalliques transportés
ABC	Transport Efflux	ATP ATP	$Mn^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Zn^{2+}$ -
ATPase Type P	Transport et Efflux	ATP	$Ag^{+}$ , $Ca^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $K^{+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Zn^{2+}$
ATPase Type A	Efflux	ATP	Arsénite
RND	Efflux	Gradient de proton	$Ag^{+}$ , $Cd^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$
HoxN	Transport	Chimiosmotique	$Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$
MIT (CorA)	Transport	Chimiosmotique	la plupart des cations
CDF (CzcD...)	Efflux	Chimiosmotique	$Cd^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Zn^{2+}$

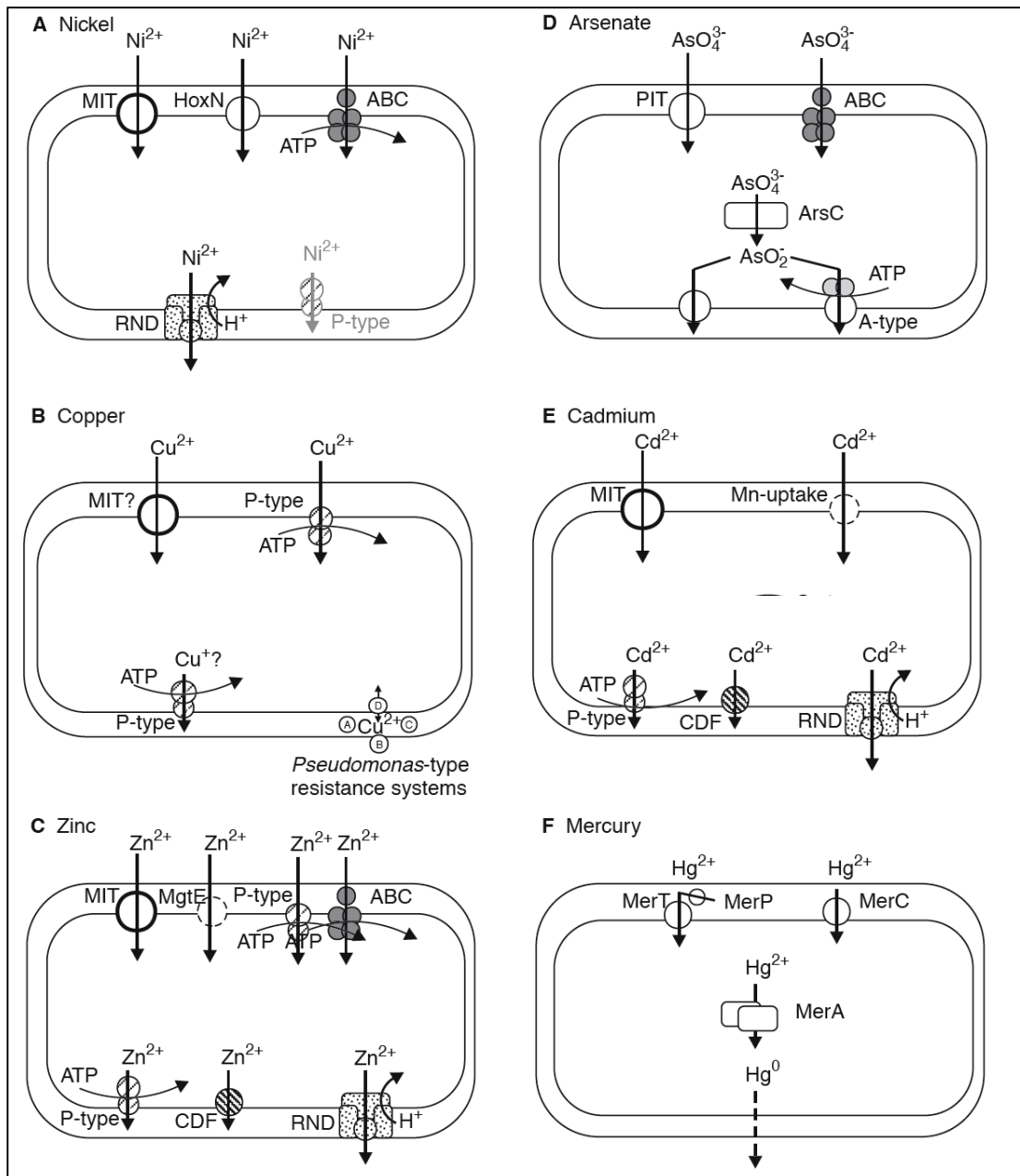
**Tableau 2 : Familles de protéines importantes pour le transport et l'efflux des métaux (adapté de Nies, 1999)**

Les familles de transporteurs et d'exporteurs sont diverses et variées. Pour un même ion, il existe différents transporteurs ou systèmes d'efflux selon les micro-organismes.

## IV. La résistance aux métaux

Les bactéries ont aussi mis en place différentes stratégies de résistance face à de fortes concentrations de métaux toxiques (Bruins et al., 2000), telles que l'exclusion par perméabilité de membrane, l'efflux actif du métal, la séquestration intracellulaire du métal par des protéines, la détoxification enzymatique du métal sous forme moins toxique ou encore la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux. La plupart de ces mécanismes de résistance sont portés sur des plasmides et souvent associés aux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Harnett and Gyles, 1984; Nakahara et al., 1977).

Le mécanisme de résistance le plus utilisé est l'efflux des métaux de la bactérie vers le milieu extracellulaire (Nies, 1999; Rosen, 1999) (Tableau 2). Dans certains cas, cet export est précédé d'une réduction du métal sous une forme moins toxique. Ceci est le cas de l'arséniate et du mercure (Figure 2D et F). L'arséniate est réduit en arsénite par ArsC dans la cellule. L'arsénite est ensuite transporté vers le milieu extracellulaire par ArsB et ArsA (Figure 2D) (Patel et al., 2007). Le mercure  $Hg^{2+}$  est réduit par MerA sous forme de  $Hg^0$  qui est volatile et qui diffuse à travers les membranes vers le milieu extracellulaire. Dans le cas de  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ , l'efflux de ces métaux s'effectue sans aucune modification du métal. Cet efflux est effectué par des ATPases de type P dans le cas des bactéries à Gram positif et par des pompes à efflux de type RND dans les bactéries à Gram négatif (Figure 2A-B-C-E) (Nies, 1999). Les ATPases de type P transportent les ions contre leur gradient à l'aide de l'énergie fournie par l'ATP. Ces transporteurs sont constitués d'une seule protéine enchâssée dans la membrane cytoplasmique. Les pompes à efflux de type RND sont des pompes constituées de 3 partenaires : une protéine de membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire au transport, une protéine de membrane externe et une protéine périplasmique permettant la jonction entre les deux protéines membranaires. Ce type de pompe à efflux fonctionne grâce à l'énergie de la force proton motrice. Les pompes à efflux RND sont le plus souvent impliquées dans des mécanismes de résistance aux antibiotiques comme AcrAB-TolC chez *E. coli* (Perez et al., 2007). L'ion  $Cu^{2+}$  est exporté chez *P. aeruginosa* par un mécanisme impliquant 4 protéines (ABCD dans la figure 2B) séquestrant le cuivre dans le périplasme au niveau de la membrane externe (Cooksey, 1994).



**Figure 2 : Représentation du transport et des mécanismes de résistance au nickel, au cuivre, au zinc, à l'arséniate, au cadmium et au mercure (d'après Nies, 1999)**

A :  $\text{Ni}^{2+}$  est transporté de manière aspécifique par un transporteur MIT ( $\text{CorA-Mg}^{2+}$ ) et de manière spécifique par HoxN et un transporteur ABC. L'efflux de  $\text{Ni}^{2+}$  se fait par une pompe à efflux RND et chez *Helicobacter pylori* par probablement une ATPase de type P. B :  $\text{Cu}^{2+}$  est transporté par une ATPase de type P et probablement par un transporteur de type MIT ( $\text{CorA-Mg}^{2+}$ ). L'efflux de  $\text{Cu}^{2+}$  se fait lui aussi par une ATPase de type P et chez *Pseudomonas* par un système de 4 protéines séquestrant le  $\text{Cu}^{2+}$  dans le périplasma proche de la membrane externe. C :  $\text{Zn}^{2+}$  peut être accumulé par l'intermédiaire de 4 transporteurs différents : deux aspécifiques (MIT ( $\text{CorA-Mg}^{2+}$ ) et MgtE) et deux spécifiques (ATPase de type P et transporteur ABC). L'efflux du  $\text{Zn}^{2+}$  est effectué par une ATPase de type P, un transporteur de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) ou une pompe à efflux RND tel que Czc. D : L'arséniate est accumulé par le système Pit (Phosphate inorganic transport) ou un transporteur ABC. Dans la cellule, l'arséniate est réduit en arsénite par ArsC. L'arsénite est ensuite efflué vers l'extérieur de la cellule par ArsB seul ou en complexe avec ArsA (ATPase de type A). E :  $\text{CorA-Mg}^{2+}$  (MIT) ou le transporteur du  $\text{Mn}^{2+}$  sont responsables de l'accumulation de  $\text{Cd}^{2+}$  dans la cellule. L'efflux du  $\text{Cd}^{2+}$  est effectué par des ATPases de type P chez les bactéries à Gram positif et par une pompe à efflux RND ou un transporteur CDF chez les bactéries à Gram négatif. F : Dans le cas du mercure, le mécanisme de résistance conduit à l'expression des protéines de transport. MerT interagit avec une protéine périplasmique liant le mercure, MerP. Le transport par MerC peut s'ajouter ou substituer le mécanisme de transport de MerT. Dans la cellule  $\text{Hg}^{2+}$  est réduit en  $\text{Hg}^0$  qui diffuse à l'extérieur de la cellule.

Au sein de l'équipe, il a été montré que les sidérophores jouent également un rôle dans la résistance aux métaux chez *P. aeruginosa*. La présence de sidérophores dans l'environnement de la bactérie réduit l'accumulation de métaux dans les bactéries par diminution de la diffusion des métaux à travers les porines présentes dans les membranes externes bactériennes. En effet, la plupart des sidérophores sont capables de chélater d'autres métaux que le fer. La desferrioxamine B (sidérophore produit par *Streptomyces*) par exemple, forme des complexes avec  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{In}^{3+}$  avec des constantes d'association comprises entre  $10^{20}$  et  $10^{28} \text{ M}^{-1}$  (Evers et al., 1989). La pyoverdine (sidérophore produit par *P. aeruginosa*) possède quant à elle des affinités comprises entre  $10^{17}$  et  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  pour  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  (Braud et al., 2009b; Chen et al., 1994). Cette capacité à chélater d'autres métaux permet à la bactérie de se préserver de la diffusion passive de métaux et d'augmenter sa résistance. En effet, la présence de pyoverdine et de pyochéline (sidérophores endogènes produit par *P. aeruginosa*) réduit l'accumulation de métaux autre que le fer dans la bactérie et de ce fait la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de ces métaux. Des mutants incapables de produire de la pyoverdine et de la pyochéline présentent une sensibilité plus importante aux métaux qu'une souche sauvage (Braud et al., 2010). De plus, il a été montré au laboratoire que certains métaux étaient capables d'induire l'expression du sidérophore pyoverdine (Braud et al., 2009b).

**Chapitre 2 :**  
**Le transport du fer par les sidérophores chez**  
***Pseudomonas aeruginosa***

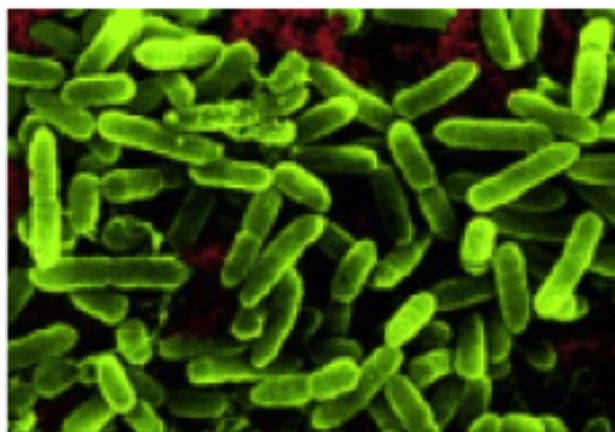




## I. L'organisme d'étude : *Pseudomonas aeruginosa*

Dans le laboratoire, l'organisme modèle est *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). *P. aeruginosa* est un bâtonnet à Gram négatif, pathogène opportuniste (Figure 3). Cette bactérie est aérobic stricte et mobile grâce à un flagelle polaire. Elle peut être retrouvée sous forme planctonique ou de biofilm. *P. aeruginosa* est responsable de 10% à 20% des infections nosocomiales et provoque des infections létales chez les patients atteints de mucoviscidose. Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grand génome bactérien avec 6,3 millions de paires de bases. En comparaison, l'organisme modèle *E. coli* ne comporte que 4,6 millions de paires de bases (Blattner et al., 1997). Le taux de G-C se chiffre à environ 66% dans le génome de *P. aeruginosa*. Ce pourcentage est relativement élevé car en effet, le rapport en G-C chez les procaryotes varie entre 25 % et 70 %. En 2000, le séquençage complet du génome de la souche *P. aeruginosa* PAO1 par Stover et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence la grande capacité métabolique de cette souche (Stover et al., 2000).

Lors d'une infection, *P. aeruginosa* produit de nombreux facteurs de virulence comme l'exotoxine A, des protéases, des cytotoxines... (Pitt, 1986). Les sidérophores qu'elle produit sont aussi considérés comme étant des facteurs de virulence. En effet, du fait de leur forte affinité pour le fer, ils sont capables d'entrer en compétition pour ce métal avec la transferrine et la lactoferrine de l'hôte. De plus, l'un des facteurs sigma (PvdS) régulant l'expression des gènes impliqués dans le système d'acquisition du fer via la Pvd régule aussi l'expression de l'exotoxine A (Lamont et al., 2002).



**Figure 3** : *P. aeruginosa* observée au microscope électronique (Image © James A. Sullivan)  
La taille des bactéries est de 0,5 x 2 à 3 µm.

## II. Les sidérophores utilisés par *P. aeruginosa*

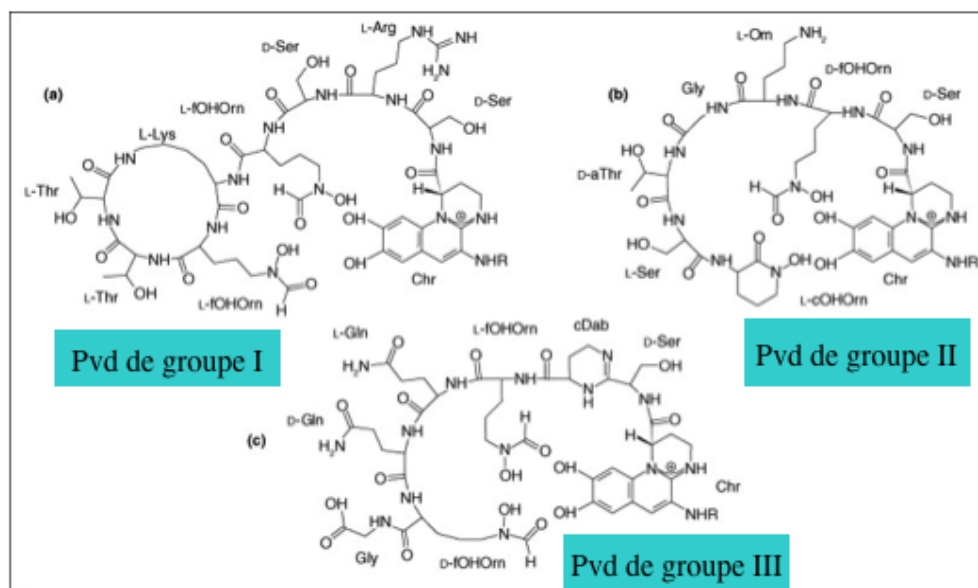
Pour subvenir à ses besoins en fer, *P. aeruginosa* synthétise et sécrète deux sidérophores, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline (Pch). La Pvd est le sidérophore majeur produit par cette bactérie et se caractérise par une très forte affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ) (Abdallah and Pattus, 2000; Albrecht-Gary et al., 1994). La Pch est un sidérophore produit en plus faible quantité et qui présente une plus faible affinité pour le fer ( $10^{18} \text{ M}^{-1}$ ) (Brandel et al. In preparation).

Lors de l'infection, ces deux sidérophores peuvent agir comme des facteurs de virulence chez l'hôte grâce à leur capacité à récupérer le fer de la transferrine et de la lactoferrine (Lamont et al., 2009). En effet, des mutants incapables de produire la Pvd et la Pch ne sont plus virulents dans des modèles murins (Takase et al., 2000a). De plus, la Pvd, en interagissant avec son récepteur spécifique FpvA au niveau de la membrane externe bactérienne, permet l'induction de l'expression de facteurs de virulence tels que l'endoprotéase PrpL et l'exotoxine A. Ces enzymes sécrétés dans le milieu extracellulaire, sont capables de lyser d'autres micro-organismes présents dans l'entourage de la bactérie ou les cellules de l'hôte durant une infection. Cette lyse cellulaire constitue ensuite une source de fer pour *P. aeruginosa* (Lamont et al., 2002).

### A. Les pyoverdines

Les pyoverdines forment une famille importante de sidérophores produit par tous les Pseudomonads fluorescents. Actuellement, environ 60 pyoverdines différentes ont été identifiées (Meyer et al., 2008). Elles sont caractérisées par un chromophore dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline qui est responsable de la fluorescence de la molécule (Meyer, 2000). En position C3 du chromophore (Figure 4) est fixée une chaîne latérale (acide dicarboxylique ou son amide correspondant) et sur la fonction carboxyle en position C1 est fixée une chaîne peptidique (Budzikiewicz, 1997). La composition et la longueur de cette chaîne est dépendante de chaque souche. Elle contient des acides aminés particuliers tel que l'hydroxyornithine et peut être linéaire ou partiellement cyclisée. Actuellement, dans le cas de *P. aeruginosa*, 4 groupes de pyoverdines ont été identifiés : PvdI (correspondant à Pvd dans ce manuscrit), PvdII, PvdIII (Figure 4) et PvdIV (Ruangviriyachai et al., 2001). PvdIV diffère du type III par l'absence de la L-Gln dans le peptide. À chacune de ces pyoverdines est associé un récepteur spécifique permettant le transport à travers la membrane externe. Ces

récepteurs sont nommés FpvAI (FpvA dans la suite du manuscrit), FpvAII et FpvAIII, respectivement (Cornelis et al., 1989). Concernant PvdIV, le récepteur impliqué dans le transport n'a pas encore été identifié. Cependant, il a été montré qu'une reconnaissance croisée pouvait avoir lieu quelques fois entre récepteurs et pyoverdines. C'est le cas par exemple du récepteur FpvAIII qui est capable de transporter la PvdII (Ghysels et al., 2004). C'est la composition de la chaîne peptidique qui est responsable de la reconnaissance des pyoverdines par les récepteurs situés à la surface des bactéries. À ce jour, seul le système Pvd/FpvA présent chez *P. aeruginosa* PAO1 a été étudié au niveau moléculaire. Peu d'informations sont présentes dans la littérature concernant les voies impliquant PvdII, PvdIII et PvdIV.



**Figure 4 : Structures des pyoverdines produites par les souches de *P. aeruginosa***

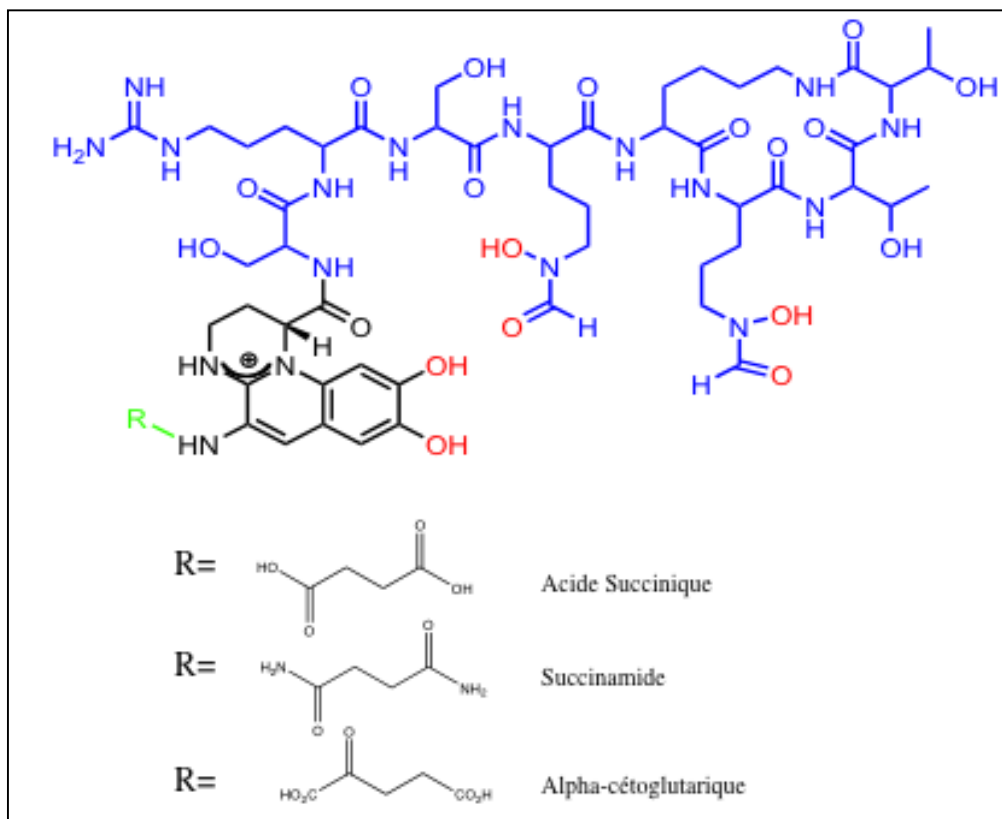
Toutes ces pyoverdines possèdent le même chromophore et varient en structure par la chaîne peptidique. La pyoverdine de type I est synthétisée par *P. aeruginosa* ATCC 15692 (appelée PAO1), la pyoverdine de type II par *P. aeruginosa* ATCC 27853 et la pyoverdine de type III par Pa6. R représente la chaîne latérale pouvant varier selon le type de pyoverdine (d'après Visca et al., 2007).

## B. La pyoverdine produite par *P. aeruginosa* (PAO1) : Pvd

La Pvd est constituée d'un chromophore lié à un octa-peptide partiellement cyclisé (Ser-Arg-Ser-FoHOHorn-c(Lys-FoHOHorn-Thr-Thr))(Briskot et al., 1986) et à une chaîne variable (acide succinique, succinamide ou  $\alpha$ -cétoglutarique (Figure 5)) constituant les 3 isoformes. La forme qui est produite majoritairement est la forme succinique avec une masse de 1333 Da. La chélation du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) fait intervenir les deux groupements hydroxamates des hydroxyornitines et le catéchol du chromophore (Figure 5). La chélation se

fait donc avec une stoechiométrie Pvd:Fe de 1:1 avec une affinité d'environ  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary et al., 1994).

La pyoverdine, en plus de sa capacité à chélater du fer, peut aussi chélater efficacement d'autres métaux dit de transition (cofacteur enzymatique essentiel) comme le cuivre, le magnésium, le nickel, le zinc ou des métaux toxiques comme le chrome, le mercure ou l'argent (Braud et al., 2009b). La seule structure connue de Pvd en complexe avec un métal est celle de Pvd-gallium qui a été résolue par RMN (Wasielewski et al., 2008).



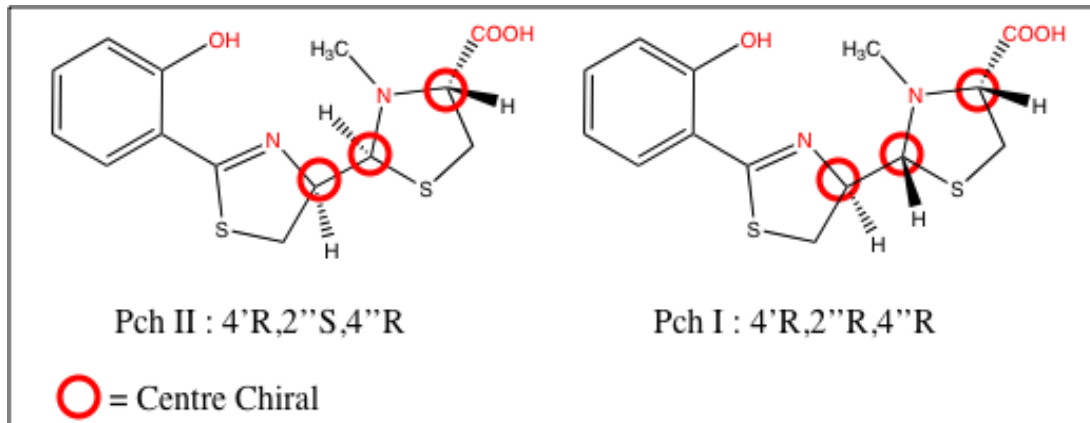
**Figure 5 : Structure de la Pvd produite par *P. aeruginosa* PAO1**

La Pvd de *P. aeruginosa* PAO1 est composée d'un chromophore ici en noir, d'une chaîne peptidique de 8 acides aminés représentée en bleu et d'une chaîne latérale représentée en vert. Les atomes impliqués dans la liaison du fer sont représentés en rouge. En haut est représentée la Pvd et en bas les différentes chaînes latérales R possible.

### C. La pyochéline

La pyochéline (Pch) est un sidérophore dérivé de la thiazolidine [2(2-o-hydroxyphenyl-2-thiazolin-4yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid] (Cox et al., 1981). Cette molécule résulte de la condensation du salicylate et de deux résidus cystéines. La Pch a une affinité de  $10^{18} \text{ M}^{-1}$  pour le fer ferrique et chélate le fer avec une stoechiométrie de 2:1 ( $\text{Pch}_2:\text{Fe}^{3+}$ ) (Brandel et al. In preparation; Cox and Graham, 1979; Tseng et al., 2006). La Pch possède 3 centres chiraux respectivement en position C4', C2'' et C4'' et *P. aeruginosa* produit deux diastéréoisomères (Pch I : 4'R,2''R,4''R et Pch II : 4'R,2''S,4''R) (Figure 6).

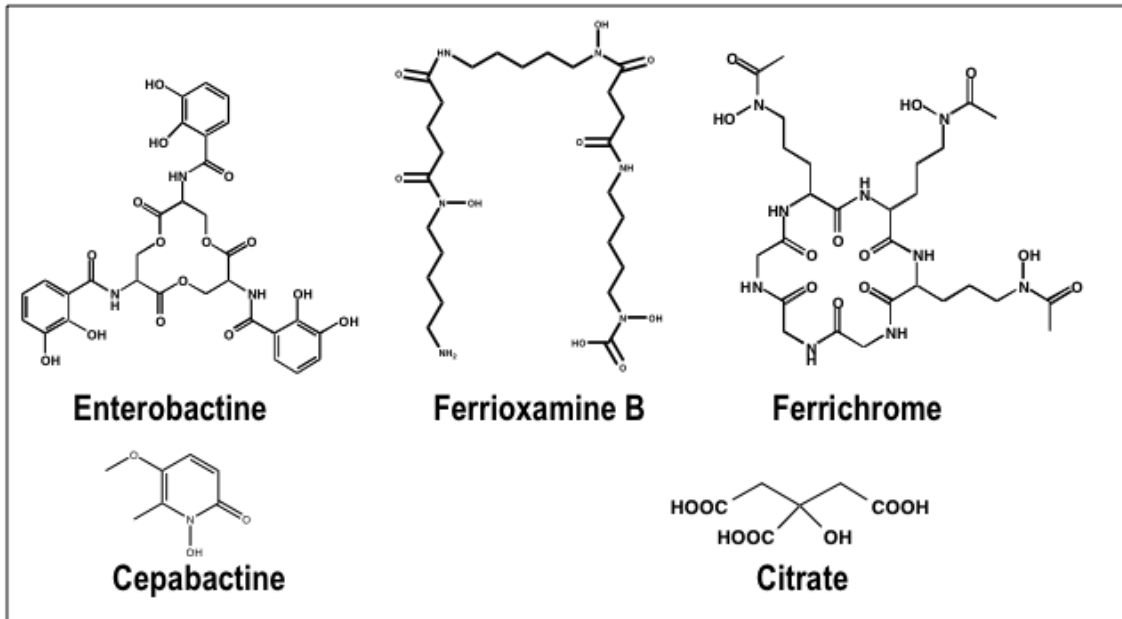
La Pch, comme la Pvd, est capable de chélater d'autres métaux que le fer. Certains métaux ont cependant une action plus importante sur la croissance bactérienne et la régulation des gènes du système Pch. C'est le cas par exemple du molybdène et du cobalt (Visca et al., 1992). Récemment, le laboratoire a montré qu'en plus de ces métaux, la Pch est capable de chélater de nombreux métaux tels que par exemple : le cuivre, le magnésium, le nickel, le zinc qui sont des métaux dit de transition ou le chrome, le mercure ou l'argent qui sont des métaux toxiques (Braud et al., 2009a).



**Figure 6 :** Structures des deux diastéréoisomères de la Pch produits par *P. aeruginosa* PAO1  
 Les atomes en rouges sont ceux qui interviennent dans la liaison avec le fer (d'après Ankenbauer et al., 1988; Youard et al., 2007).

#### D. Les sidérophores exogènes utilisés par *P. aeruginosa* PAO1

En plus de la Pvd et de la Pch, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser de nombreux sidérophores exogènes produits par d'autres micro-organismes (bactéries ou champignons) (Poole and McKay, 2003; Cornelis and Matthijs, 2002)(Figure 7), comme l'entérobactine produite par *Escherichia coli*, le desferrichrome produit par *Ustilago sphaerogena*, la desferrioxamine B produite par *Streptomyces*, la cépabactine produite par *Burkholderia cepacia* ou le citrate, une molécule issue de la voie métabolique.



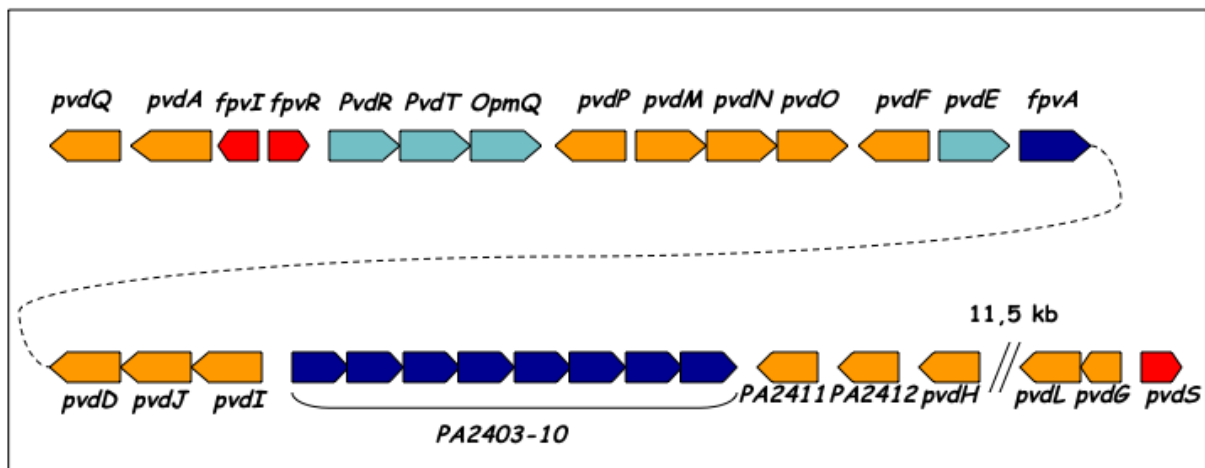
**Figure 7 : Sidérophores exogènes utilisés par *P. aeruginosa* PAO1**

L'entérobactine et la cépabactine sont des sidérophores bactériens. La ferrioxamine B et le ferrichrome sont des sidérophores fongiques. Le citrate quant à lui est un intermédiaire du cycle de Krebs.

### III. La voie Pvd chez *P. aeruginosa*

#### A. Biosynthèse et sécrétion de la Pvd

L'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse de la Pvd est localisé sur le « locus Pvd » (Figure 8). Comme la plupart des sidérophores, la Pvd est synthétisée par un système impliquant des peptides synthétases non ribosomiques (appelée NRPS pour Non Ribosomal Peptide Synthetase). Ce type de biosynthèse par les NRPS est aussi observé pour la synthèse d'antibiotiques. Dans le cas de la Pvd, cette biosynthèse permet l'incorporation d'acides aminés particuliers dans la chaîne peptidique ne pouvant pas être incorporés par la synthèse effectuée par les ribosomes. C'est le cas par exemple de la D-Ser et de la N<sup>5</sup>-formyl-N<sup>5</sup>-hydroxyornithine (fOHOrn).



**Figure 8 : Représentation schématique du locus Pvd**

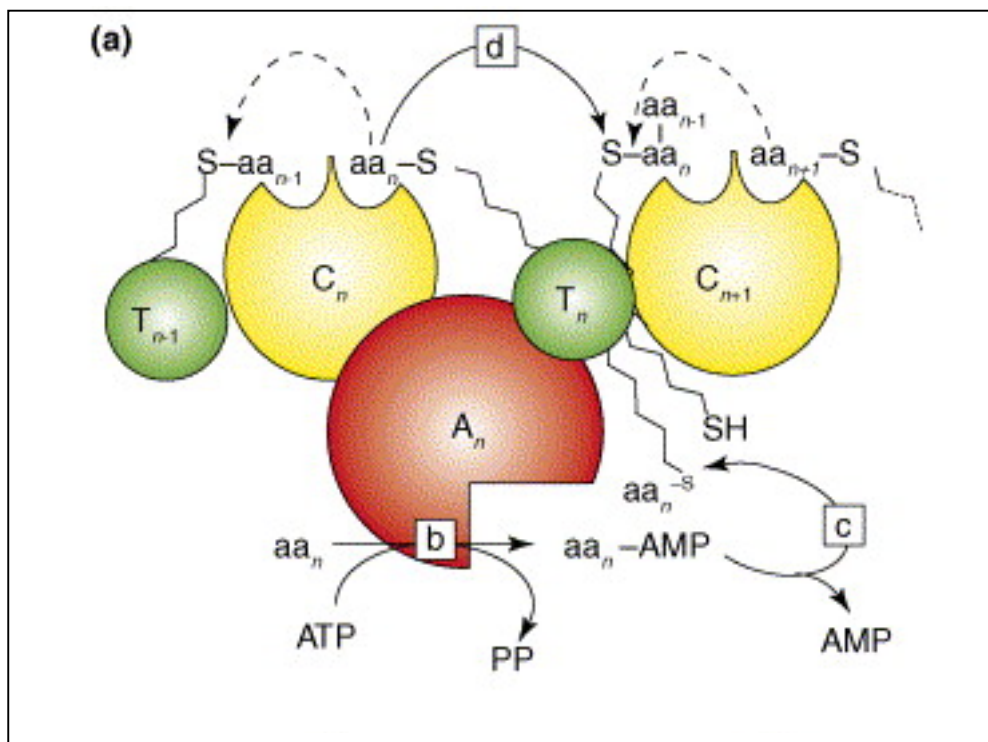
Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la Pvd sont colorés en orange. En bleu ciel, sont représentés les gènes impliqués dans la sécrétion de la Pvd et en bleu foncé ceux impliqués dans l'acquisition du Fe par la Pvd. Les gènes en rouge sont impliqués dans la régulation du système.

#### 1. Les NRPS

Les NRPS sont des enzymes de taille relativement importante et formées de plusieurs modules (Figure 9) :

- Un domaine (A) responsable de la reconnaissance et de l'activation (adénylation) de l'acide aminé substrat.
- Un domaine de thiolation (T) auquel est fixé un cofacteur, la phosphopantéthéine.
- Un domaine de condensation (C) catalysant la formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés par attaque nucléophile.

Au niveau du domaine A, l'acide aminé  $aa_n$  est adénylé par l'intermédiaire d'une réaction de déphosphorylation de l'adénosine triphosphate (ATP). Le produit formé subit ensuite une thiolation, au niveau du domaine T, afin d'être fixé à la phosphopantéthéine ce qui provoque la libération de l'adénosine monophosphate. La fixation à la phosphopantéthéine permet d'amener l'acide aminé au domaine C. Ce domaine catalyse la formation de la liaison peptidique entre le groupement carboxyle du groupement peptidique naissant et l'acide aminé porté par le module. Le peptide est synthétisé de la partie N vers la partie C terminale. Les modules peuvent également posséder des domaines accessoires d'épimérisation ou de méthylation des acides aminés. Le dernier module possède une thioestérase qui hydrolyse la liaison thioester entre le peptide assemblé et la phosphopantéthéine. Cette réaction peut être couplée à une cyclisation du peptide.



**Figure 9 : Fonctionnement des NRPS (d'après Visca et al., 2007)**

b : Adénylation de l'acide aminé

c : Thiolation de l'acide aminé par l'intermédiaire de la phosphopantéthéine

d : Formation de la liaison peptidique

## 2. La synthèse de la partie peptidique de la Pvd

La biosynthèse de la Pvd débute dans le cytoplasme et implique la formation d'un précurseur non fluorescent appelé ferribactine. La ferribactine diffère de la Pvd par la présence du tripeptide L-Glu-D-Tyr-L-Dab qui constitue le précurseur du chromophore (Hohlneicher et al., 2001). La synthèse non ribosomique du peptide de la ferribactine est



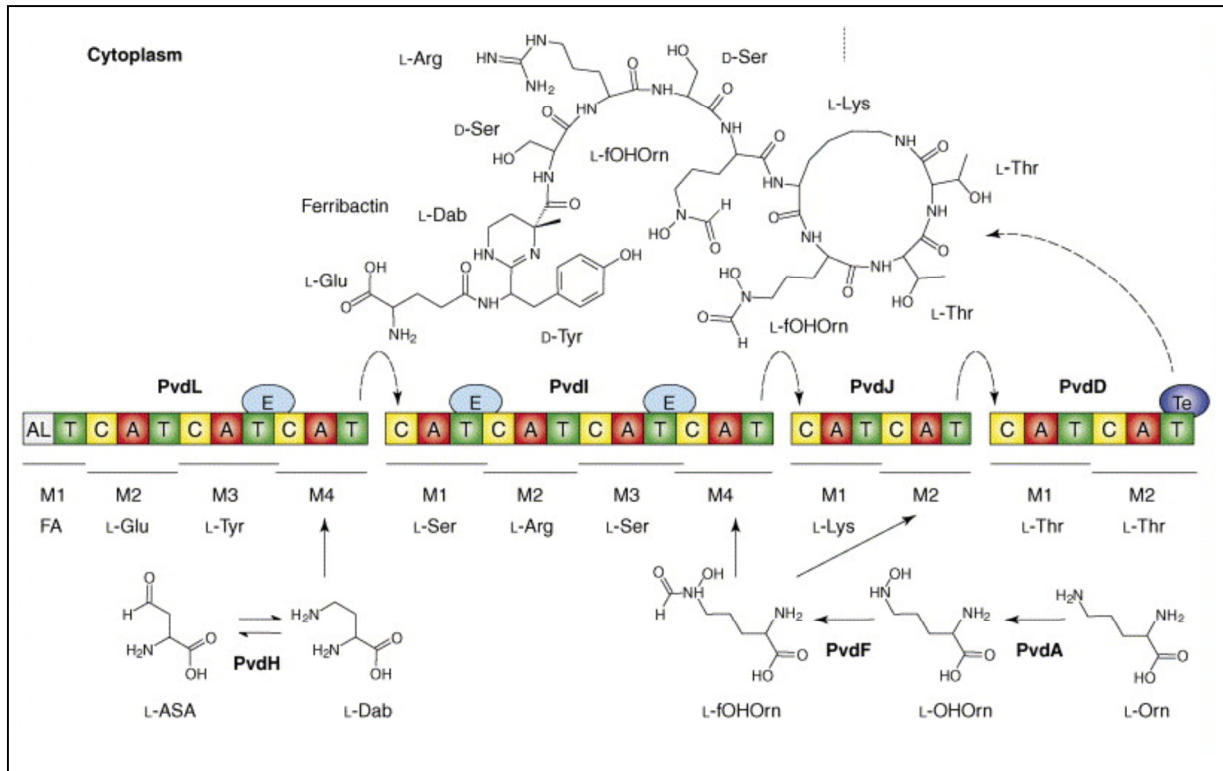
effectuée par l'intermédiaire des gènes *pvdL* et *pvdIJD* codants pour des NRPS (Ackerley et al., 2003; Lamont and Martin, 2003; Lehoux et al., 2000; Merriman et al., 1995; Mossialos et al., 2002; Ravel and Cornelis, 2003).

La synthèse débute par l'enzyme PvdL. Cette enzyme a la particularité de contenir un domaine similaire à l'acyl coenzyme A ligase (Als) dans son premier module (PvdL-M1) (Mossialos et al., 2002 ; Ravel and Cornelis, 2003). Ceci suggère que la biosynthèse de la Pvd débiterait par une acylation. De plus, le module PvdL-M1 est prédit comme étant le module de départ de la biosynthèse et permettrait le couplage du coenzyme A avec un acide gras grâce à l'énergie de l'ATP (Figure 10). Actuellement, toutes les structures de Pvd qui ont été déterminées ne contenaient aucun acide gras (Budzikiewicz, 2004) indiquant que cette chaîne grasse doit être hydrolysée à un certain stade avant la sécrétion du sidérophore. PvdL, en plus de son premier module, possède 3 modules additionnels, le 3<sup>ème</sup> module contenant un domaine d'épimérisation. Il y a de grandes chances que la biosynthèse du peptide de la Pvd débute par l'incorporation du L-Glu, du D-Tyr et du L-Dab (Figure 10).

Les enzymes PvdI et PvdJ prennent ensuite le relais. Elles possèdent chacune respectivement 4 et 2 modules. PvdI a en plus dans le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> module un domaine d'épimérisation probablement impliqué dans l'épimérisation des deux résidus L-Ser (Lehoux et al., 2000 ; Ravel and Cornelis, 2003). La synthèse de la chaîne peptidique de la Pvd se termine avec l'enzyme PvdD qui est la seule enzyme à posséder une fonction thioestérase (Ackerley et al., 2003).

Aux NRPS s'ajoutent d'autres enzymes auxiliaires catalysant des réactions intermédiaires (Figure 10) :

- PvdH catalyse la formation du L-2,4-diaminobutyrate qui est probablement requis pour la synthèse du chromophore à partir de l'aspartate  $\beta$ -semialdéhyde (Vandenende et al., 2004).
- PvdA, une ornithine hydrogénase, catalyse la formation de la  $N^5$ -hydroxyornithine (OHOrn) partir de l'ornithine (Orn) (Ge and Seah, 2006).
- PvdF, une hydroxyornithine-formylase, est couplée à PvdA pour former la  $N^5$ -formyl- $N^5$ -hydroxyornithine (fOHOrn) à partir de la OHOrn (McMorran et al., 2001).

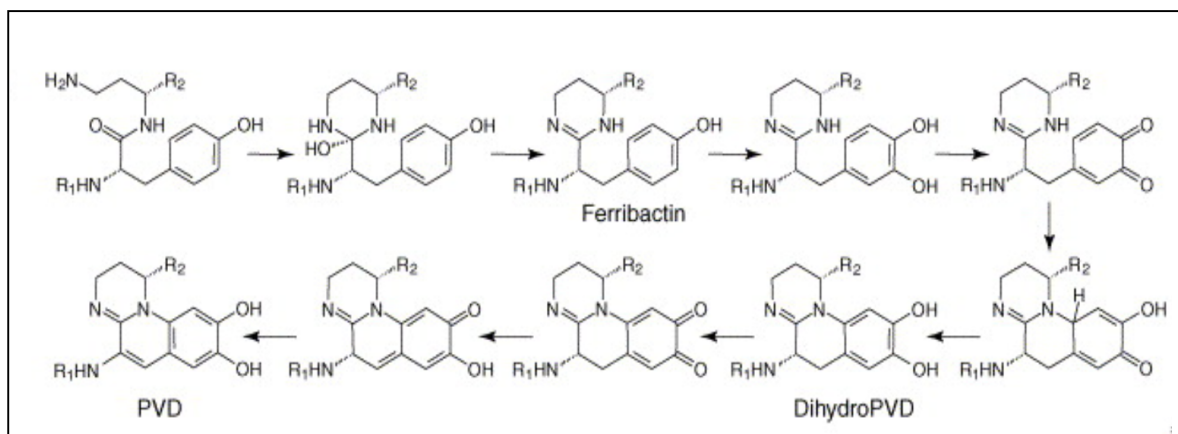


**Figure 10 : Synthèse de la Pvd (d'après Visca et al., 2007)**

Al : domaine ligase de l'acyl-CoA ; C : domaine de condensation ; A : domaine d'activation ; T : domaine de thiolation ; E : fonction d'épimérisation et Te : fonction thioestérase. Les acides aminés ajoutés par chaque module (M) sont indiqués en dessous.

### 3. Maturation de la ferribactine

La ferribactine possède un chromophore partiellement cyclisé et non fluorescent. La cyclisation du chromophore se déroule dans le périplasma après export de la ferribactine (Baysse et al., 2002; Visca et al., 2007)(Figure 11).



**Figure 11 : Maturation du chromophore (d'après Visca et al., 2007)**

Le chromophore de la ferribactine subit différentes étapes de maturation jusqu'à former le chromophore de la Pvd.

La ferribactine est exportée vers le périplasma par l'intermédiaire du transporteur ABC PvdE (McMorran et al., 1996; Yeterian et al., 2009). Dans le périplasma, la ferribactine passe par un intermédiaire, la dihydroPvd, une forme insaturée, non fluorescente de la Pvd. Ce précurseur a été retrouvé dans un surnageant de culture en plus de la Pvd (Jacques et al., 2003). La maturation du chromophore est ensuite effectuée par les enzymes PvdN, PvdO, PvdP et PvdQ (Ravel and Cornelis, 2003; Voulhoux et al., 2006; Yeterian et al., 2009). Le rôle précis de chacune de ces enzymes dans la biosynthèse de la Pvd n'est toujours pas connu. Il a clairement été montré que PvdN est localisé dans le périplasma (Voulhoux et al., 2006) et a de fortes homologies de séquence avec les aminotransférases de classe V. Pour PvdO, P et Q, la présence d'une séquence signal au niveau du gène indique que leur localisation cellulaire dans la bactérie serait le périplasma. PvdQ a été identifiée comme étant une acylase 3-oxo-C12-homosérine lactone et sa structure résolue (Bokhove et al., 2010)(Figure 12). L'enzyme PvdQ possède une structure hétérodimérique typique  $\alpha/\beta$ . Son site de liaison très profond lui permet de reconnaître et de cliver les longues chaînes grasses des *N*-acyl homosérine lactone (AHLs). Les AHLs sont des molécules impliquées dans le quorum-sensing. Le quorum-sensing est un moyen de communication entre les bactéries. PvdQ est donc une enzyme ayant des propriétés de quorum-quenching. Elle peut être utilisée afin de supprimer le quorum-sensing des organismes pathogènes.



**Figure 12** : Structure aux rayons X de la protéine PvdQ (Bokhove et al., 2010) .

PvdQ a une structure hétérodimérique  $\alpha/\beta$  typique similaire aux acylases de la pénicilline G. Cette enzyme possède un site de liaison très large, idéal pour reconnaître les longues chaînes d'acides gras (C12) des AHLs.

#### 4. Sécrétion de la Pvd

Les protéines et les mécanismes impliqués dans la sécrétion de la Pvd vers le milieu extracellulaire n'étaient pas connus lorsque j'ai démarré cette thèse et ont d'ailleurs été l'une des questions abordées.

Pour la plupart des sidérophores, seuls les transporteurs impliqués dans l'export à travers la membrane interne ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grandes familles de pompes d'export : les ATP-Binding Cassette transporteurs (ABC transporteur)(Seeger and van Veen, 2009) et les Major Facilitator Superfamily transporteurs (MFS transporteur)(Fluman and Bibi, 2009). Concernant les ABC transporteurs, PchI est impliqué dans l'export à travers la membrane interne de la Pch chez *P. aeruginosa* (Reimann et al., 2001), ExiT et IrtA sont responsables de l'export de sidérophores produit par *Mycobacterium smegmatis* (Farhana et al., 2008; Zhu et al., 1998). Pour les exporteurs de la famille MFS, on trouve EntS qui est impliqué dans l'export de l'entérobactine chez *E. coli* (Furrer et al., 2002) ou AlcS responsable de l'export de l'alcaligine chez *Bordetella pertussis* (Brickman and Armstrong, 2005).

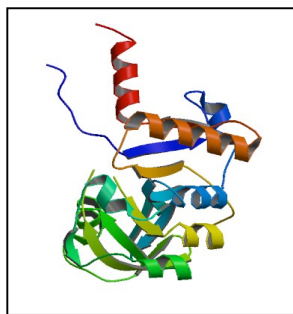
Le seul transporteur impliqué dans l'export à travers la membrane externe identifié est celui impliqué dans la sécrétion de l'entérobactine. La sécrétion de ce sidérophore est effectuée par EntS (Furrer et al., 2002) située au niveau de la membrane interne puis par TolC qui est située au niveau de la membrane externe (Bleuel et al., 2005).

Concernant la Pvd chez *P. aeruginosa*, il existe au niveau du locus Pvd un opéron constitué des gènes PA2389-90-91 (*pvdR-pvdT-opmQ*) codant pour des protéines ayant toutes les caractéristiques des pompes à efflux (Winsor et al., 2009). Cet opéron possède, comme la plupart des gènes situés sur le locus Pvd, une boîte IS (Iron Starvation)(Ravel and Cornelis, 2003), ce qui implique que ces protéines ne sont exprimées que dans des conditions de carence en fer. PvdT a 43% d'identité de séquence (63% de similarité) avec la protéine MacB et comme MacB, les prédictions de structure secondaire indiquent qu'elle serait constituée de 4 hélices transmembranaires (Lewenza et al., 2005). MacB est un transporteur ABC et requiert la protéine de fusion membranaire MacA et la protéine de membrane externe TolC afin de sécréter les substrats dans le milieu extracellulaire. MacB possède un domaine cytoplasmique et un large domaine périplasmique qui a été cristallisé (Xu et al., 2009) (Figure 13). Le domaine cytoplasmique de MacB contient les motifs Walker A et B, le peptide linker, le motif D, et enfin le motif Q loops qui sont caractéristiques des transporteurs ABC (Davidson and Chen, 2004). PvdR a 34% d'identité de séquence avec MacA dont la structure a été résolue (Yum et al., 2009) (Figure 14). MacA est la protéine de fusion membranaire

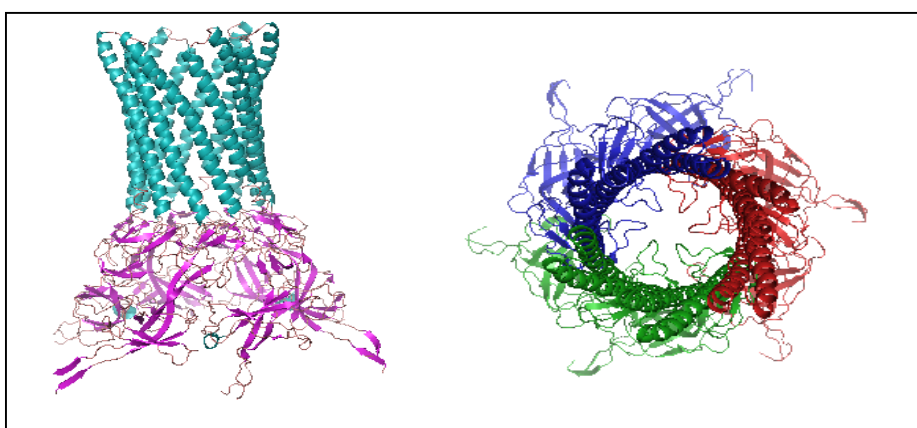
permettant la liaison entre TolC et MacB. Enfin, OpmQ est prédite comme possédant un tonneau  $\beta$  de type porine, localisé dans la membrane externe et possédant une large extension périplasmique. OpmQ possède 49% de similarité avec OprM, une protéine de membrane externe impliquée dans un système d'efflux bien caractérisé chez *P. aeruginosa*, le système MexAB-OprM (Akama et al., 2004)(Figure 15). Ce système permet l'efflux d'antibiotiques et xénobiotiques dans le milieu extracellulaire.

Le complexe MacAB-TolC est responsable de l'efflux dans le milieu extracellulaire des antibiotiques de la famille des macrolides et de l'entérotoxine II d'*E. coli*. L'entérotoxine II, toxine peptidique produit par *E. coli*, est transportée du cytoplasme vers le périplasme par la machinerie Sec (Figure 16)(Yamanaka et al., 2008). Elle est ensuite sécrétée vers le milieu extracellulaire par la machinerie MacAB-TolC (Figure 16). Le transporteur ABC MacB fournit l'énergie permettant l'efflux de l'entérotoxine II par l'hydrolyse l'ATP en ADP. Les différentes homologues de séquence entre *pvdRTopmQ* avec des pompes à efflux de type MacAB, conduisent à l'hypothèse que PvdRT-OpmQ pourrait être impliquée dans la sécrétion de la Pvd. La pompe à efflux PvdRT-OpmQ pourrait fonctionner selon le même schéma et prendre en charge la Pvd dans le périplasme afin de l'excréter dans le milieu extracellulaire. Mais des mutations de la pompe PvdRT-OpmQ n'affectent pas la sécrétion de la Pvd (Poole et al., 1993a). De ce fait, il a longtemps été suggéré qu'OprM était impliquée dans la sécrétion de la Pvd car son expression était augmentée en conditions de carence en fer (Poole et al., 1993b). De même, comme un mutant *mexA-mexB-oprM* présente une forte diminution de croissance en présence de 2,2'-dipyridyl (DIP) qui est un chélateur du fer (Poole et al., 1993b), il a été proposé que cette pompe soit impliquée dans la sécrétion de la Pvd chez *P. aeruginosa*. Par contre, aucun défaut de production de Pvd n'est observé dans ce mutant, ce qui est en contradiction avec l'implication de cette pompe dans la sécrétion de la Pvd.

Mais, il a récemment été démontré par notre groupe que cette pompe était impliquée dans la réexcrétion de la Pvd du périplasme vers le milieu extracellulaire, après dissociation du complexe Pvd-fer dans le périplasme (Yeterian et al., 2010). Concernant la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée, rien n'était clairement connue des protéines impliquées lorsque j'ai démarré ma thèse.

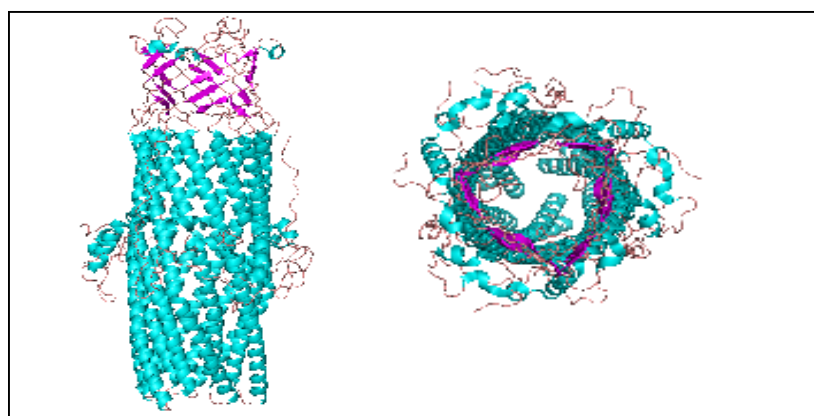


**Figure 13 : Structure aux rayons X de MacB (d'après Xu et al., 2009)**  
 Sur cette figure est représenté un monomère de la protéine MacB.



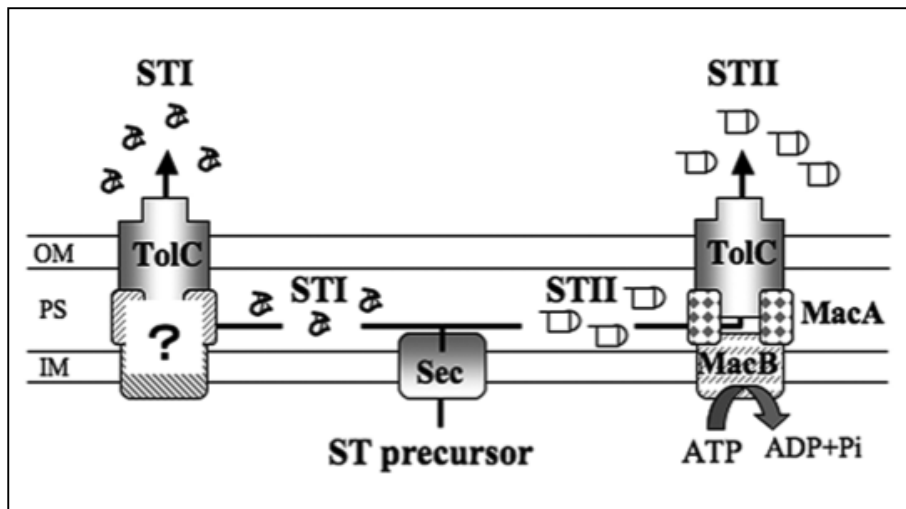
**Figure 14 : Structure aux rayons X de MacA (d'après Yum et al., 2009)**  
 À gauche : vue transversale. À droite : vu du dessus.

La structure de MacA présente un arrangement de protomères sous forme hexamérique. Les hélices  $\alpha$  forment un canal de 70Å de long et de 35Å de large. Le canal formé permet de connecter MacB qui est ancrée dans la membrane interne et TolC qui est ancrée dans la membrane externe.



**Figure 15 : Structure aux rayons X de OprM (d'après Akama et al., 2004)**

OprM est formé par 3 monomères. Chaque monomère est constitué de quatre brins  $\beta$  et huit hélices  $\alpha$ . Les brins  $\beta$  constituent le pore du canal qui est ancré dans la membrane externe tandis que les hélices  $\alpha$  forment le canal situé dans le périplasma et interagissent avec MexA.



**Figure 16 : Mécanisme de sécrétion de l'entérotoxine chez *E. coli* (d'après Yamanaka et al., 2008)**

Le précurseur de l'entérotoxine I et II est sécrété dans le périplasme par la machinerie Sec. Le mécanisme d'export de l'entérotoxine I (STI) n'a pas encore été identifié à ce jour. Par contre, l'entérotoxine II (STII) est sécrétée par la pompe à efflux MacAB-TolC du périplasme vers le milieu extracellulaire.

## B. Le transport du fer par la voie Pvd

Le système d'acquisition du fer impliquant la Pvd a surtout été étudié chez l'organisme modèle *P. aeruginosa* PAO1.

Après sécrétion dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer avec une forte affinité et le transporte vers le cytoplasme de la bactérie avec l'aide de transporteurs membranaires spécifiques.

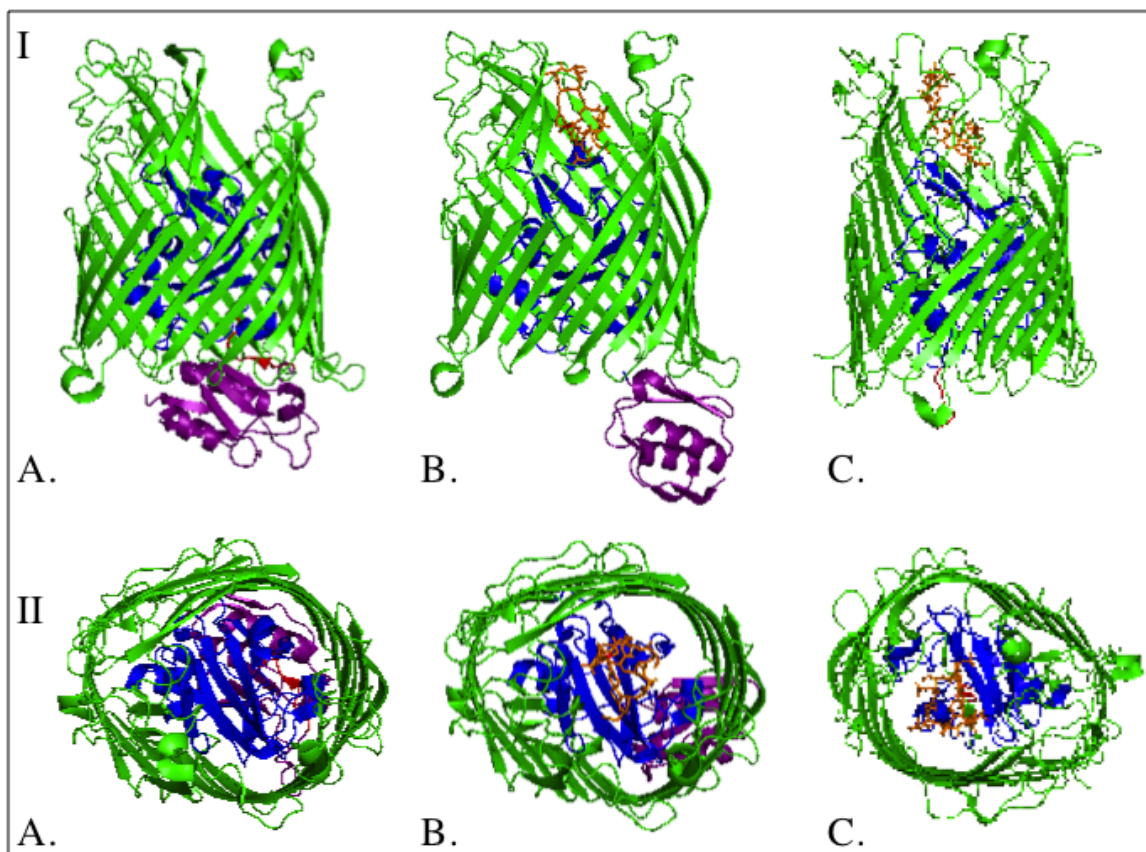
### 1. Le transport du complexe Pvd-Fe à travers la membrane externe

Le transport du complexe Pvd-Fe du milieu extracellulaire vers le périplasme bactérien à travers la membrane externe est assuré en majorité par FpvA, un récepteur TonB dépendant ancré dans la membrane externe. Comme dans le cas du ferrichrome pour *E. coli*, un second récepteur présent au niveau de la membrane externe, appelé FpvB interviendrait lui aussi dans le transport du complexe Pvd-Fe du milieu extracellulaire vers le périplasme (Ghysels et al., 2004). Cependant, des études effectuées au laboratoire, ont montrée que le transport du complexe Pvd-Fe par FpvB serait moins efficace dans les conditions dans lesquelles nous travaillons.

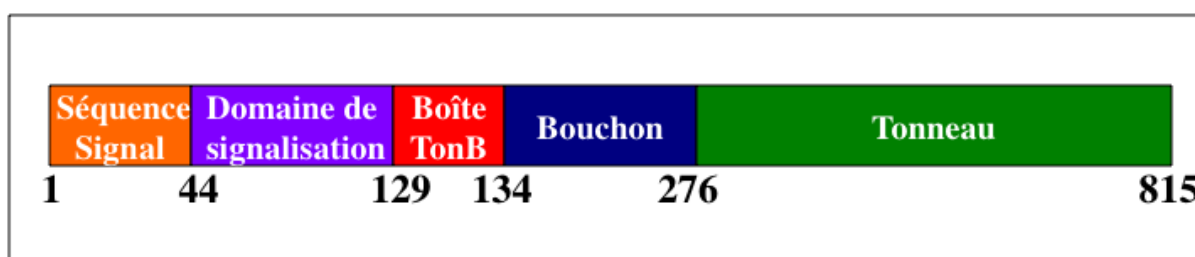
### **a. Structure du récepteur FpvA**

La structure de ce récepteur a été résolue en absence de sidérophore (Figure 17A), en présence de Pvd-Fe (Figure 17B) et en présence de Pvd libre (ApoPvd) (Figure 17C) (Brillet et al., 2007; Cobessi et al., 2005a; Wirth et al., 2007). Cette protéine, comme tous les récepteurs TonB dépendant, est constituée d'un tonneau  $\beta$  (acides aminés (aa) 276 à 815) formé de 22 brins  $\beta$  antiparallèles reliés entre eux par de grandes boucles extracellulaires et des coudes périplasmiques. La partie N-terminal de la protéine se replie pour former un domaine globulaire appelé bouchon, (aa 134 à 276) constitué de 4 feuillets  $\beta$ , qui va obturer le pore. Dans la partie N-terminal se trouve le domaine de signalisation (aa 44 à 129) (Figure 18) qui permet à FpvA de réguler sa propre expression par une interaction dans le périplasma avec le facteur anti-sigma FpvR. Ce domaine de signalisation formé de deux hélices  $\alpha$  entourées de deux feuillets  $\beta$  (Brillet et al., 2007 ; Wirth et al., 2007) n'est pas présent chez tous les récepteurs TonB dépendants. Il est présent uniquement chez les transporteurs impliqués dans des cascades de signalisation, comme par exemple FecA (le récepteur du ferricitrate)(Enz et al., 2000). Dans l'extension N-terminale, entre le bouchon et le domaine de signalisation, on trouve la « boîte TonB » (aa 129 à 134)(Figure 18) qui permet au récepteur d'interagir avec la protéine TonB du complexe TonB-ExbB-ExbD ancré dans la membrane interne. La « boîte TonB » n'est visible que dans la structure cristalline de FpvA sans sidérophore (Figure 17A) ( Brillet et al., 2007). Le site de liaison de la Pvd est localisé du côté extracellulaire et est composé essentiellement de résidus hydrophobes appartenant, au tonneau et au bouchon.





**Figure 17 : Structures aux rayons X du récepteur FpvA en interaction ou non avec son sidérophore**  
 A : FpvA ; B : FpvA-Pvd-Fe ; C :FpvA-Pvd (Brillet et al., 2007; Cobessi et al., 2005a; Wirth et al., 2007).  
 I : Structure de FpvA orientée parallèlement à la membrane externe. Le tonneau est représenté en vert, le bouchon en bleu, le domaine de signalisation en mauve et la boîte TonB en rouge.  
 II : Vue du dessus des récepteurs à partir du milieu extracellulaire.



**Figure 18 : Représentation schématique de la structure primaire du récepteur FpvA**  
 Les codes couleurs utilisés sont identiques à la figure 17.

### b. Liaison du sidérophore au récepteur FpvA

Le site de liaison de Pvd-Fe sur FpvA est localisé dans le pore du tonneau du côté extracellulaire et est toujours spécifique pour un sidérophore donné. Ce site de liaison ne reconnaît que la Pvd de PAO1, de DSM50106, de ATCC13525 et de Pfl 18.1 parmi les 60 pyoverdines répertoriées (Greenwald et al., 2009). Les PvdII et PvdIII sont faiblement voir pas du tout reconnues par le récepteur (Greenwald et al., 2009). L'interaction entre FpvA et le

complexe Pvd-Fe fait intervenir une affinité de 0,5 nM et est énergie indépendante. Des résidus du tonneau  $\beta$ , des boucles extracellulaires et du bouchon constituent le site de liaison. La liaison de Pvd-Fe au récepteur FpvA s'effectue en deux étapes : il y a tout d'abord fixation du complexe au site de liaison avec une cinétique rapide ( $K_{on}=7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Clement et al., 2004) puis un changement de conformation du récepteur. Les structures aux rayons X de FpvA en complexe avec différentes pyoverdines ont montré un changement de conformation de la boucle L7 (Greenwald et al., 2009). En présence de ferrisidérophore, cette boucle bouge pour amener les résidus Trp 599 et Tyr 600 vers le sidérophore. Des études de mutagénèse ont montré l'implication des boucles L4, L7 et L9 dans le transport du complexe Pvd-Fe (Nader et al., 2007). Des changements de conformation des boucles extracellulaires, et plus particulièrement des boucles L7 et L8, en présence de ferrisidérophore, ont été observés également pour d'autres transporteurs, comme FecA et FptA.

Lorsque le récepteur FpvA est purifié à partir d'une souche productrice de Pvd, le récepteur copurifie avec une molécule fluorescente qui a été tout d'abord identifiée comme étant de l'apoPvd (Schalk et al., 1999). De récentes études suggèrent que cette molécule fluorescente serait plutôt de la Pvd en complexe avec différents métaux autres que le fer (Braud et al., 2009b; Greenwald et al., 2008). En effet, la Pvd peut complexer de nombreux autres métaux que le fer mais avec des affinités moindres (Braud et al., 2009b). Selon le métal complexé, la fluorescence de la Pvd est modulée, en présence de fer elle est éteinte et en présence de Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Mn, Ni, Sn, Tb, Zn elle est augmentée (Braud et al., 2009b). Le récepteur FpvA peut également interagir avec la Pvd en complexe avec différents métaux autres que le fer (Braud et al., 2009b). Comme le milieu de culture carencé en fer utilisé contient de nombreux métaux contaminants, ces différents complexes Pvd-Métaux interagissent avec FpvA et copurifient avec le transporteur (Greenwald et al., 2008).

### **c. Le complexe TonB-ExbB-ExbD**

Le transport à travers la membrane externe des ferrisidérophores par les récepteurs TonB dépendants nécessite de l'énergie. Aucune source d'énergie n'étant présente dans le périplasme, les récepteurs de sidérophores localisés dans la membrane externe sont activés par le gradient de proton de la membrane interne via le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD. Le complexe a été identifié chez de nombreuses bactéries à Gram négatif. Les 3 protéines de ce complexe interagissent probablement avec une stoechiométrie de 2 TonB, 4 ExbB et 14 ExbD (Postle and Kadner, 2003; Sauter et al., 2003) et sont localisées dans la membrane

interne. TonB (239 résidus) est ancrée dans la membrane interne par son domaine N-terminal. ExbB est une protéine de membrane interne (241 résidus) comportant 3 segments transmembranaires (résidus 16-39 ; 128-155 ; 162-194), une courte boucle périplasmique et une longue boucle cytoplasmique qui sépare les deux premiers segments transmembranaires (Kampfenkel and Braun, 1993). ExbD (141 résidus) est également une protéine intégrale de membrane interne constituée de trois domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique (résidus 1-22), un segment transmembranaire (résidus 23-43) et un domaine C-terminale périplasmique (résidus 44-141) (Kampfenkel and Braun, 1992). Le mécanisme par lequel ce complexe transfère l'énergie de la force proton motrice au récepteur TonB dépendant est encore méconnu. Deux mécanismes ont été proposés. Dans le premier, TonB subirait un changement de conformation qui lui permettrait de s'étendre dans le périplasma et d'interagir avec le récepteur (Ferguson and Deisenhofer, 2004). Dans le second mécanisme appelé « navette », TonB se désassocierait de la membrane interne pour interagir avec le récepteur de sidérophore (Letain and Postle, 1997). Ce mécanisme est clairement moins probable car il implique une extraction de TonB de la membrane interne.

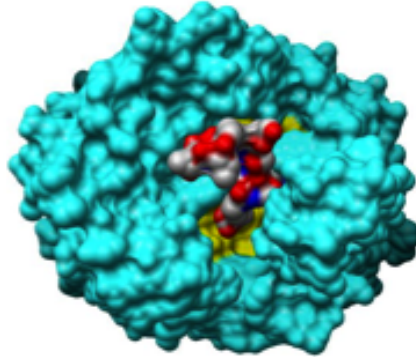
Chez *P. aeruginosa*, trois gènes codants pour des protéines TonB ont été identifiés : *tonB1*, *tonB2* et *tonB3*. TonB1 est la protéine qui interagit avec le récepteur FpvA car sa mutation affecte le transport du fer apporté en présence de Pvd et de Pch (Adams et al., 2006; Shirley and Lamont, 2009). TonB1 est quelque peu différente des autres protéines TonB car elle possède en son extrémité N-Terminale une extension d'environ 80 résidus nécessaire à son activité (Zhao and Poole, 2002). En général, on retrouve, à proximité du gène codant pour la protéine TonB, les gènes codants pour les protéines ExbB et ExbD. Dans le cas de *P. aeruginosa*, seul TonB2 a été identifiée comme interagissant avec deux homologues de ExbB et ExbD (Zhao and Poole, 2000). La protéine TonB3 intervient dans la motilité et l'assemblage des pilis extracellulaires (Huang et al., 2004).

#### **d. Transport du complexe Pvd-Fe à travers la membrane externe via FpvA**

Les structures de récepteurs de sidérophores montrent clairement l'absence de canal entre le tonneau et le bouchon (Figure 19). Pour qu'un complexe ferrisidérophore puisse être transporté, un changement de conformation important doit avoir lieu dans le récepteur permettant la formation d'un canal. Plusieurs théories ont été émises (Chakraborty et al., 2007). La première propose une sortie du bouchon du tonneau  $\beta$  vers le périplasma sous l'action de la protéine TonB. Dans ce cas, le canal formé aurait la taille du tonneau. En effet,

deux études effectuées l'une sur le récepteur FhuA du ferrichrome chez *E. coli* et la seconde par notre groupe sur FpvA de *P. aeruginosa*, montrent que l'expression du tonneau et du bouchon séparément dans une même souche conduit à l'expression d'un récepteur fonctionnel (gène codant pour le tonneau cloné au niveau du chromosome et gène codant pour le bouchon cloné sur un plasmide) (Braun et al., 2003; Nader et al., 2011). De même, une seconde étude effectuée sur le récepteur FepA de l'entérobactine chez *E. coli* montre que la formation de ponts di-sulfure entre le tonneau et le bouchon inhibe le transport du complexe entérobactine-fer (Ma et al., 2007). À l'opposé, des études effectuées sur le récepteur FhuA montrent que la formation de ponts disulfure entre le tonneau et le bouchon n'entraîne aucune modification du transport du complexe sidérophore-fer (Eisenhauer et al., 2005) conduisant les auteurs à proposer un mécanisme où la formation du canal serait due à un changement de conformation entre le tonneau et le bouchon. De même, une autre étude effectuée sur le bouchon de FepA montre qu'il n'est pas capable de se replier normalement lorsqu'il est exprimé en l'absence du tonneau dans des cellules (Usher et al., 2001). Le 3<sup>ème</sup> mécanisme basé sur des études de dynamique moléculaire propose une combinaison des deux précédentes théories à savoir un changement de conformation du bouchon accompagné d'une sortie partielle du bouchon (Gumbart et al., 2007).

Des études de cinétique de transport avec différents analogues de Pvd (Pvd photoactivable, Pvd couplée à des antibiotiques et Pvd produites par d'autres *Pseudomonads* fluorescents) ont montré une très faible spécificité par rapport au sidérophore pour l'étape de transport (Schons et al., 2005). L'étape de liaison du sidérophore à son site de liaison sur FpvA régule cette spécificité. En effet, l'étape de transport est nettement moins sensible à la structure du sidérophore ce qui indique que le canal formé doit être relativement large et ne doit pas impliquer un mécanisme où le sidérophore se glisse à travers un canal étroit (Schons et al., 2005).



**Figure 19** : Représentation compacte de la structure du récepteur FpvA vue du dessus (d'après Cobessi et al., 2005a)

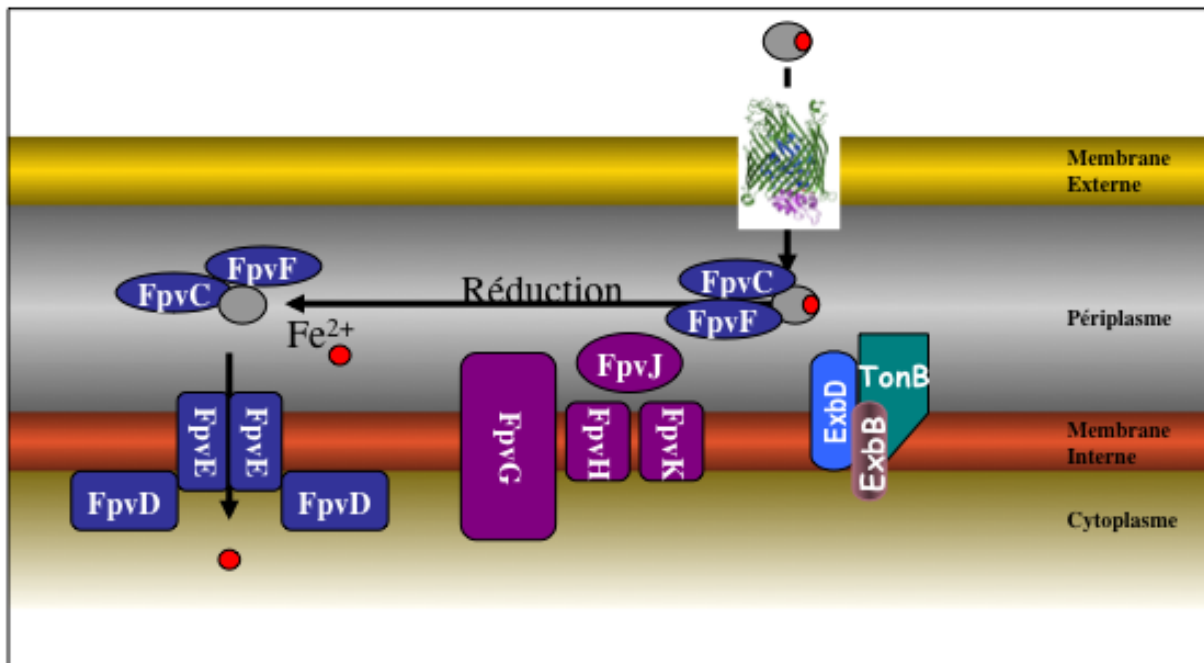
Le tonneau est représenté en bleu, le bouchon en jaune et le complexe Pvd-Fe en bleu, rouge et gris.

## 2. Dissociation du complexe Pvd-Fe

Les complexes sidérophore-fer sont extrêmement stables et ne peuvent se dissocier que par réduction du fer ferrique en fer ferreux ou par dégradation enzymatique du sidérophore. Dans le cas de la voie Pvd, le complexe Pvd-Fe est dissocié par réduction du fer. Ceci a été montré grâce à l'utilisation d'un complexe Pvd-gallium. Le gallium est un métal proche du fer en ce qui concerne la taille et la sphère de coordination, mais qui ne peut pas être réduit (la forme oxydée du gallium n'est pas stable). Aucune dissociation n'est observée avec le complexe Pvd-Ga (Greenwald et al., 2007) puisqu'il s'accumule dans le périplasma de la cellule. La dissociation du complexe Pvd-Fe impliquerait donc très probablement une réduction du fer et cette étape se déroulerait dans le périplasma (Figure 20). Un alignement de séquence montre qu'une protéine appartenant à l'opéron PA2403-PA2404-PA2405-PA2406 possède des homologie de séquence avec les cytochromes *b561* impliqués dans le transfert d'électron dans les cellules eucaryotes. Cette protéine possède quatre histidine conservées pouvant lier le fer. Cet opéron présent dans le locus Pvd pourrait être impliqué directement ou indirectement dans le mécanisme de réduction du complexe Pvd-Fe. En effet, la délétion du gène PA2403 inhibe totalement la dissociation du complexe PVD-Fe chez *P. aeruginosa* (résultats de notre équipe non publiés). Les 4 gènes PA2403-PA2404-PA2405-PA2406 codent pour des protéines de membrane interne, appelées FpvG-H-J-K, suggérant que cette dissociation se déroule dans le périplasma au niveau de la membrane interne.

### 3. Transport du fer à travers la membrane interne

Après dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasma, le fer est transporté vers le cytoplasme par un mécanisme encore non identifié. On trouve cependant au sein du locus Pvd un opéron contenant les gènes *fpvCDEF* (PA2407-8-9-10) avec FpvC et FpvF correspondants à des protéines périplasmiques et FpvDE correspondant respectivement aux modules ATPase et perméase d'un transporteur ABC. De récentes études effectuées au laboratoire ont montré que l'absence de cet opéron réduisait de 40 % l'incorporation de Pvd-<sup>55</sup>Fe et inhibait de 70 % la dissociation du complexe Pvd-Fe (article en préparation). Des études de spectrométrie de masse ont aussi permis de mettre en évidence une interaction entre Pvd-Fe et FpvC et/ou FpvF. Ces deux protéines forment un complexe FpvC<sub>2</sub>-FpvF<sub>2</sub> avec Pvd-Fe ou l'apo Pvd. Aucun complexe avec le fer seul n'est observé (articles en préparation). L'ensemble de ces données suggèrent que ces deux protéines permettent de faire transiter le complexe Pvd-Fe du récepteur de membrane externe FpvA vers le transporteur ABC et le complexe de membrane interne codé par les gènes impliqués dans la dissociation de Pvd-Fe. La perméase et l'ATPase (FpvD-FpvE) pourraient ensuite assurer le transport du fer ferreux à travers la membrane interne. La figure 20 représente un schéma hypothétique du devenir périplasmique du complexe Pvd-Fe.

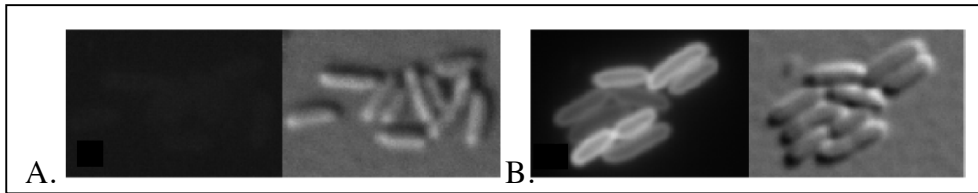


**Figure 20 : Devenir du complexe Pvd-Fe dans le périplasma**

Après transport dans le périplasma, le complexe Pvd-Fe serait pris en charge par les protéines affines périplasmiques FpvC et FpvF. La dissociation du complexe par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  serait probablement effectuée par le complexe FpvGHJK. Après réduction, le  $Fe^{2+}$  serait pris en charge par une protéine afin afin d'être transporté dans le cytoplasme de la bactérie par les protéines codées par les gènes *fpvDE*.

#### 4. Recyclage de la Pvd

Il a été montré au laboratoire qu'après dissociation du complexe Pvd-Fe, la Pvd est recyclée du périplasma vers le milieu extracellulaire (Greenwald et al., 2007; Schalk et al., 2002). Ce recyclage implique la pompe à efflux ATP dépendante PvdRT-OpmQ impliquée également dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée (Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010). Lorsque cette pompe est mutée, la Pvd s'accumule dans le périplasma. Ceci peut être visualisé grâce la fluorescence caractéristique de l'apo-Pvd (Figure 21).



**Figure 21 : Visualisation par microscopie de fluorescence de l'accumulation périplasmique de la Pvd (d'après Yeterian et al., 2010)**

Pour chacun des couples d'images, celle de droite est prise en DIC (Contraste Interférentiel Différentiel) et l'image de gauche est prise avec un filtre CFP (Ex 425-445HQ, Em 460-510HQ, Dc 450). Les expériences ont été réalisées avec des souches PAO1 déficientes pour la production de Pvd (A) et un mutant *pvdRTopmQ* déficient pour la production de Pvd (B) après incubation pendant 45min avec 10  $\mu$ M Pvd-Fe avant montage sur lame.

### C. Régulation de l'expression des gènes de la voie Pvd

Le fer est un élément essentiel à la vie de la cellule, mais lorsqu'il est présent à fortes concentrations, il devient toxique en formant des radicaux libres par la réaction de Fenton :



Il est donc impératif de réguler l'apport en fer afin d'apporter suffisamment de fer et d'autre part d'éviter une surcharge en fer. Il existe deux niveaux de régulation de la voie Pvd chez *P. aeruginosa*, la régulation par le système Fur (Ferrique Uptake Régulator)(Escobar et al., 1999) et celle effectuée par les Facteurs Sigma Extracytoplasmiques (ECF)(Visca et al., 2002).

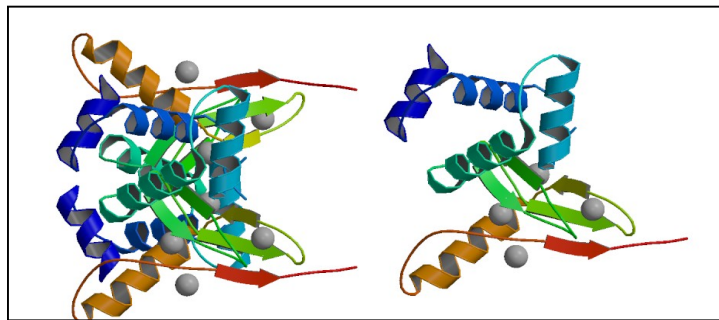
#### 1. Régulation négative par le système Fur

Lorsque la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  présent dans la cellule devient trop importante, le  $\text{Fe}^{2+}$  se fixe à la protéine Fur. Le complexe ainsi formé peut se fixer sur des sites spécifiques présents au niveau du promoteur (les « boîtes fur ») afin de bloquer la transcription des gènes cibles (Escobar et al., 1999).

Chez *P. aeruginosa*, le gène *fur* code pour une protéine cytoplasmique de 15,2 kDa qui dimérise en présence de  $Fe^{2+}$  pour former la protéine Fur active. La structure cristallographique de Fur en complexe avec le fer et en présence de zinc a été résolue (Pohl et al., 2003)(Figure 22). Le zinc est nécessaire à la dimérisation de la molécule (Pohl et al., 2003). Chaque monomère est constitué par deux domaines :

- Un domaine N-terminal impliqué dans la fixation à l'ADN
- Un domaine C-terminal responsable de l'homodimérisation

Chaque monomère possède deux sites de coordination du métal.



**Figure 22 : Structure aux rayons X de la protéine Fur (d'après Pohl et al., 2003)**

À gauche, structure de l'homodimère et à droite, structure du monomère. Les sphères grises représentent le zinc.

Dans la cellule, il y a une grande quantité de protéines Fur (5 000 à 10 000 molécules) (Vasil, 2007). Ceci peut être dû au fait que deux dimères de Fur sont nécessaires pour lier un site opérateur d'environ 27 pb voir même plus pour une répression totale du gène (Escobar et al., 1999 ; Pohl et al., 2003). De plus, une diminution d'un facteur deux ou trois de la quantité de protéine Fur provoque une dérégulation des gènes réprimés par cette protéine et une augmentation de la susceptibilité aux dommages oxydatifs.

En tout, 205 gènes ont été identifiés chez *P. aeruginosa* comme étant régulés par la présence de fer (118 sont induits et 87 sont réprimés)(Ochsner et al., 2002). Des analyses protéomiques ont permis de montrer que la majorité des gènes induits en conditions de carence en fer sont impliqués dans l'acquisition du fer ou dans la virulence bactérienne (Ochsner et al., 2002). Seuls 27 des gènes régulés par la présence de fer possèdent une « Boîte Fur » au niveau de leur promoteur et de plus, les transcrits de certains récepteurs TonB dépendants pour des sidérophores exogènes contenant des « boîtes fur » ne sont pas détectés (Ochsner et al., 2002). Il semblerait donc que d'autres mécanismes de régulation non identifiés à ce jour interviennent en plus de la régulation exercée par Fur.



## 2. Régulation positive par les ECF

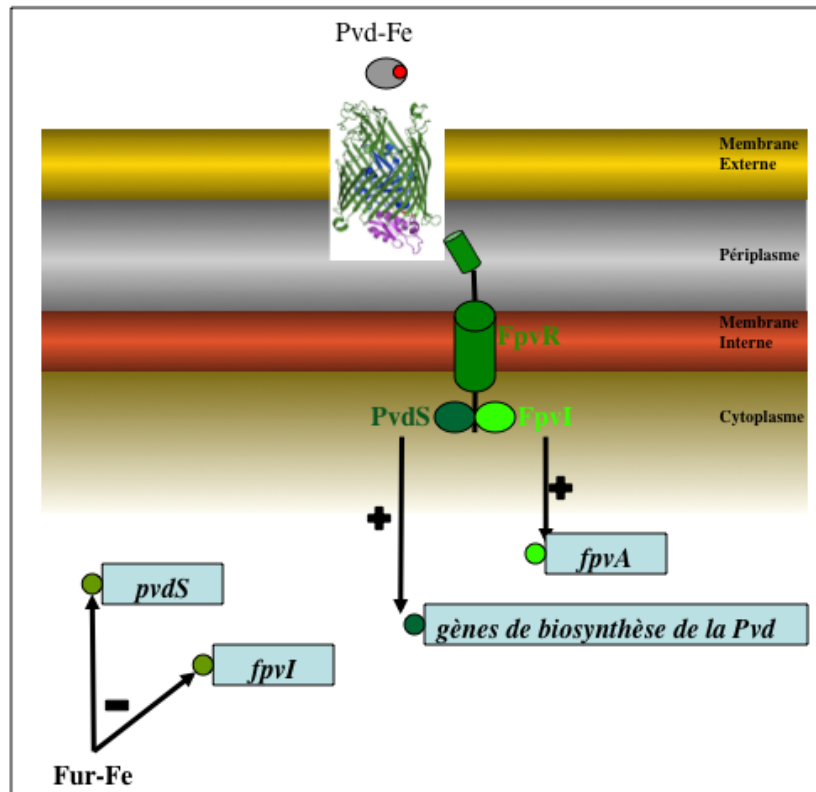
Les facteurs sigma de la famille des ECF constituent un groupe de petits facteurs de transcription (20-30 kDa) qui sont exprimés en réponse à des facteurs environnementaux. Ils sont retrouvés dans un grand nombre de bactéries et contrôlent une grande diversité de fonctions telles que les réponses à la chaleur, au choc osmotique, au stress oxydatif, à la virulence, à la motilité, au transport d'ions métalliques et à la synthèse d'alginate ou de caroténoïdes (Missiakas and Raina, 1998). Leur expression est contrôlée par d'autres régulateurs transcriptionnels et leur activité dans le cytoplasme peut être modulée de manière post-translationnelle par un facteur anti-sigma localisé dans la membrane interne (Helmann, 2002; Hughes and Mathee, 1998; Missiakas and Raina, 1998).

Chez *P. aeruginosa*, la majorité des facteurs sigma ECF sont requis pour l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de sidérophore et l'acquisition du fer. Ces facteurs sigma sont classés comme facteurs sigma IS (Iron Starvation). La plupart de ces facteurs sigma IS sont co-transcrits avec leur facteur anti-sigma correspondant dans les souches déficientes en fer. Leur expression est réprimée par Fur. Le facteur anti-sigma correspondant module l'activité de ces facteurs sigma au niveau translationnel par l'intermédiaire d'une cascade transductionnelle activée par l'interaction du complexe sidérophore-fer approprié avec le récepteur TonB-dépendant de la membrane externe (Braun and Mahren, 2005; Visca et al., 2002). Le facteur sigma le plus étudié est le facteur PvdS requis pour l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la Pvd. PvdS est une protéine de 187 résidus qui forme des complexes stables avec la core-RNA polymérase (RNAP) et requiert la présence de celle-ci pour se fixer au promoteur des gènes de biosynthèse de la Pvd (Leoni et al., 2000; Wilson and Lamont, 2006). Tous les promoteurs dépendants de PvdS possèdent une signature spécifique correspondant à la séquence TAAAT, aussi connue sous le nom de boîte IS. Cette boîte IS est localisée approximativement à la position -33 correspondant au point de départ de la transcription. Les promoteurs dépendants de PvdS possèdent à une distance de 16 à 17 nucléotides, une séquence consensus CGT qui est requise pour l'activité du promoteur. Le gène *pvdS* est transcrit par un promoteur dépendant du facteur sigma RpoD et de Fur. Le facteur sigma RpoD possède de fortes homologues de séquence avec le facteur  $\sigma 70$  d'*E. coli*. Ce facteur sigma est impliqué dans la régulation des « gènes de ménage » durant la phase exponentielle de croissance (Fujita et al., 1994). La transcription de *pvdS*, ainsi que tous les gènes dépendants de PvdS sont régulés par la concentration en fer (Barton et al., 1996; Ochsner and Vasil, 1996).

D'autres facteurs sigma IS présents chez *P. aeruginosa* sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Comme par exemple FpvI, qui est nécessaire à l'expression de FpvA (Beare et al., 2003; Redly and Poole, 2003), FoxI et FiuI qui sont requis pour l'expression des récepteurs de la ferrioxamine et du ferrichrome (Llamas et al., 2006).

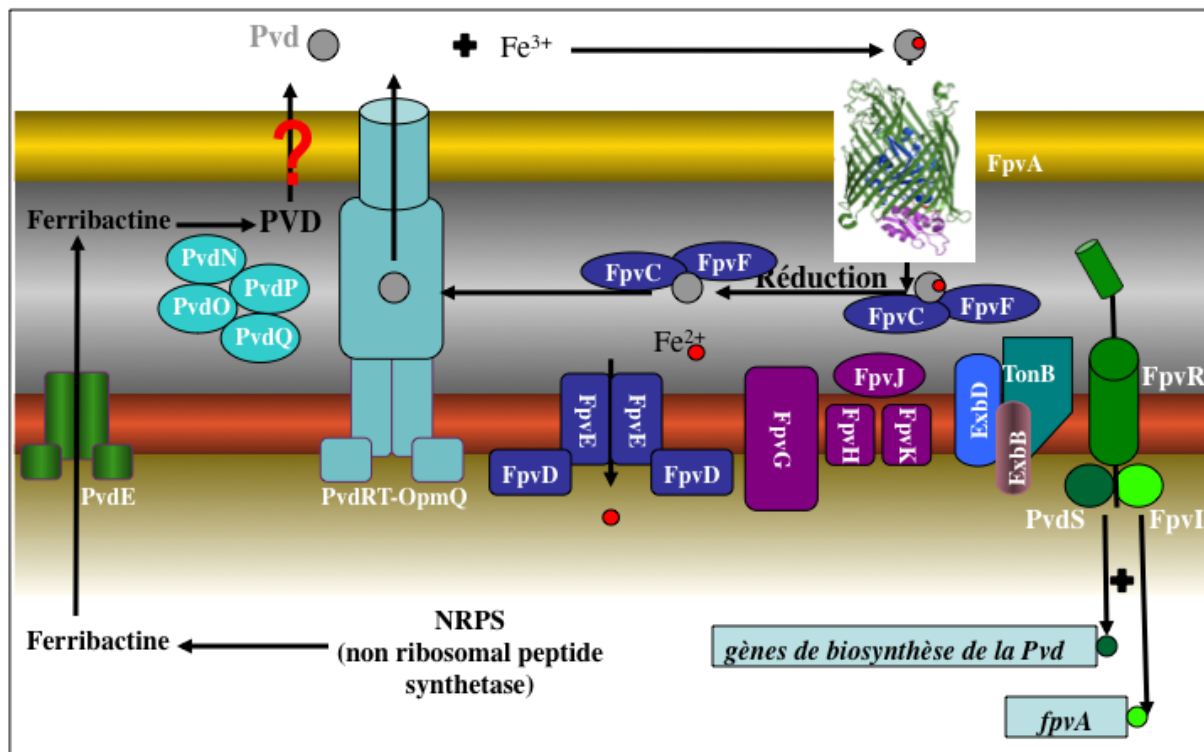
### **3. Régulation du système : implication de PvdS, FpvI et FpvR**

La régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer par la Pvd se fait par la Pvd ferrique elle-même. Cette régulation implique une transduction de signal allant du récepteur FpvA localisé dans la membrane externe aux facteurs sigma cytoplasmiques PvdS et FpvI en passant par un facteur anti-sigma FpvR localisé dans la membrane interne. FpvR est ancré dans la membrane cytoplasmique et possède une extension périplasmique permettant d'interagir avec FpvA et une extension cytoplasmique permettant l'interaction avec PvdS et FpvI (Figure 23). En l'absence de Pvd-Fe, FpvR séquestre les deux facteurs sigma FpvI et PvdS afin d'inhiber l'expression de FpvA et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la Pvd. En présence de Pvd-Fe, l'interaction de ce complexe avec son site de liaison sur FpvA provoque un changement de conformation du récepteur avec une rotation du domaine de signalisation qui peut de ce fait interagir avec FpvR (Cf. chapitre 1-C-1-a)(Brillet et al., 2007; Schalk et al., 2009). Cette interaction permet la libération des deux facteurs sigma PvdS et FpvI qui peuvent activer l'expression de leurs gènes associés : *fpvA* pour FpvI et les gènes codants pour les enzymes impliqués dans la biosynthèse de la Pvd pour PvdS (Beare et al., 2003; Redly and Poole, 2003; Redly and Poole, 2005)(Figure 23). En effet, une surexpression de *fpvR* induit une absence de l'expression des gènes régulés par PvdS et inversement, une délétion de *fpvR* provoque une activation de l'expression de ces mêmes gènes (Lamont et al., 2002). Le mécanisme exact permettant la transduction de signal du récepteur FpvA aux facteurs sigma cytoplasmiques n'a pas été identifié. Seules des interactions entre la région N-terminale de FpvR avec PvdS et FpvI ont été démontrées *in vivo* (Redly and Poole, 2005).



**Figure 23 : Régulation du système Pvd**

La fixation du complexe Pvd-Fe sur FpvA induit un changement de conformation du récepteur qui lui permet d'interagir au niveau du périplasm avec le facteur anti-sigma FpvR. Cette interaction conduit au niveau du cytoplasme à la libération des deux facteurs sigma PvdS et FpvI qui peuvent ainsi activer l'expression des gènes de biosynthèse de la Pvd dans le cas de PvdS et de *FpvA* dans le cas de FpvI. L'expression des deux facteurs sigma PvdS et FpvI est régulée par la protéine Fur qui en présence d'une surcharge en fer, est activée et réprime l'expression des gènes *pvdS* et *fpvI*, grâce à la présence d'une boîte Fur en amont de ces gènes.



**Figure 24 : La voie Pvd chez *P. aeruginosa***

La synthèse de la Pvd débute dans le cytoplasme par la synthèse d'un précurseur et fait intervenir des NRPS. Ce précurseur nommé ferribactine est ensuite sécrété à travers la membrane interne par le transporteur ABC PvdE. Dans le périplasm, la ferribactine est maturée par les enzymes PvdN-O-P-Q afin d'obtenir la Pvd. La Pvd est ensuite sécrétée à travers la membrane externe par un mécanisme qui a été identifié durant cette thèse.

Une fois dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer. Le complexe Pvd-Fe formé est ensuite reconnu par un récepteur de membrane externe spécifique (FpvA). La fixation du complexe sur le récepteur induit un changement de conformation permettant à FpvA d'interagir avec TonB par l'intermédiaire de la « boîte TonB » et avec FpvR grâce à son domaine de signalisation. Le passage de la Pvd-ferrique à travers ce récepteur vers le périplasm nécessite de l'énergie qui est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Un changement conformationnel du récepteur permet le passage du complexe par la formation d'un canal.

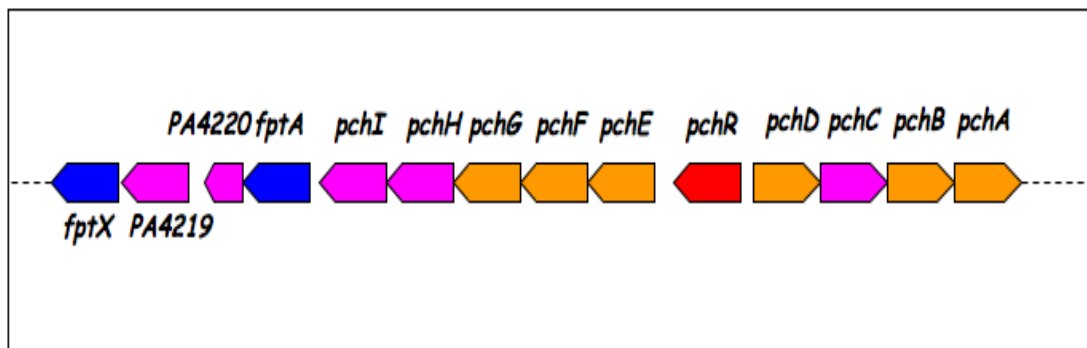
Dans le périplasm le complexe Pvd-Fe serait pris en charge par les deux protéines affines FpvC et FpvK. Le complexe serait ensuite dissocié par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Cette réduction serait effectuée par une ou plusieurs protéines du complexe FpvG-H-J-K. Le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) est ensuite pris en charge par une protéine affine associée à un récepteur ABC qui permet le passage à travers la membrane interne vers le cytoplasme. Après dissociation, la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ.

## IV. La voie Pch chez *P. aeruginosa*

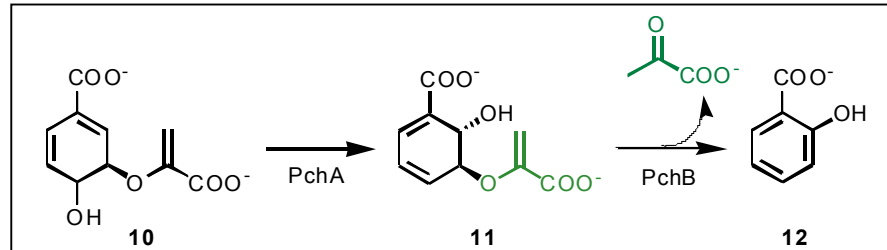
### A. Biosynthèse de la Pch

Comme pour la Pvd, la biosynthèse de la Pch est effectuée par des peptides synthétases non ribosomique (NRPS). L'ensemble des gènes est regroupé sur un même locus en deux opérons : *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Figure 25). La Pch résulte de l'assemblage d'une molécule d'acide salicylique, de deux cystéines et d'un groupement méthyle. Les enzymes PchA et PchB sont responsables de la synthèse de l'acide salicylique à partir du chorismate (Figure 26)(Gaille et al., 2002; Gaille et al., 2003). L'activation de l'acide salicylique par PchD permet ensuite son interaction avec PchE, enzyme responsable de la condensation de l'acide salicylique avec la cystéine (Quadri et al., 1999). L'ajout de la seconde cystéine est réalisé par PchF (Quadri et al., 1999). La dernière étape de cette biosynthèse est la réduction de la double liaison de la 2-hydroxyphényl-bisthiazoliny-S-PchF par PchG pour former la Pch (Reimmann et al., 2001).

Actuellement, le rôle des protéines PchC, PchH et PchI présentes également dans l'opéron n'a pas été déterminé. La protéine PchI n'est pas nécessaire à la biosynthèse de la Pch mais sa présence accroît fortement la quantité de sidérophores produite. Des homologies de séquences suggèrent que PchC appartient à la famille des thioestérases et pourrait jouer un rôle de « correcteur » capable d'éliminer un substrat inapproprié lié à PchE ou PchF par une liaison thioester (Reimmann et al., 2004). Les protéines PchH et PchI, quant à elles, présentent des homologies de séquences avec des ATPases, mais elles ne semblent pas être impliquées dans la sécrétion de la Pch (Reimmann et al., 2001). À ce jour, le mécanisme de sécrétion de la Pch n'a pas été identifié.



**Figure 25 :** Représentation schématique du locus comprenant les gènes impliqués dans la voie Pch. Les gènes codants pour les protéines impliquées dans la biosynthèse sont représentés en orange. Ceux qui sont impliqués dans le transport de Pch-Fe sont représentés en bleu et ceux qui sont impliqués dans la régulation en rouge. Les gènes de fonctions inconnues sont colorés en rose.

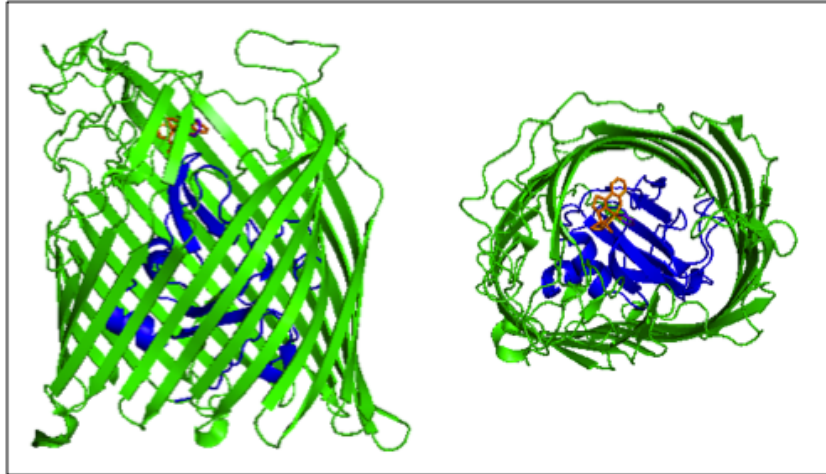


**Figure 26 : Synthèse de l'acide salicylique par PchA et PchB**

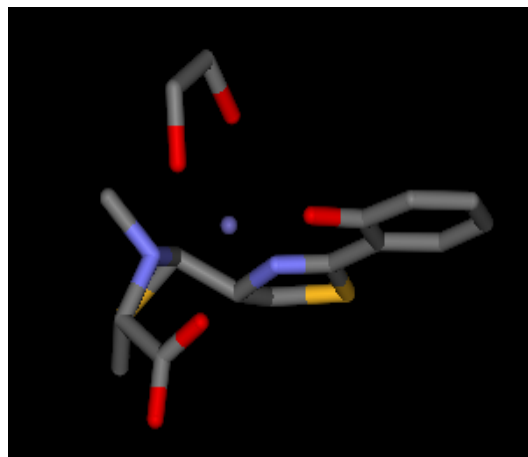
L'isochorismate synthase (PchA) permet la transformation du chorismate en isochorismate par déplacement du groupe hydroxyl phénolique de la position C4 à la position C2 (Gaille et al., 2003). L'isochorismate pyruvate lyase (PchB) permet ensuite l'élimination du pyruvate et la formation de l'acide salicylique (Gaille et al., 2002).

## B. Transport du fer par la Pch

Dans le milieu extracellulaire, la Pch chélate le fer avec une affinité de  $10^{18} \text{ M}^{-1}$  (Brandel et al. In preparation). Le complexe formé est ensuite reconnu par le récepteur spécifique de membrane externe FptA. La structure de ce récepteur a été résolue (Cobessi et al., 2005b)(Figure 27). Il présente, comme FpvA et tous les récepteurs TonB dépendants : une structure en tonneau  $\beta$  obturé par un domaine globulaire appelé bouchon. Dans la structure cristallographique de FptA, le fer est chélaté par une Pch tétradentate et la sphère de coordination du fer est complétée par deux oxygènes d'une molécule d'éthylène glycol issue des conditions de cristallisation (Figure 28). Le site de liaison du récepteur est constitué essentiellement d'acides aminés hydrophobes permettant l'interaction avec ce sidérophore hydrophobe et peu soluble dans l'eau. L'activation du récepteur FptA est assurée, comme pour tous les récepteurs de sidérophores, par l'énergie de la force proton motrice de la membrane interne et transmise au récepteur par le complexe TonB localisé dans la membrane interne (Hoegy et al., 2005). De récentes études effectuées sur les récepteurs FptA et FetA (récepteur de l'énantio-Pch produit par *Pseudomonas Fluorescens*) ont montré que ces récepteurs avaient une forte stéréospécificité de liaison (Hoegy et al., 2009; Brillet et al., In preparation). En effet, la Pch possède 3 carbones asymétriques. Des études de relation structure-activité réalisées dans notre laboratoire ont montré que seule la configuration R du carbone C4'' est importante pour l'interaction avec FptA (Hoegy et al., 2009). Après passage à travers la membrane externe, le transport du complexe Pch-fer vers le cytoplasme serait assuré par une perméase, FptX (Cuiv et al., 2004). Le complexe Pch-Fe serait dissocié dans le cytoplasme un mécanisme inconnu.



**Figure 27** : Structure aux rayons X du récepteur FptA-Pch-Fe (d'après Cobessi et al., 2005b)  
Le tonneau est représenté en vert et le bouchon en bleu. Le complexe Pch-Fe est représenté en orange.

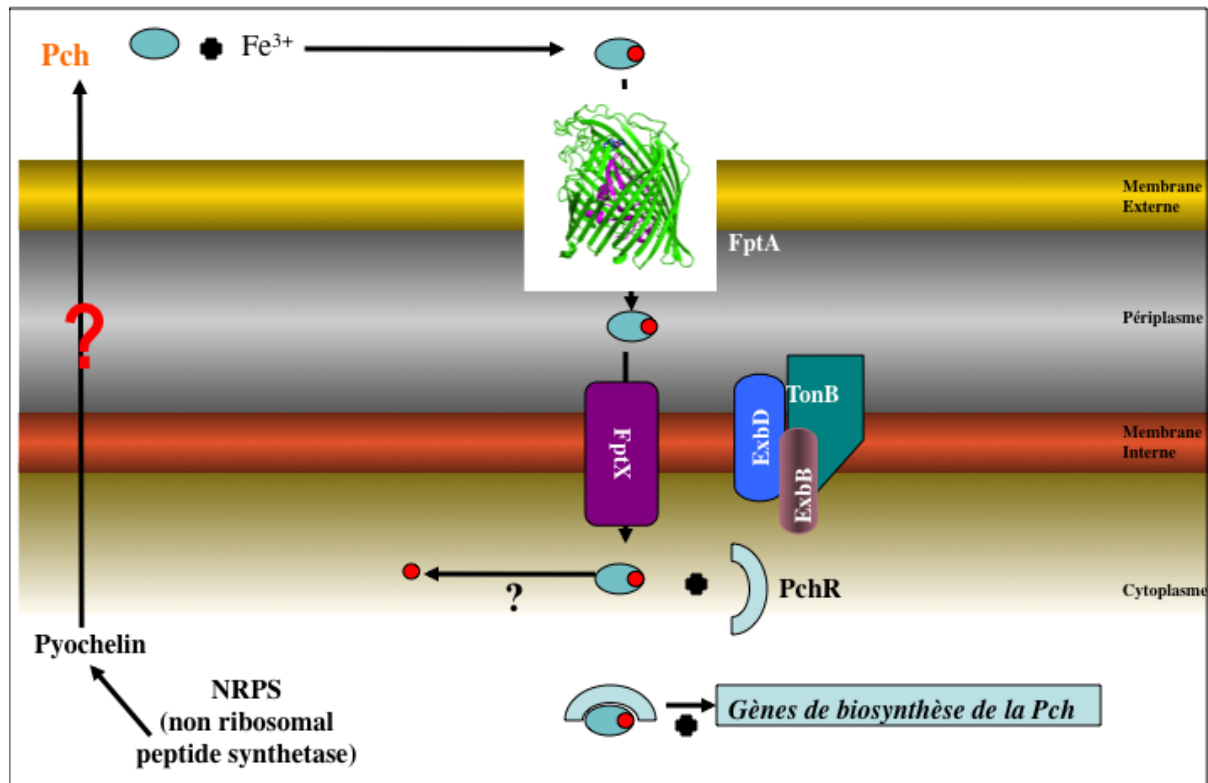


**Figure 28** : Structure de la pyochéline en complexe avec le fer dans la structure cristalline de FptA (d'après Mislín et al., 2006)  
Dans la structure de FptA-Pch-Fe, le fer est chélaté par une molécule de Pch et un éthylène glycol provenant des conditions de cristallisation.

### C. Régulation de l'expression des gènes de la voie Pch

Comme dans le système Pvd, la régulation négative de l'expression des gènes de la voie Pch est effectuée par la protéine Fur (Ochsner et al., 1995)(II-C-1). L'activation de l'expression de *fptA* et des gènes de la biosynthèse de la Pch est effectuée par PchR qui présente une forte homologie de séquence avec les activateurs de transcription de type AraC (Heinrichs and Poole, 1993; Heinrichs and Poole, 1996). Cette protéine est activée suite à une interaction avec la Pch-ferrique et se lie ensuite à l'ADN sur les « boîtes PchR » afin d'activer l'expression des gènes (Michel et al., 2005). L'absence de FptA et FptX affecte non seulement le transport du fer via la Pch mais aussi la production de Pch (Michel et al., 2007).

La régulation positive par PchR semble apporter une preuve indirecte du transport du complexe Pch-Fe jusque dans le cytoplasme avec dissociation du métal de ce sidérophore dans ce compartiment cellulaire et non dans le périplasma comme dans le cas de la voie Pvd.



**Figure 29 : La voie Pch chez *P. aeruginosa***

Après synthèse dans le cytoplasme par les NRPS, la Pch est sécrétée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme inconnu. Dans le milieu extracellulaire, la Pch chélate le fer. Le complexe Pch-fer ainsi formé est reconnu au niveau de la membrane externe et transporté par le récepteur FptA. Le passage à travers la membrane interne est effectué par FptX. Dans le cytoplasme, le complexe Pch-fer se lie à l'activateur de transcription PchR afin d'activer l'expression des gènes de la voie Pch. C'est également dans ce compartiment cellulaire que le complexe Pch-Fe se dissocie par un mécanisme inconnu.



## V. Le transport du fer par les sidérophores exogènes

Les voies de transport du fer via des sidérophores exogènes n'ont pas encore été étudiées au niveau moléculaire chez *P. aeruginosa*.

### A. L'entérobactine

L'entérobactine est le sidérophore majeur produit par *E. coli* et a une affinité pour le fer de l'ordre de  $10^{42} \text{ M}^{-1}$  (Carrano et al. 1979). Elle forme un complexe 1:1 avec le fer. Le transport de l'entérobactine, à travers la membrane externe chez *P. aeruginosa* PAO1, est assuré par les récepteurs de membrane externe PfeA et PirA (Dean and Poole, 1993; Ghysels et al., 2005). Le passage à travers la membrane interne implique probablement les gènes *pfeBCDG* présents dans un même locus et homologues aux gènes *fepBCDG* d'*E. coli* codants pour un transporteur ABC impliqué dans la translocation de l'entérobactine ferrique au travers de la membrane interne. L'induction de ces gènes a lieu lorsque la bactérie est carencée en fer et en présence d'entérobactine. Cette induction est effectuée par le couple de protéines PfeR/PfeS appartenant à la superfamille des protéines de régulation à deux composants (Dean et al., 1996). Les systèmes à deux composants sont constitués d'une protéine senseur ancrée dans la membrane cytoplasmique et d'une protéine régulatrice située dans le cytoplasme. En présence de molécule signal (ici le complexe entérobactine-Fe), le senseur est phosphorylé et la cascade de phosphorylation active ensuite le régulateur qui va se fixer sur l'ADN (Hoch, 2000).

### B. Le citrate

Le citrate a depuis longtemps été identifié comme pouvant être utilisé par *P. aeruginosa* PAO1 pour l'acquisition du fer (Cox, 1980). Comme pour l'entérobactine, la présence de citrate dans l'environnement de la bactérie induit l'expression des gènes impliqués dans son transport. La régulation de ce système se fait par l'intermédiaire des deux protéines FecI/FecR, FecI étant le facteur sigma et FecR le facteur anti-sigma très similaire au système FpvR/FpvI, PvdS de la voie Pvd (Poole and McKay, 2003). Le transport du complexe ferricitrate implique pour le passage à travers la membrane externe le récepteur FecA (Marshall et al., 2009). Il semblerait que le transport à travers la membrane interne soit effectué par FeoB (transporteur du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ )) (Marshall et al., 2009), mais aucun mécanisme de dissociation du complexe citrate-Fe dans le périplasme n'est proposé à ce jour.

### **C. La desferrioxamine B**

La desferrioxamine B, produite par le genre *Streptomyces*, peut être utilisée par *P. aeruginosa*. Elle forme un complexe 1:1 avec le fer. Lorsque la bactérie est en présence de cette molécule et en conditions de carence en fer, il y a expression de deux récepteurs de membrane externe (FoxA et FiuA) probablement impliqués dans le transport de la ferrioxamine (Llamas et al., 2006). Une perméase, nommée FoxB, interviendrait pour le transport au niveau de la membrane interne (Cuiv et al., 2007). La régulation de l'expression des gènes impliqués dans cette voie se fait par les deux protéines FoxI/FoxR (FoxR étant le facteur anti sigma et FoxI le facteur sigma) (Mettrick and Lamont, 2009).

Il a été montré que la desferrioxamine, comme la Pvd ou la Pch, était aussi capable de chélater d'autres métaux que le fer, tels que : Bi, Cd, Cu, Hg, Pb ou Zn (Hernlem et al., 1996; Neubauer U. et al., 2000).

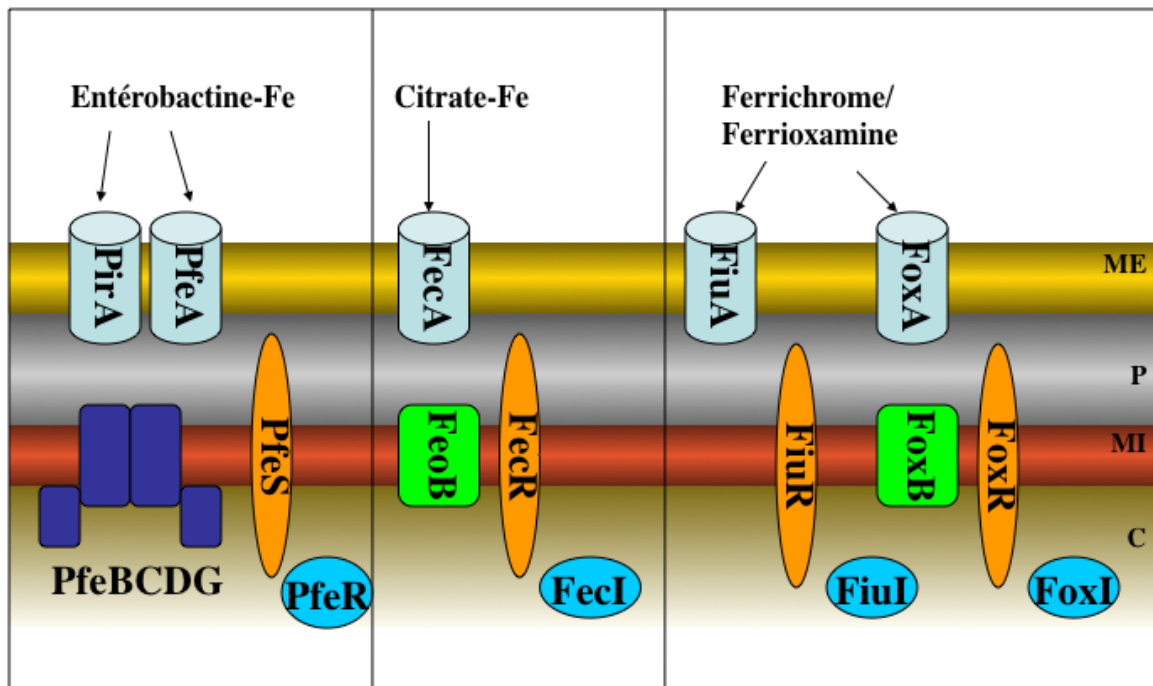
### **D. Le desferrichrome**

Le desferrichrome est un sidérophore produit par les champignons du genre *Ustilago*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Ce sidérophore fait partie de la famille des hydroxamates comme la ferrioxamine. Il est constitué de trois résidus de glycine et de trois résidus de  $\delta$ -N-acetyl-L- $\delta$ -hydroxyornithine qui forment un hexapeptide cyclique. Le ferrichrome est utilisé par un grand nombre de bactéries dont *E. coli*. Le transport du fer par l'intermédiaire du desferrichrome a été largement étudié chez *E. coli* et constitue l'archétype dans ce domaine (Braun, 2003). Le desferrichrome possède une affinité de  $10^{29} \text{ M}^{-1}$  pour le fer et forme un complexe 1:1 avec le fer (Raymond and Carrano, 1979). Des études protéomiques ont montré que les récepteurs de membrane externe impliqués dans le transport du ferrichrome sont certainement FiuA et FoxA (Llamas et al., 2006). Pour le transport à travers la membrane interne, une perméase FoxB a été proposée (Cuiv et al., 2007). Comme pour les autres sidérophores exogènes, l'induction du système ne s'effectue que si la bactérie se trouve en conditions de carence en fer et en présence de desferrichrome. La régulation s'effectue par l'intermédiaire des protéines FiuI (facteur sigma) et FiuR (facteur anti-sigma).

### **E. La cépabactine**

La cépabactine est le sidérophore majeur produit par *Burkholderia cepacia*. Elle forme un complexe 3:1 avec le fer. À ce jour, les mécanismes impliqués dans le transport du fer par la cépabactine n'ont pas encore été identifiés. Comme pour les autres sidérophores, il y a

probablement implication d'un récepteur spécifique de membrane externe TonB dépendant. Des études effectuées au laboratoire ont montré que la cépabactine pouvait compléter la sphère de coordination du fer lié à une Pch tétravalente et ainsi permettre l'acquisition du fer par la voie Pch (Mislin et al., 2006). Des complexes cépabactine-fer sont transportés par *P. aeruginosa* par une voie indépendante de la Pch ou de la Pvd (Mislin et al., 2006).



**Figure 30 : Voies de transport du fer par les sidérophores exogènes utilisés par *P. aeruginosa* PAO1**

Le transport à travers la membrane externe de ces sidérophores est effectué dans chaque cas par un récepteur spécifique de membrane externe TonB dépendant : PirA et PfeA pour l'entérobactine-ferrique, FecA pour le citrate-ferrique et FiuA et FoxA pour le ferrichrome et la ferrioxamine. Pour le passage à travers la membrane interne, il y a soit implication de perméases (FeoB ; FoxB) ou de transporteur ATP dépendant (PfeBCDG). En ce qui concerne le ferrichrome, le transporteur impliqué dans le passage à travers la membrane interne n'avait pas encore été identifié lorsque j'ai démarré cette thèse. L'expression de ces protéines de transport est régulée négativement par la voie Fur et positivement par un système impliquant un facteur anti-sigma (FecR pour le citrate, FiuR pour le desferrichrome et FoxR pour la desferrioxamine) et un facteur sigma (FecI ; FiuI, FoxI). Seule l'entérobactine possède un système de régulation différent effectué par un système à deux composants (PfeS et PfeR).



**Chapitre 3 :**  
**Le transport du fer chez *Escherichia coli***



Les voies d'acquisition du fer via les sidérophores desferrichrome et entérobactine chez *E. coli* ont été très étudiées et sont incontestablement les archétypes dans le domaine. Ces voies de transport étant des références, elles seront décrites ici brièvement.

## **I. Le transport du fer via l'entérobactine**

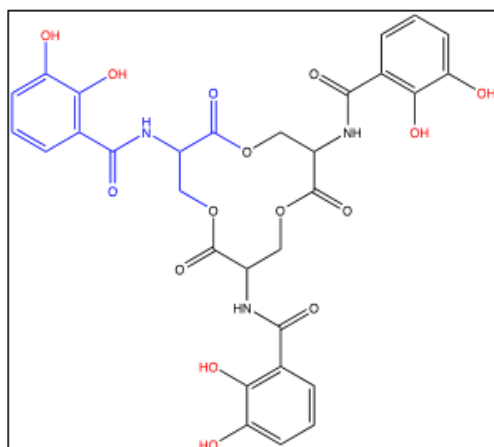
En conditions de carence en fer, *E. coli* synthétise et sécrète un sidérophore majeur, l'entérobactine (Figure 31). Ce sidérophore chélate le fer avec une affinité de  $10^{42} \text{ M}^{-1}$  et une stoechiométrie de 1:1, par des groupements catéchols (Albrecht-Gary and Crumbliss, 1998; Raymond et al., 2003).

L'ensemble des gènes impliqués dans cette voie d'acquisition du fer sont regroupés au niveau d'un locus d'environ 22 kb.

### **A. Biosynthèse et sécrétion de l'entérobactine**

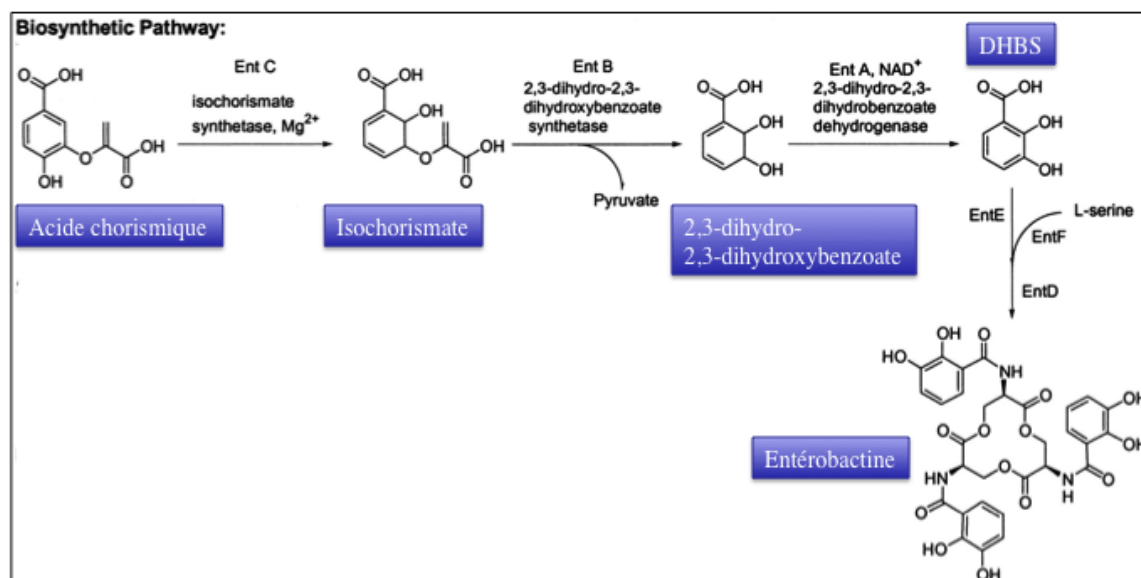
#### **1. Biosynthèse**

Tout comme la Pvd, l'entérobactine est synthétisée chez *E. coli* par des peptides synthétases non ribosomiques dans le cytoplasme. Cette synthèse s'effectue en trois étapes. Tout d'abord, l'acide chorismique est transformé en isochorismate puis en acide 2,3-dihydroxybenzoïc (Figure 32). Il y a ensuite condensation de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïc et de la L-sérine pour former l'entérobactine (Crosa, 1989; Raymond et al., 2003). La première étape fait intervenir 3 enzymes : l'isochorismate synthétase, la 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthétase et la 2,3-dihydro-2,3dihydroxybenzoate déshydrogénase codées respectivement par *entC*, *entB* et *entA*. La deuxième étape permet la synthèse de l'entérobactine à partir de 3 molécules d'acide 2,3-dihydroxybenzoïc et de la L-sérine et ferait intervenir un complexe multienzymatique composé des protéines codées par les gènes *entD*, *entE*, *entF* et *entG* (Shaw-Reid et al., 1999). La sérine est activée par adénylation et se fixe sur EntF en tant qu'intermédiaire acyl-S-pantéthéine. Le domaine terminal thioestérase de EntF relargue l'entérobactine après hydrolyse des trois molécules de DHBS par cyclisation intramoléculaire (Reichert et al., 1992).



**Figure 31 : Structure de l'entérobactine**

L'entérobactine est un cycle triester formé de 3 groupements 2,3-dihydroxy-*N*-benzoyl-L-sérine (DHBS). En bleu est représenté l'une des molécules de DHBS. Les hydroxyles intervenants dans la chélation du fer sont représentés en rouge.



**Figure 32 : La biosynthèse de l'entérobactine (d'après Raymond et al., 2003)**

L'acide chorismique est transformé en isochorismate par l'enzyme EntC. Ce composé est ensuite transformé en 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate à l'aide de l'enzyme EntB puis en acide 2,3-dihydrobenzoïque (DHB) par EntA. La liaison amide entre la L-sérine et le DHB est catalysée par les enzymes EntD, EntE, EntF et la partie C-terminal de EntB, qui est une protéine bi-fonctionnelle (Gehring et al., 1997).

## 2. Sécrétion de l'entérobactine

L'entérobactine ne peut pas diffuser de manière passive du cytoplasme de la bactérie vers le milieu extracellulaire mais est sécrétée par un transport actif. Le transport à travers la membrane interne vers le périplasma est effectué par EntS, un transporteur appartenant à la famille des transporteurs MFS (Furrer et al., 2002). Ces transporteurs utilisent l'énergie de la force proton motrice de la membrane interne pour fonctionner. On trouve, couplée à ce



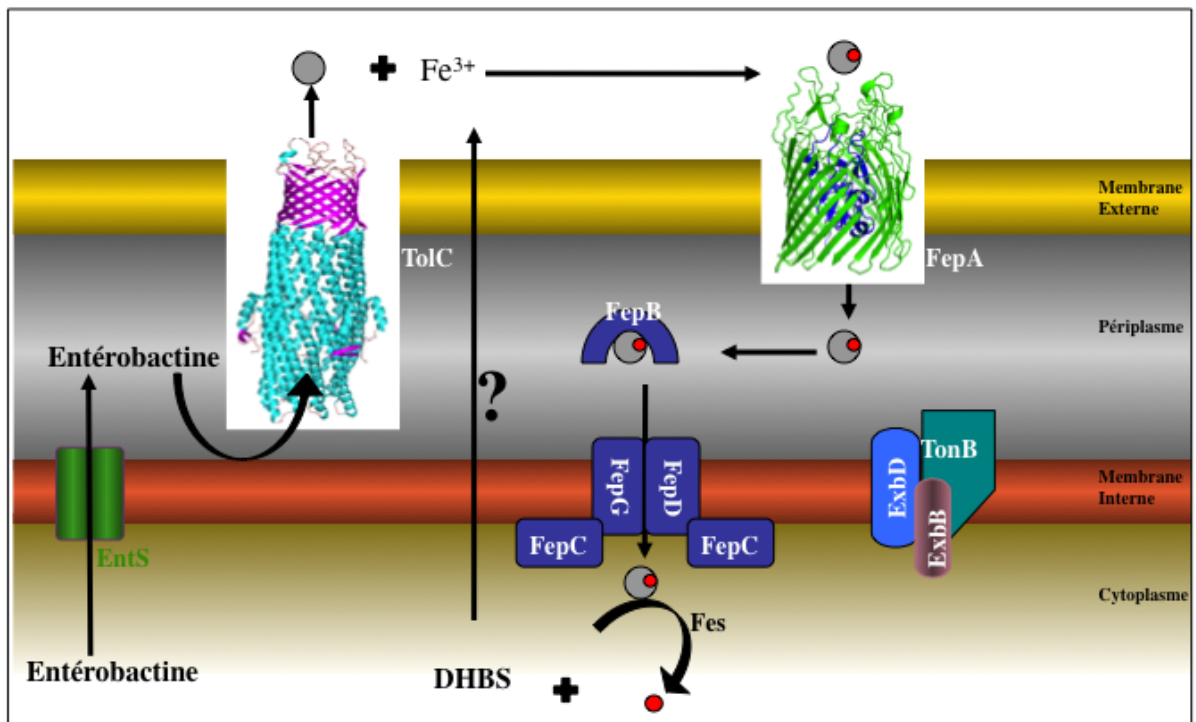
transporteur, la protéine de membrane externe TolC qui permet le transport de l'entérobactine à travers la membrane externe (Bleuel et al., 2005). En effet, en absence d'EntS et/ou de TolC, aucune sécrétion d'entérobactine n'est observée.

## **B. Transport du complexe entérobactine-fer dans la cellule bactérienne**

Après chélation du fer dans le milieu extracellulaire, le complexe fer-entérobactine est transporté dans la bactérie par FepA, un récepteur spécifique TonB dépendant situé au niveau de la membrane externe (Fleming et al., 1985; Pugsley and Reeves, 1976). L'énergie nécessaire au passage du complexe entérobactine-fer à travers FepA est fournie par la force proton motrice de la membrane interne (Pugsley and Reeves, 1977). Celle-ci est transmise au récepteur par le complexe TonB-ExbB-ExbD ancré dans la membrane interne. La structure de FepA a été résolue (Buchanan et al., 1999). Cette protéine est constituée d'un tonneau composé de 22 brins  $\beta$  anti-parallèles obturé par un bouchon (Buchanan et al., 1999) et ne possède pas de domaine de signalisation comme FpvA.

Le complexe est ensuite transporté du périplasma vers le cytoplasme par un transporteur ABC (FepBCDG) localisé dans la membrane interne (Ozenberger et al., 1987) (Figure 33). Ce mécanisme de transport implique 3 étapes : (i) liaison du complexe entérobactine-fer par la protéine périplasmique FepB, (ii) interaction de FepB avec la perméase constituée de FepD et FepG, et enfin (iii) hydrolyse de l'ATP par les domaines liants l'ATP de FepC (Raymond et al., 2003), ce qui permet le transport.

Dans le cytoplasme, le complexe entérobactine-fer est dissocié par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  accompagnée d'une dégradation de l'entérobactine. La dégradation de l'entérobactine est effectuée par Fes, une estérase qui catalyse l'hydrolyse de l'entérobactine en DHBS (Brickman and McIntosh, 1992) (Figure 33). Ces produits de dégradation sont recyclés dans le milieu extracellulaire où ils sont toujours capables de chélater le fer (Grass, 2006). Le recyclage des DHBS s'effectue par un mécanisme encore inconnu à ce jour. Des récepteurs de membrane externe impliqués dans le transport des complexes DHBS-Fe ont été identifiés : CirA (le récepteur de la salmochéline) et Fiu (Destoumieux-Garzon et al., 2006). Le mécanisme de transport à travers la membrane interne de ces complexes DHBS-Fe est effectué par le même transporteur que celui de l'entérobactine (FepBCDG).



**Figure 33 : La voie entérobactine chez *E. coli***

L'entérobactine est synthétisée dans le cytoplasme par les NRPS. Elle est sécrétée dans le périplasma par EntS puis transportée à travers la membrane externe jusqu'au milieu extracellulaire par la protéine TolC. Dans le milieu extracellulaire, l'entérobactine chélate le fer. Le complexe formé est reconnu par le récepteur de membrane externe FepA. La ferrienterobactine est transportée à travers ce récepteur grâce à l'énergie fournie par le complexe TonB. Dans le périplasma, elle est prise en charge par la protéine FepB associée au transporteur ABC (FepCDG) et transportée dans le cytoplasme. La ferrienterobactine est ensuite dissociée par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  accompagnée d'une dégradation de l'entérobactine. Le produit de dégradation formé est recyclé dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore inconnu.

## **II. Le transport du fer via le desferrichrome.**

Le desferrichrome est un sidérophore exogène produit par des champignons des genres *Aspergillus* ou *Ustilago* et utilisé par *E. coli* dont la structure a été décrite page 42.

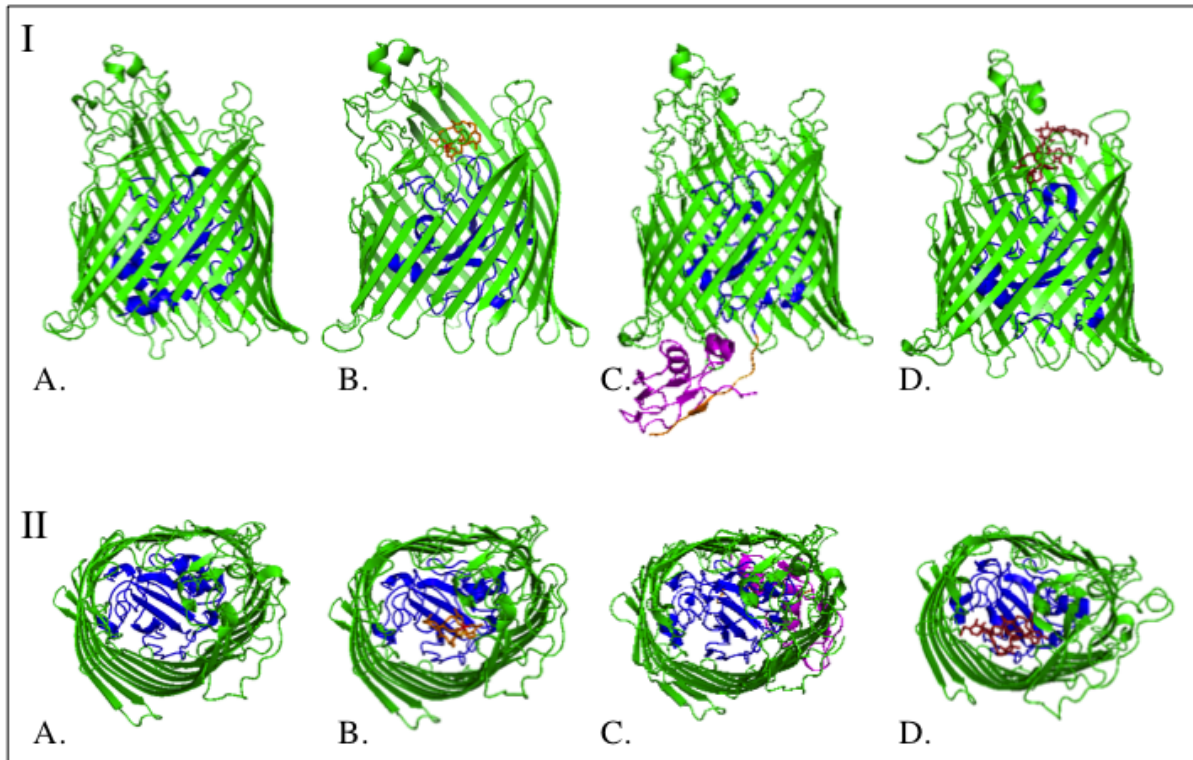
### **A. Transport à travers la membrane externe.**

Le complexe desferrichrome-Fe se forme dans le milieu extracellulaire et est ensuite reconnu par un récepteur spécifique FhuA situé au niveau de la membrane externe. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs TonB dépendants comme tous les récepteurs de sidérophores. FhuA, en plus de reconnaître le ferrichrome, peut aussi jouer le rôle de récepteur pour les bactériophages T1, T5,  $\Phi$ 80, la colicine M (toxine) et transporter l'albomycine (Hantke, 1978; Hantke and Braun, 1978). Cette dernière est un antibiotique ayant de fortes analogies structurales avec le desferrichrome.

Différentes structures de ce récepteur ont été déterminées : sous sa forme apo, sous sa forme holo (chargée en sidérophore-Fe ou albomycine) ou en complexe avec la partie périplasmique de TonB (Ferguson et al., 1998; Locher et al., 1998; Pawelek et al., 2006) (Figure 34). Le récepteur FhuA est constitué d'un tonneau  $\beta$  de 22 brins anti-parallèles obturé par un bouchon. La boîte TonB n'est visible que dans la structure obtenue en complexe avec la partie périplasmique de TonB (Pawelek et al., 2006). Le contact entre TonB et FhuA permet de stabiliser la partie N-terminale de FhuA contenant la « boîte TonB » et de montrer pour la première fois l'interaction entre la partie périplasmique de TonB et la « boîte TonB » d'un récepteur de sidérophore. Cette interaction est constituée d'un feuillet  $\beta$  inter-protéique avec 3 brins de TonB et 1 brin de la « boîte TonB » (Pawelek et al., 2006) (Figure 34C). Comme c'est le cas pour tous les récepteurs TonB dépendants, l'énergie nécessaire au passage à travers FhuA est fournie par la force proton motrice qui est transmise au récepteur par le complexe TonB-ExbB-ExbD.

Certains des résidus de FhuA impliqués dans la reconnaissance et le transport du ferrichrome ou de la colicine M ont été identifiés (Carmel and Coulton, 1991). Les délétions des résidus 21 à 128, résidus 169 à 195 et résidus 406 à 417 réduisent la sensibilité des souches à la colicine M mais n'affectent pas le transport du ferrichrome. Seule la délétion des aa 196 à 405 affecte le transport de la totalité des ligands qui se fixent sur FhuA. Il semblerait donc que les sites de reconnaissance de FhuA pour ces ligands soient différents pour chacun d'entre eux.

En plus du récepteur FhuA, le complexe ferrichrome-fer peut aussi être reconnu et transporté par FhuE (le récepteur des coprogènes) (Matzanke et al., 1984).



**Figure 34 : Structure aux rayons X de FhuA**

A : FhuA ; B : FhuA-ferrichrome; C : FhuA-TonB ; D : FhuA-Albomycine.

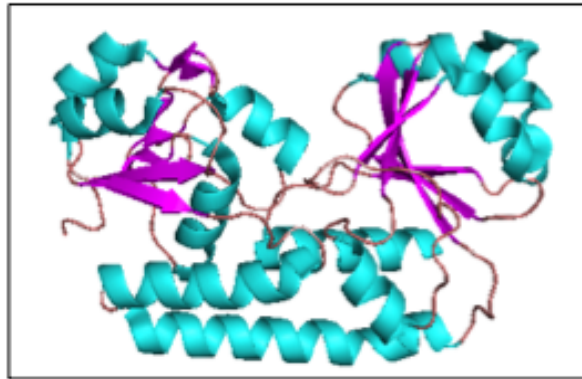
I : Structure de FhuA orientée parallèlement à la membrane externe. Le tonneau est représenté en vert, le bouchon en bleu. Pour la structure avec TonB, la boîte TonB est représentée en orange et l'extrémité C-terminale de TonB est représentée en fushia.

II : Vue du dessus des récepteurs à partir du milieu extracellulaire.

## B. Transport à travers la membrane interne et dissociation

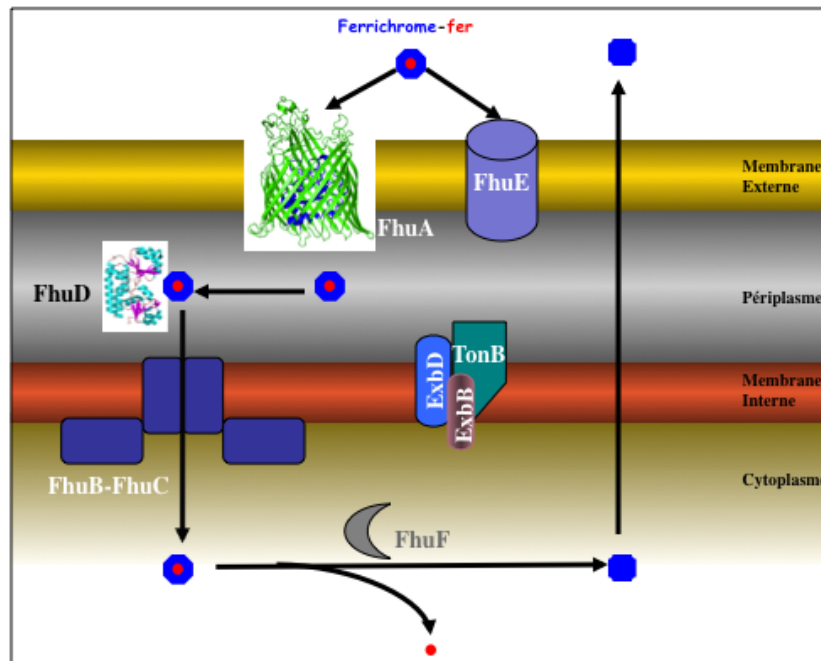
Après transport du desferrichrome par FhuA ou FhuE, celui-ci est pris en charge au niveau du périplasma par la protéine périplasmique FhuD (Clarke et al., 2002a; Koster and Braun, 1990)(Figure 35) associée à un transporteur ABC FhuB-C (Figure 36) (Coulton et al., 1987; Fecker and Braun, 1983). La protéine FhuD présente une structure en forme de haricot (Clarke et al., 2002a). Elle est capable d'interagir avec TonB et formerait un complexe ternaire FhuA-TonB-FhuD (Carter et al., 2006). Cette interaction permettrait le passage du complexe ferrichrome-fer de FhuA à FhuD. Des études de mutagénèse dirigées sur la protéine FhuD ont permis d'identifier certains résidus impliqués dans la liaison du ferrichrome (Clarke et al., 2002b). Le complexe est ensuite amené au transporteur ABC qui permet le passage à travers la membrane interne.

Dans le cytoplasme, le complexe ferrichrome-fer est dissocié par réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  accompagnée d'une acétylation du ferrichrome (Hartman and Braun, 1980). La dissociation du complexe est en partie effectuée par la protéine FhuF qui est une réductase cytoplasmique comprenant d'un noyau fer-souffre (2Fe-2S) (Matzanke et al., 2004). Le sidérophore acétylé est recyclé dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore inconnu (Figure 36) (Hartman and Braun, 1980).



**Figure 35 : Structure aux rayons X de la protéine FhuD (d'après Clarke et al., 2002a)**

Sont représentées en bleus les hélices  $\alpha$  et en mauves les brins  $\beta$ . Contrairement à d'autres protéines périplasmiques, FhuD possède deux domaines connectés par une longue hélice  $\alpha$ . Le site de liaison est situé entre ces deux domaines.



**Figure 36 : La voie desferrichrome chez *E. coli***

Après chélation du fer dans le milieu extracellulaire, le complexe est reconnu par deux protéines de membrane externe : FhuA qui est le récepteur principal et FhuE qui est un récepteur secondaire. L'énergie nécessaire au transport à travers ces deux récepteurs est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Dans le périplasma, le complexe est pris en charge par la protéine affine FhuD associée au transporteur ABC composé des protéines FhuC-FhuB. La dissociation du ferrichrome dans le cytoplasme implique une réduction du fer par FhuF et une acétylation du desferrichrome. Le desferrichrome ainsi libéré est recyclé dans le milieu extracellulaire.



**Chapitre 4 :**  
**Rôle de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la voie Pvd :**  
**- Sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée**  
**- Contrôle de la spécificité du métal transporté par la voie**  
**Pvd**  
(Article 1 et 2)





## **Article 1**

**Implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion  
de la Pvd nouvellement synthétisée**

**An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized  
siderophore by *Pseudomonas aeruginosa***

Mélissa Hannauer, Emilie Yétérián, Lois W. Martin, Iain L. Lamont, Isabelle J.  
Schalk



## I. Introduction de l'article 1

Notre équipe ainsi que l'équipe de P. Visca ont montré en parallèle que la pompe PvdRT-OpmQ était impliquée dans la sécrétion de la Pvd du périplasma vers le milieu extracellulaire après transport du fer dans la bactérie et dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasma (Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010). L'équipe de P. Visca dans le même article (Imperi et al., 2009) prétendait que cette pompe à efflux n'était pas impliquée dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée. En effet, la mutation de cette pompe n'affecte pas dramatiquement la sécrétion de la Pvd néosynthétisée (Poole et al., 1993a). PvdRT-OpmQ se trouvant être l'unique pompe dans le locus *pvd*, nous trouvons surprenant qu'elle ne soit pas impliquée dans la sécrétion de la Pvd néosynthétisée. De plus, l'équipe de P. Visca, pour cette étude, n'avait pas effectué une délétion complète des gènes correspondant à la pompe, mais uniquement une délétion du gène *pvdR*. De ce fait, nous pensions qu'il était important de réexaminer le rôle de PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la Pvd néosynthétisée.

Afin de dissocier la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée de la sécrétion de la Pvd venant de transporter du fer, nous avons utilisé les mutants PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRT-opmQ* et PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRT-opmQ*. Ces mutants sont délétés pour les gènes *fpvA* et *fpvB* codant pour les transporteurs de membrane externe du complexe Pvd-Fe. Ces souches peuvent synthétiser de la Pvd, mais ne peuvent pas acquérir du fer par ce sidérophore.





## An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*

Mélissa Hannauer<sup>a</sup>, Emilie Yeterian<sup>a</sup>, Lois W. Martin<sup>b</sup>, Iain L. Lamont<sup>b,\*</sup>, Isabelle J. Schalk<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Métaux et Microorganismes: Chimie, Biologie et Applications, FRE 3211, ESBS, Blvd Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, University of Otago, P.O. Box 56, Dunedin 9054, New Zealand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 September 2010

Revised 20 October 2010

Accepted 21 October 2010

Available online 28 October 2010

Edited by Renee Tsolis

#### Keywords:

Siderophore

Efflux pump

Metal trafficking

Iron transport

Secretion

*Pseudomonas aeruginosa*

### ABSTRACT

***Pseudomonas aeruginosa* secretes the fluorescent siderophore, pyoverdine (PVD), to enable iron acquisition. Epifluorescence microscopy and cellular fractionation were used to investigate the role of an efflux pump, PvdRT-OpmQ, in PVD secretion. Bacteria lacking this efflux pump accumulated PVD, or a fluorescent precursor, in the periplasm, due to their inability to efficiently secrete into the media newly synthesized PVD. PvdRT-OpmQ is only the second system identified for secretion of newly synthesized siderophores by Gram negative bacteria.**

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

To obtain iron, many microorganisms secrete high-affinity iron-chelating molecules termed siderophores that form very stable soluble complexes with Fe<sup>3+</sup> ions. Fluorescent *Pseudomonads* produce fluorescent siderophores called pyoverdines (PVDs) that 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 strain-specific peptide comprising 6–12 amino acids bound to the carboxylic group of the chromophore and a dicarboxylic acid, amide or  $\alpha$ -ketoglutaric acid attached to position C-3 of the chromophore [1–3]. PVD-synthesis and iron uptake is best understood in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1, which produces a PVD called PVDI [4]. When loaded with iron, PVDI-Fe is translocated across the outer membrane by a specific transporter FpvA [5]. FpvB, a second outer membrane transporter for PVDI-Fe, has also been described but its exact role in iron acquisition has not been elucidated [6].

PVDI synthesis begins with the assembly in the cytoplasm of a non-fluorescent precursor [7]. This precursor is transported across the inner membrane into the periplasm where further steps of PVDI synthesis occur leading to formation of the chromophore that confers fluorescence to the siderophore [8]. Fluorescent microscopy and chemical analyzes indicated that PVDI or a fluorescent precursor is stored in the periplasm prior to secretion [8].

The mechanisms of export of siderophores across the outer membrane of Gram negative bacteria are not well understood. So far as we are aware, the only example of siderophore export for which all the components have been identified is for enterobactin in *Escherichia coli*, which is transported into the periplasm by EntS [9] and secreted across the outer membrane in a process involving TolC [10]. In *P. aeruginosa*, the *pvdRTopmQ* genes encode an efflux pump that is involved in recycling of PVDI into the extracellular medium following uptake of PVDI-Fe and release of iron in the periplasm [11–13]. This efflux pump is predicted to have the same organization as other bacterial efflux pumps [14,15] with PvdT predicted to be an inner membrane protein, PvdR a periplasmic adaptor protein and OpmQ an outer membrane protein with a  $\beta$ -barrel domain inserted in the outer membrane and a large periplasmic extension. However, mutations of *pvdRTopmQ* do not prevent secretion of newly synthesized PVDI [12,13,16,17]. Another efflux pump (MexAB-OprM) has also been suggested to be involved in PVDI secretion [18] though recent research shows that this is unlikely to be the case

Abbreviations: PVD, pyoverdine; PVDI, PVD produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1

\* Corresponding authors. Fax: +64 3 479 7866 (I.L. Lamont), +33 3 68 85 48 29 (I.J. Schalk).

E-mail addresses: [iain.lamont@otago.ac.nz](mailto:iain.lamont@otago.ac.nz) (I.L. Lamont), [isabelle.schalk@unistra.fr](mailto:isabelle.schalk@unistra.fr) (I.J. Schalk).

[12]. The mechanism of export of newly synthesized PVDI across the outer membrane is therefore not understood. Here we have reinvestigated the involvement of PvdRT-OpmQ in PVDI secretion and show that PvdRT-OpmQ is involved in secretion of newly synthesized PVDI as well as recycling of PVDI that has transported iron.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Chemicals were purchased from Sigma unless otherwise stated. PVDI was prepared as described previously [19,20].

### 2.2. 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).

### 2.3. Genetic manipulations

Strain *P. aeruginosa* PAO1*fpvApvdRTopmQ* was engineered by allele replacement of the wild-type *pvdRTopmQ* locus in PAO1*fpvA* using the deletion plasmid pEXTc::Δ*pvdRTopmQ*, as described previously [13]. Mutation of *fpvB* in PAO1*fpvA* and PAO1*fpvApvdRTopmQ* was carried out using methods described previously for targeted gene deletion in *P. aeruginosa* [13,21]. Briefly, PCR fragments flanking *fpvB* were amplified using the primer pairs 5'-CGCAAGCTTGAAGTTGGAGACGCCGATCC-3'/5'-CGCCTGCAGTGTCTGGATGGCG-3' and 5'-CGCCTGCAGGGACGCCGGCTGC-3'/5'-CGCGGATCCGGAGGCCGGCGAAG-3' (introduced restriction sites shown in bold), joined together via the introduced *Pst*I restriction sites and cloned into pEXGm. Sequencing of the resulting plasmid pEXGm::Δ*fpvB* ensured the absence of any unintended mutations. A kanamycin resistance cassette from pNRE1 [22] was cloned into the unique *Pst*I site in pEXGm::Δ*fpvB*, giving rise to pEXGm::Δ*fpvB*::Km. This was then used for allele replacement in *P. aeruginosa*, resulting in deletion of the *fpvB* gene.

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

Strain/plasmid	Genotype/phenotype	Reference
<i>Strains of P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type	Laboratory stock; [27]
PAO1 <i>pvdR</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	[13]
PAO1 <i>pvdT</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	[13]
PAO1 <i>opmQ</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	[13]
PAO1 <i>pvdRTopmQ</i>	Pvd <sup>+</sup> ; mutant efflux pump	[13]
K1119	<i>mexAmexB</i> mutant	[28]
PAO1 <i>fpvA</i>	FpvA <sup>-</sup>	[29]
PAO1 <i>fpvAfpvB</i>	FpvA <sup>-</sup> FpvB <sup>-</sup>	This study
PAO1 <i>fpvApvdRTopmQ</i>	FpvA <sup>-</sup> ; mutant efflux pump	This study
PAO1 <i>fpvAfpvBpvdRTopmQ</i>	FpvA <sup>-</sup> FpvB <sup>-</sup> ; mutant efflux pump	This study
<i>Plasmids</i>		
pEX18Gm	Allele replacement vector; Gm <sup>R</sup>	[21]
pJSS2	<i>fpvA</i> (PA2398) deletion plasmid; Tc <sup>R</sup>	[30]
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>	[31]
pUCP22::pvdRTopmQ	pUCP22 carrying the <i>pvdRTopmQ</i> operon	[13]

### 2.4. Image acquisition and fluorescence spectroscopy

Exponential phase cells grown overnight in succinate medium were mounted onto S750-agarose coated slides, as described previously [8]. Images were acquired on a Nikon 50i (objective: CFI Achromplan 100× A ON 1.25 DT 0.18) microscope with a numeric 12 bits DS-Fi1 camera. Images were captured using imaging software NIS elements. Fluorescence experiments were carried out using a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrofluorometer. The excitation wavelength (λ<sub>exc</sub>) was set at 400 nm, and the emission of fluorescence (λ<sub>em</sub>) was measured at 447 nm.

### 2.5. Cell fractionation

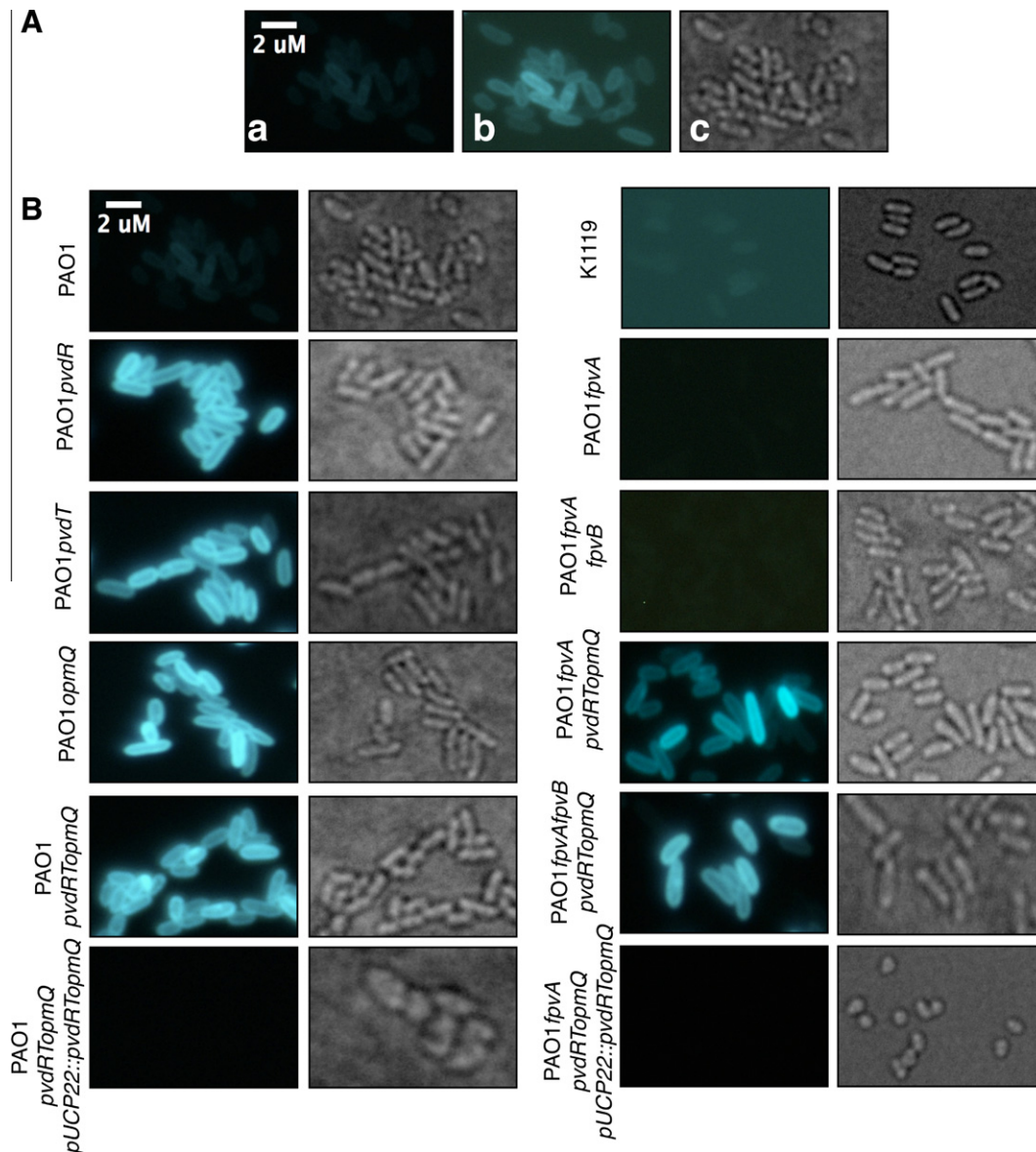
Periplasmic and cytoplasmic fractions were prepared from 2.5 × 10<sup>10</sup> bacteria (25 ml of OD<sub>600 nm</sub> of 1) of an overnight culture as described previously [23].

## 3. Results

### 3.1. PvdRT-OpmQ deletion mutants accumulate newly synthesized PVDI in the periplasm

Cells of *P. aeruginosa* PAO1 have peripheral fluorescence due to the presence of PVDI in the periplasm [8]. This fluorescence can be visualized by epifluorescence microscopy following high energy excitation of living bacteria and quantified following cellular fractionation [8,12,13]. Deletion of *pvdRT-opmQ* or of any one of the genes encoding this efflux pump resulted in an increase in periplasmic fluorescence compared to wild-type bacteria (*P. aeruginosa* PAO1) (Fig. 1A). This fluorescence, corresponding to that of PVDI, could be visualised in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants, but not wild-type bacteria, following low energy excitation in conjunction with epifluorescence microscopy (Fig. 1). However, fluorescence could be observed in the periplasm of wild-type strain PAO1 following high energy excitation (Fig. 1A) as reported previously [8]. These observations indicate a higher amount of fluorescent siderophore in the periplasm of efflux pump mutants than in strain PAO1. This observation was confirmed by cellular fractionation with more fluorescence present in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants (Fig. 2A). Complementation with pUCP22::pvdRTopmQ restored periplasmic fluorescence to wild-type levels (Figs. 1 and 2). Small amounts of fluorescence (5% of that found in the periplasm) were detected in the cytoplasm (Fig. 2A), most likely due to contamination from the periplasm during cellular fractionation [8]. All these data suggest that in the *pvdRTopmQ* deletion mutants the siderophore accumulates in the periplasm instead of being secreted into the extracellular medium. Mutation of MexAB-OprM, which has been described previously as being involved in PVDI secretion [18], gave no increase of fluorescent siderophore in the periplasm (Fig. 2), suggesting that this efflux pump is not involved in PVDI secretion.

The fluorescence in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants could have arisen from PVDI that had transported iron into the cells via the ferripyoverdine receptors FpvA or FpvB but could not be recycled into the extracellular medium, as described previously [12,13], or could result from accumulation of newly synthesized PVDI (or a fluorescent precursor) that was not secreted. In order to distinguish between these possibilities, the experiment was repeated with strains unable to take up PVDI-Fe. Two PVDI-Fe outer membrane transporters have been described, FpvA and FpvB [6,24] although in our experimental growth conditions PVDI-Fe is only transported by FpvA (unpublished data). Deletion of *pvdRTopmQ* resulted in the accumulation of fluorescence in the periplasm in strains lacking *fpvA* and *fpvB* as shown by both epifluorescence microscopy and cellular fractionation (Figs. 1B and 2B). This



**Fig. 1.** Epifluorescence microscopy. (A) The experiment was carried out with PAO1 cells. Pictures a and b were taken with Ex 400–440 HQ, Em 470 HQ, Dc 455 (filter specification) and picture c was taken with light microscopy (white bar = 2  $\mu$ m). An eight-fold higher excitation intensity was used in picture b compared to picture a. At high excitation intensity, the fluorescence present in the periplasm of PAO1 can be visualized; this energy saturates the periplasmic fluorescence for the *pvdRTopmQ* mutants (data not shown). At lower energy, fluorescence is not visible in PAO1 (panel B and picture a in panel A), but is clearly present in the periplasm of *pvdRTopmQ* mutants (pictures in panel B). (B) For each pair of images the left picture was taken with Ex 400–440 HQ, Em 470 HQ, Dc 455 (filter specification) and the right one taken with light microscopy (white bar = 2  $\mu$ m). All images in part B were acquired at an excitation intensity equivalent to that used for (A) picture (a). Images were obtained for three independent cultures for all strains and representative images are shown.

accumulation is lower than for strains expressing *fpvA* and *fpvB* because of lower PVDI production by these mutants – FpvA is required for maximal PVDI production due to its role in a signal-transduction pathway that controls siderophore synthesis [25]. Strains lacking FpvA and FpvB cannot import PVDI-Fe and so the fluorescence that accumulates in the periplasm in the absence of PvdRT-OpmQ is due to newly synthesized PVDI.

### 3.2. Absence of PvdRT-OpmQ affects the kinetics of PVDI synthesis

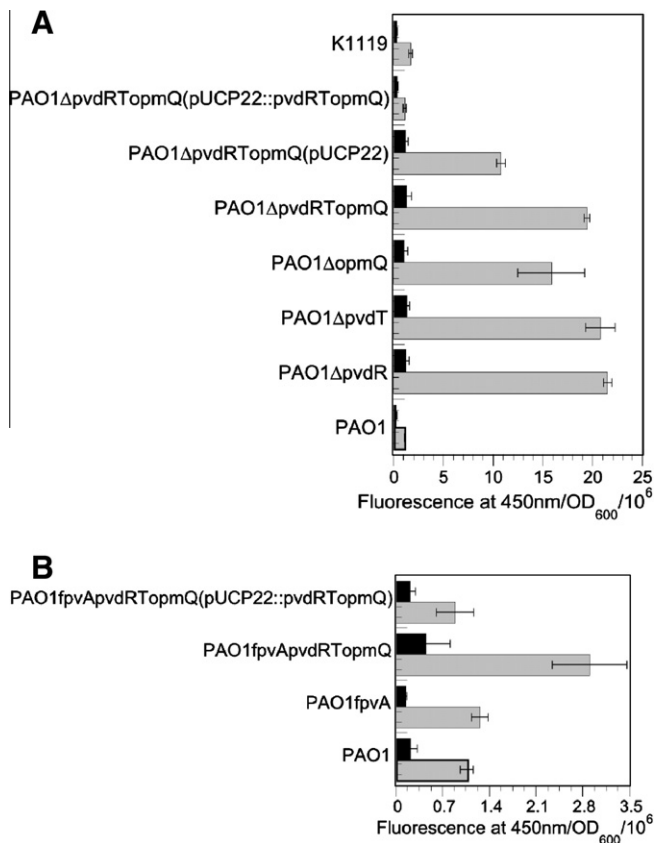
PVDI synthesis starts in the cytoplasm and ends with chromophore formation in the periplasm [8]. The kinetics of formation of the PVDI chromophore can be followed by monitoring fluorescence produced by living cells [8] and this was done for stationary phase cells that had been resuspended in succinate medium (Fig. 3A). Over the course of the experiment, fluorescence increased in a linear

manner for wild-type strain PAO1, showing that synthesis of PVDI is continuous. Mutation of *pvdRTopmQ* decreased the rate of PVDI production, and PVDI production was only partially restored when the mutation was complemented. Reduced PVDI synthesis in the *pvdRTopmQ* mutant only occurred in the lag phase of the culture. Once the cells started to grow PVDI production and secretion was not affected by the absence of PvdRT-OpmQ (Fig. 3B) as reported previously [12,13,16,17]. Mutation of *mexAmexB* did not affect PVDI synthesis (Fig. 3A), indicating again that this pump is not directly involved in PVDI secretion.

## 4. Discussion

*P. aeruginosa* secretes into the extracellular medium both newly synthesized PVDI and recycled PVDI that has already transported

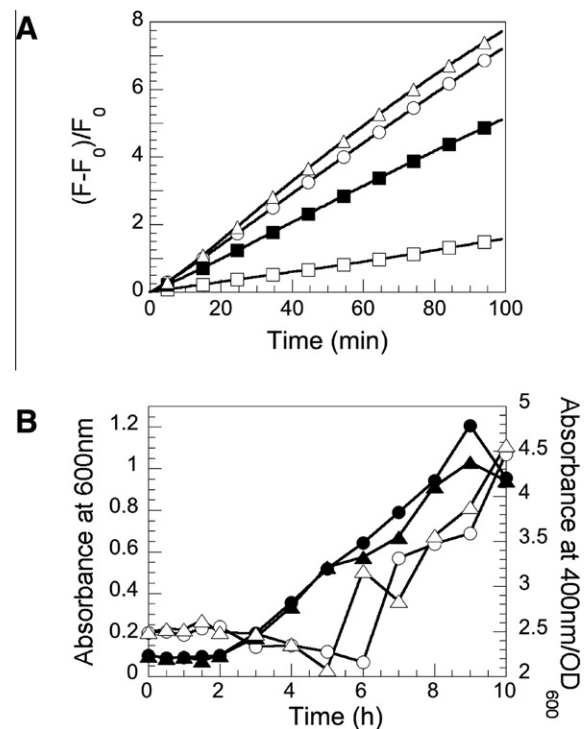




**Fig. 2.** Fluorescence in cytoplasmic and periplasmic fractions. Periplasmic and cytoplasmic fractions were prepared as described previously [23] from  $2.5 \times 10^{10}$  bacteria for each strain, after overnight culture. Samples were excited at 400 nm and the fluorescence was monitored at 447 nm. The amount of 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, grey bars.

iron ions into the bacterial periplasm [11,26]. Recycling of PVDI after iron transport involves the efflux pump PvdRT-OpmQ [12,13] with mutation of this pump completely abolishing PVDI recycling. The involvement of PvdRT-OpmQ in the secretion of newly synthesized PVDI was less clear. Production of PVDI by *P. aeruginosa* gives a characteristic yellow-green color to the cultures and this is reduced but not prevented by mutation of *pvdRTopmQ* [16,17]. Furthermore, using cellular fractionation with strains unable to take up PVDI-Fe (*fpvA* mutants). Imperi et al. concluded that PvdRT-OpmQ was not involved in secretion of newly synthesized PVDI [12]. Nonetheless an efflux pump that can export recycled PVDI, and the genes for which are co-expressed and co-localised with PVDI synthesis genes [16,17], seemed a strong candidate for secretion of newly synthesized PVDI, prompting us to revisit this issue.

Using *fpvA* and *fpvB* mutants, cellular fractionation and epifluorescence microscopy, we observed accumulation of fluorescence corresponding to newly synthesized PVDI in the periplasm of cells lacking PvdRT-OpmQ. This accumulation was very clearly observed by fluorescence microscopy (Fig. 1B) with the periplasm of strains PAO1fpvApvdRTopmQ and PAO1fpvAfpvBpvdRTopmQ being clearly more fluorescent than the corresponding receptor mutant strains in which the efflux pump was functional. Consistent with this, cellular fractionation gave a 2.3-fold increase of periplasmic fluorescence for PAO1fpvApvdRTopmQ compared to PAO1fpvA or PAO1 (Fig. 2B); despite repeated attempts, we were unable to obtain periplasmic fractions for strain PAO1fpvAfpvBpvdRTopmQ due to



**Fig. 3.** (A) Kinetic of *in vivo* PVDI production. Strains PAO1 (○), PAO1pvdRTopmQ (□), PAO1pvdRTopmQ (pUCP22::pvdRTopmQ) (■) and K1119 (△) were grown overnight in succinate medium, collected at stationary phase, resuspended in fresh medium to OD<sub>600 nm</sub> of 0.05 and incubated at 37 °C. The total fluorescence was measured for 2 h at 450 nm (excitation at 400 nm). (B) Strains PAO1 and PAO1pvdRTopmQ were diluted in succinate medium at an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1 at 37 °C. Bacterial growth and PVDI production were monitored at 600 nm (PAO1, ● and PAO1pvdRTopmQ, ▲) and 400 nm (PAO1, ○ and PAO1pvdRTopmQ, △), respectively. In this experiment the production of PVDI was large and so absorbance at 400 nm was used in place of fluorescence detection to measure the amount of PVDI.

cell lysis. These findings are in contradiction with the earlier conclusion that PvdRTopmQ is only involved in recycling of PVDI, and not secretion of newly synthesized PVDI [12]. This different conclusion may reflect the use of different growth media; different mutants, with strains PAO1fpvApvdRTopmQ and PAO1fpvAfpvBpvdRTopmQ used here lacking all of the efflux pump proteins, whereas strain PAO1fpvApvdR used previously lacks only the periplasmic part of the pump; and/or the fact that previously only the cellular fractionation approach, which is less direct than epifluorescence microscopy, was used. In our experimental conditions, 30% less PVDI was found in the extracellular medium for PAO1pvdRTopmQ overnight cultures compared to wild-type bacteria (data not shown) and a reduction of this amount may have been overlooked previously. The ability of bacteria lacking PvdRT-OpmQ to secrete PVDI, though less efficiently than wild-type cells, indicates the presence of at least one other system that can also secrete PVDI from the cells.

Absence of PvdRT-OpmQ also affected the kinetics of PVDI synthesis in stationary phase bacteria (Fig. 3), indicating a link between PVDI production and the presence of this efflux pump. This inhibition is observed in cells in stationary phase but not in exponential phase, so that the decrease in PVDI synthesis is most likely due to accumulation of PVDI in the periplasm of the PvdRT-OpmQ mutants. This excess PVDI might interact with the periplasmic biosynthetic enzymes and block their activity.

In conclusion, all our data indicate that the PvdRT-OpmQ system not only enables recycling of PVDI but also is normally responsible for export of newly synthesized PVDI after the final steps of biosynthesis have taken place in the periplasm. In the absence of



this efflux system, PVDI accumulates in the periplasm although another efflux system can carry out secretion.

## Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), a grant from the ANR (Agence Nationale de la Recherche, No. ANR-08-BLAN-0315-01). M. Hannauer and E. Yeterian had fellowships from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie.

## References

- [1] 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.
- [2] Budzikiewicz, H. (1997) Siderophores of fluorescent *pseudomonads*. *Z. Naturforsch. [C]* 52, 713–720.
- [3] Budzikiewicz, H. (2004) Siderophores of the *Pseudomonadaceae sensu stricto* (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 87, 81–237.
- [4] 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 (Pt. 1), 35–43.
- [5] 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.
- [6] 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* 150, 1671–1680.
- [7] Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15, 22–30.
- [8] Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* 38, 1447–1459.
- [9] 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.
- [10] 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*. *J. Bacteriol.* 187, 6701–6707.
- [11] 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.
- [12] Imperi, F., Tiburzi, F. and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20440–20445.
- [13] Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 412–418.
- [14] Li, X.Z. and Nikaido, H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623.
- [15] Nikaido, H. and Takatsuka, Y. (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 769–781.
- [16] Lamont, I.L. and Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149, 833–842.
- [17] 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.
- [18] Poole, K., Heinrichs, D.E. and Neshat, S. (1993) 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Markie, D., Hill, D.F. and Poulter, R.T.M. (1986) The construction of a modified drug resistance cassette. *Proc. Otago Med. School* 64, 69–70.
- [23] Voulhoux, R., Filloux, A. and Schalk, I.J. (2006) Role of the TAT system in the pyoverdine-mediated iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 3317–3323.
- [24] Poole, K., Neshat, S., Krebes, 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.
- [25] 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7072–7077.
- [26] 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.
- [27] Stover, C.K. et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.
- [28] Li, X.Z., Zhang, L. and Poole, K. (1998) Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* 180, 2987–2991.
- [29] Shirley, M. and Lamont, I.L. (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191, 5634–5640.
- [30] Shen, J., Meldrum, A. and Poole, K. (2002) FpvA receptor involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184, 3268–3275.
- [31] 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.



## II. Discussion de l'article 1

Précédemment, en utilisant un mutant de délétion de la pompe PvdRT-OpmQ muté également pour la biosynthèse de la Pvd, nous avons pu montrer que cette pompe à efflux était impliquée dans la sécrétion du périplasme vers le milieu extracellulaire de la Pvd venant de transporter du fer dans la cellule bactérienne (Yeterian et al., 2010). Avec un mutant ne produisant pas de Pvd, nous nous affranchissions de la sécrétion de la Pvd néosynthétisée. Dans l'article n°1, nous nous sommes affranchi du recyclage de la Pvd venant de transporter du fer en utilisant un double mutant, délété pour le récepteur *fpvA* et pour la pompe *pvdRT-opmQ*. Un tel mutant produit beaucoup moins de Pvd qu'une souche sauvage. En l'absence de FpvA, la cascade de signalisation activant la production de Pvd ne peut être activée. L'observation des cellules au microscope à fluorescence et les expériences de fractionnement cellulaire ont clairement montré une accumulation de fluorescence dans le périplasme de ce mutant (Figure 1 et 2 de l'article 1). On observe une accumulation 2 à 3 fois plus importante dans le mutant PAO1*fpvApvdRTopmQ* par rapport à la souche PAO1*fpvA*. Cette accumulation ne peut être due qu'à de la Pvd néosynthétisée. La pompe à efflux PvdRT-OpmQ est donc bien impliquée dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée. Cette pompe à efflux prend en charge la Pvd à partir du périplasme afin de la sécréter dans le milieu extracellulaire. Comme pour le système d'efflux MacAB-TolC (Yamanaka et al., 2008), il existe probablement un passage entre la protéine de fusion PvdR et PvdT au niveau du périplasme qui permettrait à des substrats présent dans le périplasme d'être excrétés dans le milieu extracellulaire.

Malgré cette accumulation de sidérophore dans le périplasme, les mutants de la pompe PvdRT-OpmQ continuent à sécréter de la Pvd avec un taux 30 % inférieur à la souche sauvage. Ceci implique, qu'en absence de PvdRT-OpmQ, une autre pompe doit prendre le relais. En effet, le génome de *P. aeruginosa* contient une trentaine de gènes codant pour des pompes à efflux pouvant potentiellement prendre le relais. Pour l'instant, nous n'avons pas identifié cette pompe.

Il est également intéressant de remarquer, que pour des bactéries en phase stationnaire, l'absence de l'expression de la pompe PvdRT-OpmQ a un effet négatif sur la synthèse de la Pvd (Figure 3 de l'article 1). Très probablement la forte accumulation de Pvd ou de précurseur de Pvd dans le périplasme de tels mutants doit inhiber les enzymes de biosynthèse en bloquant les sites de liaisons.

PvdRT-OpmQ est le deuxième exemple de pompe à efflux impliquée dans la sécrétion de sidérophore décrit à ce jour. Le seul autre mécanisme identifié à ce jour est celui impliqué dans la sécrétion de l'entérobactine chez *E. coli*. Ce mécanisme implique tout d'abord un transporteur ABC, EntS, ancré dans la membrane interne permettant la sécrétion dans le périplasme (Furrer et al., 2002). L'entérobactine est ensuite sécrétée à travers la membrane externe par la protéine TolC (Bleuel et al., 2005).

Enfin, nous avons analysé par spectrométrie de masse la Pvd sécrétée dans le surnageant de culture du mutant PAO1*fpvApvdRT-opmQ* et l'avons comparé à celle retrouvée dans les surnageants d'une souche sauvage (Tableau 3). Cette étude a montré que la Pvd sécrétée par PAO1*fpvApvdRT-opmQ* possède une masse plus importante (masse de 1560 Da) que la Pvd (masse de 1333 Da). Ce précurseur n'est pas fluorescent et a de ce fait la partie chromophore non-formée. Ce même précurseur, qui a déjà été décrit précédemment au laboratoire pour le mutant PAO1*pvdQ*, peut chélater le fer et le transporter chez *P. aeruginosa* via le récepteur FpvA (Yeterian et al., 2009). PvdQ est une acylase présente dans le locus *pvd* et intervenant à la fois dans la biosynthèse de la Pvd et le clivage de molécules du quorum sensing (Bokhove et al., ; Huang et al., 2006; Sio et al., 2006).

La détermination de la structure du précurseur de la Pvd de poids moléculaire 1560 Da a été réalisée, en collaboration avec le laboratoire du Pr Budzikiewicz de l'université de Cologne. Cette molécule possède une chaîne grasse de 14 carbones greffée sur la sérine de la chaîne peptidique (Figure 37). Cette chaîne permet probablement d'ancrer la Pvd à la membrane durant la biosynthèse et serait hydrolysée par PvdQ avant la sécrétion de la molécule. Un tel ancrage du sidérophore évite sa diffusion dans le périplasme. Ce précurseur n'étant pas fluorescent, PvdQ serait impliquée dans des étapes précédant la cyclisation du chromophore et la sécrétion du sidérophore par PvdRT-OpmQ. L'acylase PvdQ semble avoir deux fonctions : elle interviendrait d'une part dans la biosynthèse de la Pvd en clivant la chaîne grasse pour permettre la sécrétion de la Pvd et d'autre part dans la régulation du quorum sensing en hydrolysant les AHLs. Nos résultats montrent de manière très surprenante, que l'absence conjointe de FpvA et de PvdRT-OpmQ conduit au même phénotype qu'une délétion de *pvdQ*, c'est-à-dire à la sécrétion d'un précurseur de la Pvd. Ceci nous conduit à émettre l'hypothèse que PvdRT-OpmQ et FpvA seraient peut-être associés aux dernières étapes de la biosynthèse de la Pvd en régulant l'activité de PvdQ. En absence conjointe de FpvA et PvdRT-OpmQ, PvdQ n'est plus activé, entraînant la sécrétion du précurseur de Pvd de poids moléculaire plus important.

Masse exacte des isoformes et des précurseurs de PVD

retrouvés dans les surnageants de culture

Souches	1333.592 Da	1334.621 Da	1363.599 Da	1558.837 Da	1560.854 Da
	Forme succinamide de PVD	Forme succinique de PVD	Forme $\alpha$ -Ketoglutarique de PVD	Précurseur de PVD	Précurseur de PVD
PAO1	<b>61 %</b>	0 %	<b>100 %</b>	0 %	0 %
PAO1 $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	<b>100 %</b>	0 %	<b>21 %</b>	0 %	0 %
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i>	0 %	<b>100 %</b>	<b>64 %</b>	0 %	0 %
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	0 %	<b>45 %</b>	0 %	<b>83 %</b>	<b>100 %</b>
PAO1 $\Delta$ <i>pvdQ</i>	0 %	0 %	0 %	<b>90 %</b>	<b>100 %</b>

Tableau 3 : Quantification relative de la Pvd et de ses précurseurs présents dans le surnageant de culture de PAO1, PAO1 $\Delta$ *pvdRTopmQ*, PAO1 $\Delta$ *fpvA*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *pvdRTopmQ* and PAO1 $\Delta$ *pvdQ*. Les pics les plus larges présents sur le chromatogramme correspondent à 100% et les autres valeurs sont calculées proportionnellement au pic majoritaire.

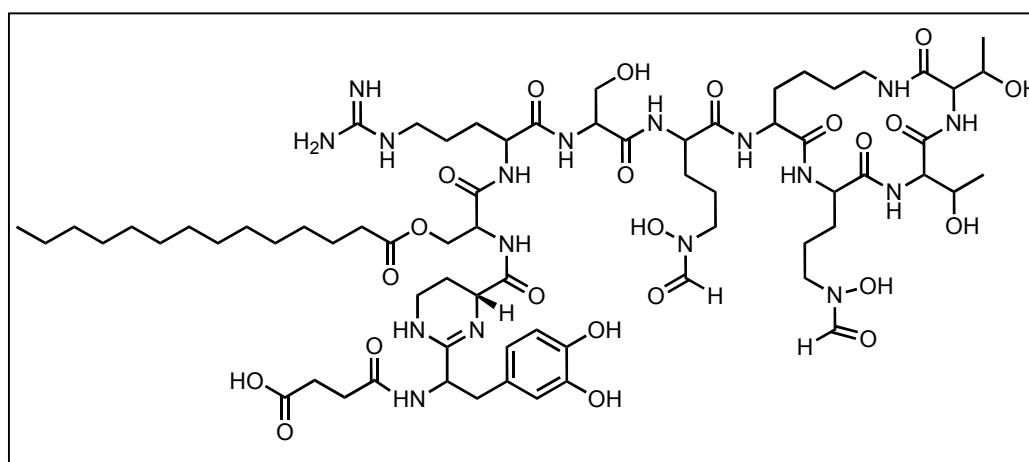


Figure 37 : Structure proposée du précurseur PvdQ (en collaboration avec le Pr Budzikiewicz).

La chaîne grasse est fixée à la sérine du précurseur de la Pvd dont le chromophore n'est pas encore cyclisé.



## **Article 2**

**Rôle de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans le contrôle la  
spécificité de la voie pyoverdine vis-à-vis des métaux chez  
*Pseudomonas aeruginosa***

**An efflux pump controls metal selectivity of iron uptake by  
pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa***

Mélissa Hannauer, Armelle Braud, Françoise Hoegy, Pascale Ronot, Anne  
Boos, Isabelle J. Schalk





## I. Introduction de l'article 2

Les métaux lourds sont des polluants ubiquitaires et persistants dans l'environnement. Ils sont responsables du phénomène de stress oxydatif et interfèrent dans le repliement et les fonctions des protéines. Les bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance face à ces métaux lourds. Parmi ces mécanismes, on trouve la séquestration de ces métaux sous forme de complexe, la réduction du métal en une forme moins toxique ou l'efflux de ces métaux dans le milieu extracellulaire (Nies, 1999; Nies and Silver, 1995; Nucifora et al., 1989). *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie très résistante aux xénobiotiques comme les antibiotiques, les solvants ou encore les métaux lourds. Cette grande résistance peut être attribuée à la faible perméabilité de la membrane externe mais aussi à la mise en place de différents mécanismes de résistance. On trouve par exemple l'opéron *ars* homologue à celui retrouvé chez *E. coli* qui réduit l' $As^{3+}$  en  $As^{5+}$  forme moins mobile et moins toxique. L' $As^{5+}$  est ensuite transporté à l'extérieur de la cellule par un système d'efflux spécifique (Cai et al., 1998). Les autres mécanismes de résistance majoritairement retrouvés sont ceux impliquant les pompes à efflux. On peut citer par exemple le système *cop* de *Pseudomonas syringae* qui est impliqué dans la résistance au cuivre. Il contient les gènes *copABCD*. *copB* et *copD* sont impliqués dans le transport à travers les membranes externes et internes et *copA* et *copC* sont des protéines chélatant le cuivre dans le périplasme afin de protéger la bactérie (Cooksey, 1994). Un autre mécanisme d'efflux connu est celui impliqué dans la résistance au cadmium, cobalt et zinc ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Co^{2+}$  : *czc*). Cette pompe à efflux qui appartient à la famille des RND (Resistance-Nodulation-Division) est codée par les gènes *czcCBA* (Hassan et al., 1999). CzcC possède des homologies de séquence avec les protéines de membrane externe impliquée dans l'efflux de différents métabolites ou antibiotique. CzcA serait la protéine de membrane interne et CzcB la protéine de fusion connectant CzcA et CzcC. Cette pompe utilise le gradient de proton pour transporter les métaux vers le milieu extracellulaire. Cet opéron est régulé par un système à deux composants CzcR et CzcS (Caille et al., 2007; Perron et al., 2004). Cette régulation à deux composants a un effet sur la résistance aux antibiotiques de type carbapénème. Il existe donc des résistances croisées entre métaux et antibiotiques (Perron et al., 2004).

Il a récemment été montré que la pompe à efflux ATP dépendante (PvdRT-OpmQ) est impliquée dans le recyclage de la Pvd après dissociation du complexe Pvd-Fe (Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010). De précédentes études effectuées au laboratoire sur *P.*

*aeruginosa* ont aussi montré que la Pvd était capable de chélater  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (Braud et al., 2009b). Et que ces différents complexes de Pvd-métaux pouvaient interagir avec FpvA en inhibant plus ou moins le transport du fer via la Pvd (Braud et al., 2009b). Des dosages par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectra) de métaux accumulés dans *P. aeruginosa* par la voie Pvd, indiquent que le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Fe}^{3+}$ , le  $\text{Ga}^{3+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$  et le  $\text{Ni}^{2+}$  seraient transportés par le système FpvA/Pvd (Braud et al., 2009b). En effet, ces métaux, sauf le  $\text{Ga}^{3+}$ , sont dits biologiques car ils interviennent dans différents processus comme la respiration ou certaines réactions enzymatique. Le  $\text{Ga}^{3+}$  s'accumule car il possède la même coordination et la même taille que le fer. La quantité accumulée de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  (0,4  $\mu\text{mol metal/g}$  pour  $\text{Ga}^{3+}$ , 0,2  $\mu\text{mol metal/g}$  pour  $\text{Mn}^{2+}$ , 0,076  $\mu\text{mol metal/g}$  pour  $\text{Cu}^{2+}$  et 0,066  $\mu\text{mol metal/g}$  pour  $\text{Ni}^{2+}$ ) est tout de même inférieure au  $\text{Fe}^{3+}$ . Rien n'est connu des mécanismes qui régulent la sélectivité vis-à-vis du fer des voies de transport bactérien utilisant des sidérophores. Il est communément admis mais sans aucune preuve que cette régulation s'effectue au niveau du récepteur de sidérophore localisé dans la membrane interne : ce dernier ne transportait que les complexes siderophores-fer. Nous nous sommes intéressés à cette problématique avec l'hypothèse que cette régulation de la sélectivité vis-à-vis du métal transporté et accumulé dans la cellule bactérienne par le système FpvA/Pvd était contrôlé soit par FpvA soit par la pompe PvdRT-OpmQ. Dans ce dernier cas, FpvA ne ferait pas la différence entre Pvd-Fe et d'autres complexes Pvd-métaux et de ce fait transporterait différents complexes Pvd-métaux. Les complexes indésirés par la bactérie seraient ensuite réexcrétés par la pompe PvdRT-OpmQ. Cette étude d'écrite dans l'article 2 est la première étude des mécanismes moléculaires contrôlant la sélectivité d'une voie d'acquisition du fer par des sidérophores décrite dans la littérature.

**An efflux pump controls metal selectivity of iron uptake by pyoverdine in**  
*Pseudomonas aeruginosa*

Mélissa Hannauer<sup>1</sup>, Armelle Braud<sup>1</sup>, Françoise Hoegy<sup>1</sup>, Pascale Ronot<sup>2</sup>, Anne Boos<sup>2</sup>, Isabelle  
J. Schalk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR7242, Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Blvd Sébastien Brant,  
F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

<sup>2</sup>Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178, CNRS-ECPM-Université de  
Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex, France

Corresponding author: Isabelle J. Schalk, UMR7242, ESBS, Blvd Sébastien Brant, BP 10412,  
F-67413 Illkirch, Strasbourg, France. Tel: 33 3 68 85 47 19; Fax: 33 3 68 85 48 29; E-mail:  
[isabelle.schalk@unistra.fr](mailto:isabelle.schalk@unistra.fr)

Running title: Metal selectivity of iron uptake pathways

## **ABSTRACT**

Pyoverdine (PVD) is the major siderophore produced by *Pseudomonas aeruginosa* for iron acquisition. PvdRT-OpmQ is an ATP-dependent efflux pump involved in the secretion of newly synthesized pyoverdine (PVD) and of PVD that has transported and released iron into the bacterium. This iron uptake pathway also involves an outer membrane transporter, FpvA, for PVD-Fe uptake from the extracellular medium into the periplasm. In binding assays, FpvA bound PVD in complex with many different metals, with affinities from 2.9 nM for PVD-Fe to 13  $\mu$ M for PVD-Al. Uptake assays with various FpvA and PvdRT-OpmQ mutants, monitored by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for metal detection, and by fluorescence for PVD detection, showed that FpvA has a broad metal specificity for both the binding and uptake of PVD-metal complexes, and that the PvdRT-OpmQ efflux pump exports all unwanted Pvd-metal complexes from the bacterium. PvdRT-OpmQ has a key role in the control of the iron specificity of the Pvd pathway. This study provides the first evidence into the molecular mechanisms controlling the metal selectivity of siderophore-mediated iron uptake pathways.

## INTRODUCTION

To get access to iron, bacteria produce and release in their environment siderophores (Chu et al., 2010; Hider and Kong, 2010), which are small molecules (MW between 200 and 2000 Da) characterized by an extremely high affinity for iron. More than 500 different siderophore structures have been described to date. Microorganisms in the rhizosphere produce siderophores at concentrations that have been estimated somewhere between the micromolar and the millimolar range. Bacteria also produce these compounds during infection, to allow them to acquire iron from the host; siderophores are therefore considered to be virulence factors (Lamont et al., 2009; Taguchi et al., ; Takase et al., 2000). Once the iron in the extracellular medium has been chelated, the resulting ferrisiderophore complex is transported into the bacterium via specific membrane transporters. Pyoverdine (PVD) is the principal siderophore produced by the opportunist pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Schalk, 2008). PVD is a partly cyclic octapeptide linked to a chromophore derived from 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, which renders the siderophore both colored and fluorescent (Demange et al., 1990; Wasielewski et al., 2002). PVD synthesis begins in the bacterial cytoplasm, with the assembly of a non fluorescent precursor by non ribosomic peptide synthetases (NRPSs) (Visca et al., 2007), and ends in the periplasm with cyclization of the chromophore moiety (Yeterian et al., 2010a). The non fluorescent precursor is transported across the inner membrane into the periplasm, probably by the ABC transporter PvdE (Yeterian et al., 2010a), and the PVD subsequently produced is transported across the outer membrane and released into the extracellular medium by the ATP-dependent PvdRT-OpmQ efflux system (Hannauer et al., 2010). This efflux pump thought to display an organization similar to that of other bacterial efflux pumps (Li and Nikaido, 2009; Nikaido and Takatsuka, 2009), with PvdT predicted to be an inner membrane protein, PvdR a periplasmic adaptor

protein and OpmQ an outer membrane protein with a porin-like  $\beta$ -barrel and a large periplasmic extension. PvdRT-OpmQ is only the second siderophore efflux system to be described. The other system characterized is that for enterobactin in *E. coli*, which is transported into the periplasm by EntS (Furrer et al., 2002) and secreted across the outer membrane in a process involving TolC.

Once iron has been chelated in the extracellular medium, the ferriPVD complex is transported back across the outer membrane by its specific receptor, FpvA (Schalk et al., 2001; Schalk et al., 1999). This protein, like all siderophore outer membrane transporters, consists of a C-terminal  $\beta$ -barrel occluded by a globular domain known as the plug (Cobessi et al., 2005; Schalk et al., 2009). The ferrisiderophore binding site is located in the lumen, on the extracellular face of the transporter, and consists of residues from the barrel and plug domains. This binding site is highly specific for the siderophore PVD, with an affinity of 0.5 nM (Greenwald et al., 2009; Schalk et al., 2001; Schons et al., 2005). The mechanism of ferrisiderophore translocation is unknown, but it probably involves the partial removal and unfolding of the plug domain into the periplasm (Gumbart et al., 2007; Nader et al., 2011). The energy required is provided by the proton motive force of the inner membrane, via the inner membrane TonB-ExbB-ExbD complex, which interacts with FpvA in the periplasm (Adams et al., 2006; Nader et al., 2011). Iron is released from PVD in the periplasm, via a mechanism that probably involves iron reduction and no chemical modification or degradation of PVD (Greenwald et al., 2007; Schalk et al., 2002). Iron-free PVD is then recycled from the periplasm to the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ efflux system, like newly synthesized PVD (Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010b).

Bacterial siderophores can chelate many different metals, but only iron is transported efficiently into the bacterium. This has been demonstrated for the PVD pathway in *P. aeruginosa* by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Braud

et al., 2009b): only  $\text{Fe}^{3+}$  was found to accumulate efficiently (2.8  $\mu\text{mol metal/g}$  of cells), with  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  also transported, but in smaller amounts (0.4  $\mu\text{mol metal/g}$  for  $\text{Ga}^{3+}$ , 0.2  $\mu\text{mol metal/g}$  for  $\text{Mn}^{2+}$ , 0.076  $\mu\text{mol metal/g}$  for  $\text{Cu}^{2+}$ , and 0.066  $\mu\text{mol metal/g}$  for  $\text{Ni}^{2+}$ ). No accumulation of toxic metals, such as  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$ , was observed. Nothing is known about the molecular mechanism underlying selection of the metal transported by siderophore pathways, although it has been speculated that the siderophore outer membrane transporters may allow only ferrisiderophore complexes into the periplasm.

In this study, we investigated the molecular mechanism involved in the metal specificity of the PVD pathway by an approach based on a different hypothesis. Our working idea was that the ferrisiderophore outer membrane transporter FpvA might have broad metal specificity for uptake, thus transporting a large variety of PVD-metal complexes into the periplasm, with all the unwanted PVD-metal complexes then expelled from the periplasm by PvdRT-OpmQ, and only PVD-Fe accumulating efficiently. In this scenario, PvdRT-OpmQ, which has already been implicated in the secretion of newly synthesized PVD and the recycling of PVD after iron transport, may also sort unwanted toxic PVD-metal complexes, thereby contributing to the metal selectivity of the PVD pathway. Using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) and the fluorescence properties of PVD-Cd, -Co, -Cu, -Ga, -Mn, -Ni, -Zn and -Mn complexes, we showed that FpvA bound and transported PVD complexes with various metals. With the same strategy, we showed that, in a PvdRT-OpmQ deletion mutant, the bacteria accumulated both PVD and metals other than iron, confirming our hypothesis that PvdRT-OpmQ is one of the main actors ensuring the metal specificity of iron uptake by the PVD pathway. This accumulation resulted in higher levels of metal toxicity in *P. aeruginosa* cells. However, the metal toxicity levels reached were lower than those for the same concentration of non complexed metal, suggesting that these metals remained mostly chelated to the siderophore in the bacterial periplasm.

## RESULTS

*Affinities of the various PVD-metal complexes for FpvA.* Previous studies carried out by our group have shown that PVD can chelate many metals other than iron and that these siderophore-metal complexes inhibit  $^{55}\text{Fe}$  uptake by the PVD pathway (Braud et al., 2009b), suggesting that these different PVD-metal complexes compete with PVD-Fe for FpvA binding sites at the cell surface. We evaluated the affinities of the PVD-metal complexes for FpvA, by carrying out competition experiments with PVD- $^{55}\text{Fe}$ . PVD- and pyochelin-deficient cells (PAD07, pyochelin being a secondary siderophore produced by *P. aeruginosa*) were incubated at 0°C, to prevent uptake, in the presence of 1 nM PVD- $^{55}\text{Fe}$  and a series of concentrations of PVD-metal complexes prepared at the following ratios: 1:1(PVD:metal) and 1:10. The cells were then harvested by centrifugation and the radioactivity of the pellet was counted. These experiments are subject to several limitations, due to the existence of a number of equilibria: (i) formation of PVD- $^{55}\text{Fe}$ , an extremely stable complex ( $K_a = 10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary et al., 1994)); (ii) formation of PVD-metal complexes ( $K_a = 10^{20} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  and  $10^{17} \text{ M}^{-1}$  for  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , respectively (Chen et al., 1994), and unknown for the other metals); and (iii) formation of either FpvA-PVD- $^{55}\text{Fe}$  ( $K_d$  of 0.19 nM (Schalk et al., 2001)) or FpvA-PVD-metal complexes (affinity determined in this experiment) at the cell surface. Our goal was therefore not to obtain accurate affinity constants for the binding of the PVD-metal complexes to FpvA, but to compare the stability of the various FpvA-PVD-metal complexes with that of FpvA-PVD-Fe in the same experimental conditions. Both PVD- $^{55}\text{Fe}$  and PVD-metal complexes were prepared by incubating the siderophore with the metal before its addition to the bacteria. We checked that the concentration of PVD- $^{55}\text{Fe}$  remained constant even in the presence of high concentrations of metal ions, by first carrying out the competition experiment in the presence of PAD07 cells, 1 nM PVD- $^{55}\text{Fe}$  and various concentrations of siderophore-free metal ions. Cell-bound radioactivity did not decrease with concentrations of



siderophore-free metal ion below 10  $\mu\text{M}$  (data not shown), indicating that the metals used, at the concentrations indicated (Table 1), did not dissociate PVD- $^{55}\text{Fe}$  through competition. The concentration of PVD- $^{55}\text{Fe}$  remained constant in our experimental conditions. Moreover, as the affinity of PVD for most of the metals tested was unknown, we used various ratios of metal ions to siderophore when generating complexes of PVD with the tested metals. Higher ratios of metal ion to PVD concentration should facilitate the formation of PVD-metal complexes. For the 1:1 ratio, there should be a mixture of PVD and the desired PVD-metal complex, depending on the affinity of the siderophore for the metal tested. With the 1:10 ratio, we would expect to obtain mostly the desired PVD-metal complex.

Siderophore-deficient PAD07 cells were incubated in the presence of PVD- $^{55}\text{Fe}$  and various concentrations of the PVD-metal complexes tested. Cell-bound radioactivity decreased with increasing concentration of all the PVD-metal complexes tested. The highest affinities for FpvA were obtained with PVD-Fe and PVD-Hg, for which  $K_i$  was in the subnanomolar range (Table 1). PVD-Cu, PVD-Cr and PVD-Pb had  $K_i$  values of 6 to 9 nM (Table 1). For PVD complexed with  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , affinities for FpvA were in the range of 19 to 65.4 nM, lower than that of PVD-Fe by a factor of 30 to 100. The lowest affinity obtained was that for PVD-Al: 480 nM for the 1:1 (PVD: $\text{Al}^{3+}$ ) ratio and 13  $\mu\text{M}$  for the 1:10 and 1:100 ratios. Complete saturation of PVD with  $\text{Al}^{3+}$  was achieved only with the 1:10 ratio, and the  $K_i$  of 13  $\mu\text{M}$  obtained reflects the affinity of FpvA for PVD-Al. In conclusion, FpvA was able to bind PVD in complex with all the metals tested in this screening, with affinities from 2.9 nM for PVD-Fe to 13  $\mu\text{M}$  for PVD-Al.

#### ***Accumulation of metals in P. aeruginosa cells in the absence of PvdRT-OpmQ expression.***

We investigated the role of FpvA and PvdRT-OpmQ in the control of metal specificity in the uptake of iron via PVD, by incubating PAO1

(a PVD- and FpvA-deficient strain) and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (a PVD- and PvdRT-OpmQ-deficient strain) in the presence of PVD-metal complexes at a concentration of 5  $\mu$ M. We ensured that there was no siderophore-free metal in the experiment, by preparing the complexes by incubating each metal overnight with a four-fold excess of PVD. The cells were then harvested and the levels of metal within the bacterium and/or bound to its surface were determined by ICP-AES, which is an appropriate spectrometric technique for determining trace amounts of elements (Figure 1). For each PVD-metal complex tested, the PAO1*pvdFfpvA* strain was used to discriminate between metals transported into cells by FpvA and those adsorbed onto the cell surface or incorporated into the cell via diffusion through porins or other siderophore pathways.

As a control, the experiment was first carried out with apo-PVD to detect the transport of any trace metal present in the buffer. The trace metal concentrations in Tris-HCl buffer were determined by ICP-AES and are presented in Table 2. In 50 mM Tris-HCl pH 8.0, apo PVD chelated mostly  $\text{Fe}^{3+}$ , but also  $\text{Zn}^{2+}$  from its environment and transported them into the bacteria via FpvA (Figure 1A, compare the blue and yellow bars). No additional accumulation was seen when PvdRT-OpmQ was deleted (Figure 1A, pink bars). The amounts of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  present in the bacteria incubated in the presence of apo-PVD (less than 1  $\mu$ mol metal/g of cells) was much lower compared to the amounts present when the experiment was carried out in the presence of PVD-metal complexes (Figures 1B-D). In this control experiment with apo-PVD, metals other than  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  were almost undetectable in the bacteria.

The  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  content of bacteria was also determined for each PVD-metal complex tested, but the detailed results are shown only for PVD-Cd and PVD-Co (Figure 1B and 1C). For all the other experiments, we show the accumulation within the bacterium only of the metal chelated by PVD in Figure 1D. Indeed,

when PVD was already complexed with a specific metal before its addition to the bacterial suspension, the metal chelated by the siderophore accumulated in the largest amounts in *P. aeruginosa*. For PVD-Fe, and for the other PVD-metal complexes tested (Fig 1D), higher levels of metal accumulation were observed for cells expressing FpvA (PAO1*pvdD*, yellow bars) than for cells expressing PAO1*pvdFfpvA* (blue bars), suggesting that this additional accumulation in the presence of FpvA was due to an uptake via the FpvA/Pvd pathway. The amount of metal transported by the FpvA/PVD pathway was more or less equivalent to the amount of Fe<sup>3+</sup> transported (1.17 µg metal/g cells) for all metals other than Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (Figure 1D). Larger amounts of Cd<sup>2+</sup> (2.33 µg metal/g cells) and lower amounts of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> were transported by FpvA/PVD (0.03 and 0.17 µg metal/g cells, respectively). These data confirm that the FpvA/PVD system can transport metals other than iron into *P. aeruginosa*. However, there is no clear link between the amount of PVD-metal complex transported and the affinity of the various PVD-metal complexes for FpvA (Table 1). In all the experiments carried out in the presence of 5 µM PVD-metal complexes, Fe<sup>3+</sup> was transported into the bacteria, but in amounts similar to those recorded in the experiment with apo-PVD (data shown only for PVD-Cd and PVD-Co -Figure 1B and 1C-, but similar results were obtained for all the other PVD-metal complexes tested).

Interestingly, for all PVD-metal complexes tested, the absence of PvdRT-OpmQ (Figure 1D, pink bars) resulted in levels of metal accumulation higher than those recorded for PAO1*pvdD* (Figure 1D, yellow bars). This additional increase corresponded to only 32 % for Fe<sup>3+</sup> and 45 % for Cd<sup>2+</sup>, but 90% for Ga<sup>3+</sup> and 137 % for Mn<sup>2+</sup>, and 1005% for Zn<sup>2+</sup> and 1050% for Co<sup>2+</sup>. The higher level of metal accumulation in PAO1*pvdPvdRTopmQ* than in PAO1*pvdD* indicates that PvdRT-OpmQ expels metals or PVD-metal complexes transported by the PVD/FpvA pathway. Such a difference was seen in the presence of 5 µM PVD-metal

complexes but not in the presence of apo-PVD alone, in conditions in which the metal concentrations in the buffer were clearly lower (Table 2).

In conclusion, FpvA can transport a number of different metals in complex with PVD. The unwanted PVD-metal complexes were then expelled by PvdRT-OpmQ. These unwanted PVD-metal complexes seemed to correspond either to complexes between PVD and a metal other than iron or to excess transported PVD-Fe.

***Accumulation of fluorescence corresponding to PVD in P. aeruginosa cells in the absence of PvdRT-OpmQ expression.*** Metal-free PVD emits fluorescence at 447 nm. Complex formation with metals such as Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> increases fluorescence, whereas the formation of complexes with Fe<sup>3+</sup> quenches this fluorescence (Figure 1 in supplemental material) (Braud et al., 2009b; Folschweiller et al., 2002). We further investigated the role of FpvA and PvdRT-OpmQ in the control of metal selectivity in iron uptake by the PVD pathway, by also evaluating levels of fluorescent PVD in cells incubated in the presence of various PVD-metal complexes. This study was carried out with PAO1, PAO1, PAO1 and the corresponding complemented strain bearing a plasmid carrying the *pvdRT-opmQ* genes (Figure 2). These cells were incubated in the presence of 2 μM PVD-metal complexes or apo-PVD for 45 minutes. The periplasmic and cytoplasmic cell compartments were then isolated and fluorescence was monitored at 450 nm (excitation at 400 nm). We ensured that no metal-free siderophore was present, by preparing the PVD-metal complexes with a 1.5-fold excess of each metal over PVD.

Fluorescence accumulated principally in the periplasm, and not in the cytoplasm, for the PAO1, PAO1 and PAO1 strains incubated in the presence of PVD-metal complexes (Figure 2, yellow, pink and green

bars). No such fluorescence was observed in the absence of incubation with the apo PVD or PVD-metal complexes, confirming that this fluorescence was due to the presence of the siderophore PVD. No periplasmic accumulation of fluorescence was observed in the FpvA-deficient mutant (light blue bars), for any of the PVD-metal complexes tested, demonstrating a role of FpvA in this process. The accumulation of fluorescence was greatest for the PVD-Ga complex and was even observed for the non fluorescent PVD-Fe complex. Previous studies have shown this fluorescence to be due to the dissociation of iron from PVD in the periplasm, as apo-PVD being fluorescent (Greenwald et al., 2007; Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010b). Higher levels of fluorescence accumulation due to apo-PVD in the periplasm have also been observed in the absence of PvdRT-OpmQ, because this pump is involved in the recycling from the periplasm to the extracellular medium of PVD that has transported its iron (Yeterian et al., 2010b).

In this study, higher levels of fluorescence accumulation were also observed in PAO1*pvdDpvdRTopmQ* cells than in PAO1*pvdD* following incubation in the presence of the various PVD-metal complexes. This also suggests a periplasmic accumulation of either apo-PVD or fluorescent PVD-metal complexes in the absence of PvdRT-OpmQ. This additional accumulation of fluorescence was most marked in the experiment with PVD-Mn and was weakest in that with PVD-Cu. When the cells were complemented with pUCP22::*pvdRTopmQ* (green bars), the levels of fluorescence accumulation were similar or lower to those recorded for PAO1*pvdD* cells, indicating expression of PvdRT-OpmQ.

We checked that this fluorescence observed in PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* in the presence of PVD-metal complexes was not due to the uptake of metal-free PVD or Fe<sup>3+</sup> uptake by PVD (Yeterian et al., 2010b) after the formation of PVD-Fe complexes with trace amounts of Fe<sup>3+</sup>, by repeating the experiment in the presence of (i) metal-free PVD and (ii) metal-free PVD plus an excess of metal-free desferrichrome (Figure 2). In the presence of

PVD alone, fluorescence was observed in the periplasm of PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, at an intensity similar to that observed in the presence of certain PVD-metal complexes. In the presence of excess desferrichrome, lower amounts of fluorescence were observed in the periplasm of the cells. The fluorescence seen in the presence of metal-free PVD is probably due to the chelation, by the siderophore, of trace metals present in the Tris-HCl buffer. The metal composition of this buffer was determined by ICP-AES (Table 1), which detected the presence of 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  and other metals, such as  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , present at concentrations of about 0.1  $\mu\text{M}$ . Fluorescent emission spectra of PVD in Tris-HCl buffer in the absence or presence of an excess of desferrichrome showed a decrease of fluorescence in the presence of desferrichrome, indicating that apo PVD in this buffer is at least partially loaded with trace metals (Figure 3 in supplemental material). These trace metals can be chelated by PVD and transported into bacteria. In the presence of apo-PVD, mostly  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  were transported by the PVD pathway (Figure 1A). In the presence of apo-PVD and excess desferrichrome (50-fold excess), these trace metals were chelated by the excess desferrichrome and PVD was present mostly in the apo form. Consequently, lower accumulation of fluorescent PVD in the periplasm of *P. aeruginosa* was observed (Figure 2). No total decrease of fluorescence was observed probably because a 50-fold excess of desferrichrome is not sufficient to chelate all trace metals present in the Tris-HCl buffer or interacting with the lipopolysaccharides at the bacterial cell surfaces.

PVD fluorescence is readily detectable by fluorescence microscopy in *P. aeruginosa* cells (Hannauer et al., 2010; Yeterian et al., 2010b). This technique is precise enough for PVD visualization in the periplasm (Hannauer et al., 2010; Yeterian et al., 2010a). We have previously shown that, at high excitation energy, fluorescence due to PVD can be detected in bacteria, whereas, at lower excitation energies, such as that used in Figure 3, only larger amounts of fluorescent PVD can be visualized (Hannauer et al., 2010). This *in vivo* approach

for detecting different levels of fluorescence intensity in cells has been used to investigate fluorescence accumulation in PAO1*pvdD*, PAO1*pvdDpvdRTopmQ* and the corresponding complemented strain carrying the pUCP22::*pvdRTopmQ* plasmid (Figure 3). For all metals tested, fluorescence was observed only at the periphery of bacterial cells lacking the *pvdRT-opmQ* genes. No fluorescence was observed in cells expressing the PvdRT-OpmQ efflux pump, reflecting the lower levels of PVD or PVD-metal accumulation in the periplasm of these cells.

In conclusion, fluorescence corresponding to apo-PVD or PVD-metal complexes was detected in the periplasm of *P. aeruginosa* cells only when FpvA was expressed and when the bacteria were incubated in the presence of PVD-Fe, PVD-metal complexes or apo-PVD (Figures 2 and 3). Higher levels of fluorescence were observed in the absence of PvdRT-OpmQ. FpvA and PvdRT-OpmQ must therefore both be involved in the accumulation of fluorescent PVD, FpvA in the transport of PVD-metal complexes from the extracellular medium into the periplasm and PvdRT-OpmQ in the export of apo-PVD and PVD-metal complexes from the periplasm to the extracellular medium. The accumulation of both metal and PVD in a PvdRT-OpmQ mutant clearly indicates that PvdRT-OpmQ expels the unwanted metals complexed with PVD from the periplasm into the extracellular medium. The intensity of the fluorescence in the periplasm in Figure 2 cannot be considered proportional to the amount of PVD-metal or apo PVD present in this cell compartment, because PVD fluorescence intensity is modulated by the metal chelated (Figure 1 in supplemental material). For example, PVD-Ga in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 fluoresces five times more strongly than PVD-Co. Moreover, the buffer used for cell fractionation contains 20 % sucrose, which seems to induce the partial dissociation of PVD-metal complexes (Figure 2 in supplemental material).

**The PVD-metal complexes transported in *P. aeruginosa* cells in the absence of PvdRT-OpmQ expression are not highly toxic.** We investigated whether the accumulation of PVD-metal complexes by the PVD/FpvA pathway in the absence of PvdRT-OpmQ had a toxic effect on bacteria, by growing PVD-producing PAO1 and PAO1*pvdRTopmQ* cells and PVD-deficient PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* cells in the presence of various concentrations of siderophore-free metals or PVD-metal complexes (Table 3). MIC<sub>50</sub> (the minimal inhibitory concentration decreasing bacterial growth by 50 %) was determined for each experimental condition investigated. In experiments in which PVD-deficient cells are incubated in the presence of siderophore-free metals, no PVD-metal complexes can form and the metals remain PVD-free. In PVD-producing cells incubated in the presence of siderophore-free metals, the PVD-metal complexes obtained were not preformed, but could be formed during bacterial growth, with the production of PVD. As previously reported, strains able to produce PVD were less sensitive to metal toxicity than PVD-deficient strains, except for Fe<sup>3+</sup> toxicity (Braud et al., 2010). Ga<sup>3+</sup> was clearly the most toxic metal in our experimental conditions, and the other metals could be ranked in order of toxicity as follows: Co<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Mn<sup>2+</sup>. PvdRT-OpmQ production affected Cu<sup>2+</sup> toxicity, but not the toxicity of any of the other metals in these experimental conditions.

The experiment was repeated with preformed PVD-metal complexes. Metals chelated by PVD were less toxic to PAO1*pvdD* than siderophore-free metals, with the exception of Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> (Table 3). Metal toxicity was higher in the absence of PvdRT-OpmQ, except for Ga<sup>3+</sup>, but remained lower than that of siderophore-free metals. This slight increase in toxicity was probably due to the partial dissociation of PVD-metal complexes in the bacterial periplasm and lower levels of bacterial resistance in the absence of PvdRT-OpmQ. All these data together indicate that the metals stay mostly bound to PVD in the periplasm of *P. aeruginosa* after transport by FpvA.



## DISCUSSION

Siderophores are known to play a key role in supplying microorganisms in iron. Many studies have reported that siderophores efficiently chelate many metals other than iron. However, it remains unclear why siderophore-mediated uptake results in the efficient accumulation of iron, but not of any other biological or toxic metal, in bacteria. It is widely thought, although unproven, that the siderophore TonB-dependent transporters, which are highly siderophore-specific, transport only ferrisiderophore complexes. Our working hypothesis in this study was that either FpvA regulates the metal specificity of the PVD uptake pathway or PvdRT-OpmQ. The efflux pump PvdRT-OpmQ is already known to be involved in PVD recycling after iron release into the bacterial periplasm and the secretion of newly synthesized PVD (Hannauer et al., 2010; Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010b).

We have previously shown that various PVD-metal complexes inhibit Pvd-<sup>55</sup>Fe uptake, suggesting an interaction between these PVD-metal complexes and FpvA (Braud et al., 2009b). Competition experiments with PVD-<sup>55</sup>Fe showed that these PVD-metal complexes displaced PVD-Fe from FpvA with inhibition constants of between 2.9 nM for PVD-Fe and 13 μM for PVD-Al, in our experimental conditions. Thus, FpvA displays broad metal specificity for binding. Similar findings have already been reported for FptA (Braud et al., 2009a), the pyochelin outer membrane transporter in *P. aeruginosa*, but not for any other siderophore outer membrane transporter.

Does this broad metal specificity for binding extend to metal uptake? The accumulation of both metals and fluorescence corresponding to PVD in cells expressing FpvA but not in an FpvA-deleted mutant (Figure 1 and 2) demonstrates that this transporter is able to transport PVD-metal complexes other than PVD-Fe into *P. aeruginosa*. FpvA therefore clearly has broad metal specificity for both binding and uptake. The amounts of metals accumulated via the FpvA/PVD pathway in this study are larger than those reported in a

previous experiment (Braud et al., 2009b). This is almost certainly due to the incubation buffer used and the way in which PVD was prepared in the two protocols. In the previous study, succinate medium was used for the incubation of cells with the PVD-metals complexes whereas, here, we used 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Succinate medium contains 127  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$  and 1.96  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  (Table 2), which presumably compete with the tested metals for the formation of PVD-metal complexes (5  $\mu\text{M}$  PVD-metal complexes were added to the bacteria). The Tris-HCl buffer used in our study has a lower level of contamination with trace elements (Table 1). Moreover, in the previous study, PVD-metal complexes were prepared from PVD simply harvested from the supernatant of a pyochelin-deficient PAO1 culture without further purification. In our study, PVD was purified on a C18 column before incubation with the metals. We found that uptake was more efficient for  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  than for  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  in PAO1*pvdD* cells. However, we found no correlation between the amounts of metals accumulating in PAO1*pvdD* cells and the affinities of the PVD-metal complexes for FpvA (Table 1). All ferrisiderophore outer membrane transporters in Gram-negative bacteria have similar structures and, therefore, presumably, have similar mechanisms of ferrisiderophore uptake. This broad metal specificity of FpvA may thus be a feature of all siderophore outer membrane transporters. However, further studies are required to confirm this hypothesis.

Deletion of genes encoding the PvdRT-OpmQ efflux pump clearly increased metal and PVD accumulation in *P. aeruginosa*, suggesting a role for this pump in expelling PVD-metal complexes into the extracellular medium. PVD fluorescence accumulated only in the periplasm, not in the cytoplasm (Figures 2 and 3), indicating that the PVD-metal complexes were probably not transported further into the bacterial cells, being instead exported directly back into the extracellular medium, from the periplasm, by PvdRT-OpmQ. PvdRT-OpmQ is not the only efflux system involved in the secretion of newly synthesized PVD. Another as

yet unidentified system has also been shown to be involved (Hannauer et al., 2010; Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010b). This second system may take over the efflux of PVD-metal complexes in the absence of PvdRT-OpmQ in *P. aeruginosa* cells, implying that larger amounts of PVD-metal complexes may be transported by FpvA/PVD than suggested by the ICP-AES and fluorescence results shown in Figures 1 and 2.

PvdRT-OpmQ mutants accumulating PVD-metal complexes displayed higher levels of metal toxicity, but this toxicity remained lower than that of siderophore-free metals (Table 3). This observation strongly suggests that the metals remain bound to the PVD siderophore in the periplasm, thereby decreasing the risk of diffusion into the cytoplasm or interaction with a metalloprotein in the periplasm. The MIC values obtained also support the contention that PvdRT-OpmQ and PVD play a role in the metal resistance of *P. aeruginosa*. Non essential metals often enter bacteria through the normal nutrient transport system, via porins or active uptake pathways, such as that studied here for siderophores. Bacteria have developed several metal resistance strategies: the exclusion of metals by a permeability barrier, active transport of the metal away from the bacterial cells, intracellular sequestration of the metal by protein binding, extracellular sequestration by siderophores, enzymatic detoxification of the metal to generate a less toxic form and, finally, decreasing the metal sensitivity of cellular targets (Bruins et al., 2000; Nies, 1999; Nies, 2003). We show here that *P. aeruginosa* uses the PvdRT-OpmQ efflux pump to control the accumulation, within the bacterium, of unwanted PVD-metal complexes transported by the FpvA/PVD iron uptake pathway. PVD participates in this metal resistance strategy by remaining in complex with the metal in the periplasm, thereby sequestering it. Such a sequestration function has already been proposed for siderophores in the extracellular medium, as a means of preventing the diffusion of toxic metals into bacteria via porins (Braud et al., 2010; Schalk et al., 2011).

Nothing is currently known about the molecular mechanism involved in iron release from PVD in the periplasm. This process seems to involve iron reduction, with no chemical modification of the siderophore. It would be interesting to investigate whether the mechanism of PVD-Fe dissociation also applies to other PVD-metal complexes. If other PVD-metal complexes are unable to dissociate, their only possible fate in the *P. aeruginosa* periplasm may be expulsion by PvdRT-OpmQ, like newly synthesized PVD or PVD that has released the iron it was transporting. As the deletion of *pvdRtopmQ* also leads to an increase in  $\text{Fe}^{3+}$  accumulation, this process also seems to operate in instances in which FpvA transports too much PVD-Fe into the periplasm.

Is this mechanism specific to the PVD pathway or might it operate in other siderophore pathways? A siderophore pathway involving enzymatic siderophore degradation, like the enterobactin pathway in *E. coli*, could not expel unwanted siderophore-metal complexes and another system would therefore be required to control the accumulation of unwanted metals via the siderophore iron uptake pathway. FptA (the ferripyochelin outer membrane transporter) at the cell surface can also bind pyochelin in complex with any the metals tested, with affinities of 10 nM for pyochelin-Fe to 4.8  $\mu\text{M}$  for pyochelin-Al (Braud *et al.*, 2009a). The uptake of metals other than iron has been observed, but further studies are required to determine why only  $\text{Fe}^{3+}$  accumulates in bacteria via the FptA pathway.

In conclusion, we propose here, for the first time, a molecular mechanism involved in regulating the metal selectivity of a siderophore iron uptake pathway. In our model of this process, FpvA can bind PVD in complex with many metals other than  $\text{Fe}^{3+}$  and can transport any PVD-metal complexes bound to its binding site. Metal sorting involves the PvdRT-OpmQ efflux pump, which expels all unwanted PVD-metal complexes from the periplasm into the extracellular medium. These unwanted PVD-metal complexes may correspond to PVD complexed with metals other than iron or excess transported PVD-Fe. Further studies

are required to determine whether such control over metal selectivity via an efflux pump and a siderophore also occurs in other ferrisiderophore uptake pathways.

## MATERIALS AND METHODES

**Chemicals.** The metals studied were in the following forms: AgNO<sub>3</sub> (Sigma), AlCl<sub>3</sub> (Sigma), CdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (Proballo), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Strem), CrCl<sub>2</sub> (Strem), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Strem), EuCl<sub>3</sub> (Aldrich), FeCl<sub>3</sub> (Prolabo), Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·24H<sub>2</sub>O (Strem), HgCl<sub>2</sub> (Sigma), MnSO<sub>4</sub> (Prolabo), NiCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Strem), Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Aldrich), SnCl<sub>2</sub> (Prolabo), TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Strem), Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka) and ZnCl<sub>2</sub> (Alfa Aesar). All solutions were prepared to give metal ion concentrations of 50 mM in 0.5 N HCl or 0.5 N HNO<sub>3</sub>.

For PVD purification, we subjected a 2 l overnight culture of PAO1 to centrifugation to remove the cells and recovered the supernatant. After acidification to pH 4 with formic acid, the supernatant was incubated with C18 resin for 2 h, with shaking. The C18 resin was filtered and washed with 5 l of acidified water. PVD was eluted from the C18 resin with a 1:1 mixture of 2 M pyridine/acetic acid: acetonitril (1:1) at pH 5. PVD was freeze-dried after elution from the resin.

**Bacterial strains and growth media.** We used wild-type *P. aeruginosa* strain PAO1 (Stover et al., 2000) and six mutants. All six mutants have been described before: the PVD-deficient *P. aeruginosa* strain PAO1*pvdD* (Ackerley and Lamont, 2004); the PVD- and pyochelin-deficient *P. aeruginosa* strain PAD07 (Takase et al., 2000); the PVD- and PvdRT-OpmQ-deficient *P. aeruginosa* strain PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (Yeterian et al., 2010b); and the PVD- and FpvA-deficient *P. aeruginosa* strain PAO1*pvdFfpvA* (Shirley and Lamont, 2009). We used pUCP22::*pvdRTopmQ* as the pUCP22 vector carrying the *pvdRT-opmQ* operon (Yeterian et al., 2010b). All strains were grown overnight in succinate medium (composition: 6.0 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.0 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4.0 g/l sodium succinate, pH adjusted to 7.0 by adding NaOH, (Demange et al., 1990)), in the presence of 50

µg/ml kanamycin for PAO1*pvdFfpvA*, 50 µg/ml tetracyclin and 500 µg/ml streptomycin for PAD07, and 150 µg/ml carbenicillin for strains complemented with the plasmid pUCP22::*pvdRTopmQ*.

**Ligand-binding assays with <sup>55</sup>Fe.** For this experiment, PVD-metal complexes were prepared by incubating 10 mM PVD overnight in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, with metal ions at concentrations of 1 mM, 5 mM or 50 mM. The volumes were adjusted with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The *in vivo* affinity constants ( $K_i$ ) for the binding of PVD-metal complexes to FpvA were determined as follows: PAD07 cells were washed twice with an equal volume of fresh medium and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at an OD<sub>600</sub> of 0.3. The cells were then incubated for 1 h at 0°C, to prevent iron uptake (Clément et al., 2004), in a final volume of 500 µl, with 1 nM PVD-<sup>55</sup>Fe (prepared as described elsewhere (Schalk et al., 2001)) and various concentrations of unlabeled metal-loaded PVD (0 to 100 µM). The mixtures were filtered and the retained radioactivity was counted in scintillation cocktail. The binding affinity constants ( $K_i$ ) of the siderophores were calculated from IC<sub>50</sub> values, which were determined in competition experiments, according to the equation of Cheng and Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973):  $K_i = IC_{50}/(1 + L/K_d)$  where L is the concentration of radiolabeled ligand and  $K_d$  is its equilibrium dissociation constant determined experimentally. The  $K_d$  value of PVD-Fe for FpvA is  $0.54 \pm 0.19$  nM, as previously determined (Schalk et al., 2001).

**Metal incorporation in *P. aeruginosa* cells.** PVD harvested from an overnight culture of PAO1 was purified on a C-18 reverse-phase column, as described here above. Purified PVD was incubated overnight, at a concentration of 20 µM ( $\epsilon = 19\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  at 400 nm), in the presence of 5 µM metal ions in a final volume of 8 ml of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer

(Solutions A). Overnight cultures of PAO1*pvdD*, PAO1*pvdDpvdRTopmQ* and PAO1*pvdFfpvA* in iron-limited medium were subjected to centrifugation and the pellet was resuspended at an OD<sub>600</sub> of 5 in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0. The bacterial cells were added to the PVD-metal solutions (solutions A) at a final OD<sub>600</sub> of 1 and in a final volume of 10 ml (final concentration of metal ions: 4 μM). The tubes were then incubated, with shaking at 200 rpm, for 45 min at 37°C. Samples were then centrifuged and the bacterial pellets were washed once with ultrapure water and dried at 50°C for 48 h in glass tubes (previously washed with 20% HNO<sub>3</sub>). Cells were mineralized by incubation in 68% (v/v) HNO<sub>3</sub> for 24 h at room temperature. The volume was brought to 10 ml with ultrapure water and the samples were filtered through a membrane with 0.45 μm pores. We analyzed the samples with an ICP-AES apparatus (Varian 720 ES), at the following wavelengths (in nm): Cd<sup>2+</sup> (214.439), Co<sup>2+</sup> (238.892), Cu<sup>2+</sup> (327.395), Fe<sup>3+</sup> (238.204), Ga<sup>3+</sup> (294.363), Mn<sup>2+</sup> (257.61), Ni<sup>+</sup> (231.604), Zn<sup>2+</sup> (206,200). As a control, the amount of metal was determined in 50 mM Tris-HCl pH 8: 0 μM for Cd<sup>2+</sup>, 0.024 μM for Co<sup>2+</sup>, 0.126 μM for Cu<sup>2+</sup>, 0.104 μM for Fe<sup>3+</sup>, 0.068 μM for Ga<sup>3+</sup>, 0.012 μM for Mn<sup>2+</sup>, 0.116 μM for Ni<sup>2+</sup> and 0.038 μM for Zn<sup>2+</sup>.

***Fluorescence spectroscopy and cell fractionation.*** Overnight cultures of PAO1*fpvApvdF*, PAO1*pvdD*, PAO1*pvdDpvdRTopmQ* and the corresponding complemented strain with a plasmid carrying the *pvdRT-opmQ* genes grown in iron-limited medium were subjected to centrifugation and the pellet was resuspended at an OD<sub>600</sub> of 1 in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Transport assays were started by adding various PVD-metal complexes at a concentration of 2 μM. PVD-metal complexes were prepared with a 2:3 ratio of PVD to metal. Samples were incubated for 45 minutes and then centrifuged. The cell pellet was washed with 50 mM Tris-HCl pH 8 and resuspended in 1 ml of the same buffer and fluorescence was evaluated. For periplasm and cytoplasm preparations, 0.5 x 10<sup>10</sup> bacteria (5 ml of a suspension with an OD<sub>600</sub>



of 1) were collected by centrifugation after incubation with Pvd-metal complexes for 45 minutes. Cells were washed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and resuspended in 750  $\mu$ l of buffer A (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 % sucrose). Spheroplasts were obtained by adding 7.5  $\mu$ l of 100 mg/ml lysozyme (Euromedex) to the cells. Mixtures were incubated at 4 °C for 45 min, with slow shaking. Following spheroplast preparation, the periplasmic fraction was isolated by centrifugation (15 min at 5 500 g). The pellet, containing the spheroplasts, was washed twice with 250  $\mu$ l of buffer A for each wash. The spheroplasts were resuspended in 1250  $\mu$ l of cold water and incubated for 1 h at room temperature in the presence of benzonase (1  $\mu$ l of a 1/50 dilution, Sigma). The cytoplasmic fraction was isolated by ultracentrifugation (30 min at 120 000 g). The fluorescence of each fraction was determined.

Fluorescence experiments were carried out with a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrophotometer. The excitation wavelength ( $\lambda_{exc}$ ) was 400 nm and the fluorescence was measured at an emission wavelength ( $\lambda_{em}$ ) of 447 nm.

**Image acquisition.** Overnight cultures of PAO1*pvdD*, PAO1*pvdDpvdRTopmQ* and the corresponding strain with the plasmid carrying the genes *pvdRT-opmQ* grown in iron-limited medium were subjected to centrifugation and the resulting cell pellet was resuspended at an OD<sub>600</sub> of 0.5 in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Transport assays were started by adding various PVD-metal complexes at a concentration of 2  $\mu$ M. PVD-metal complex was prepared with a PVD: metal ratio of 2:3. Samples were incubated for 45 minutes and then centrifuged. The cell pellet was washed with 50 mM Tris-HCl pH 8 buffer, resuspended in this same buffer and mounted on S750 agarose-coated slides, as previously described (Yeterian et al., 2010a; Yeterian et al., 2010b). Images were acquired with a Nikon 50i (objective: CFI Achromplan 100X A ON 1.25 DT 0.18) microscope equipped with a 12-bit digital DS-Fi1 camera. Images were captured with NIS-Elements imaging software.

**Toxicity of Pvd-metals.** We prepared 96-well microtiter plates with the various metals, at various concentrations (from 0.46  $\mu\text{M}$  to 500  $\mu\text{M}$ ) in succinate medium. Overnight cultures of PAO1 and PAO1 $\Delta$ *pvdRT-opmQ* strains in succinate medium were used to inoculate these microtiter plates at a density of  $10^4$  to  $10^5$  CFU/ml. The cultures were grown at 29°C, with shaking, and optical density was measured at 600 nm after 18, 24 and 48 of culture, with a TECAN Infinite M200 microplate reader and Magellan software.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was partly funded by the Centre National de la Recherche Scientifique and a grant from the ANR (Agence 666 Nationale de Recherche, ANR-08-BLAN-0315-01). M.H. was supported by a MESR fellowship.

## **AUTOR CONTRIBUTIONS**

M Hannauer (PhD student) did most of the work.

A. Braud (postdoc) determined the  $K_i$  of the PVD-metal complexes for FpvA (Table 1).

F. Hoegy is a technician and help M. Hannauer to carry out some of the experiments.

P. Ronot (technician) is in charge of the ICP-AES and did the measurements.

A. Boos is in charge of the ICP-AES facility at our university.

I. Schalk supervised this work.

## REFERENCES

- 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., Célia, H. and Pattus, F. (2006) Interaction of TonB with outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **188**, 5752-5761.
- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z. and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.*, **33**, 6391-6402.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G.L.A. and Schalk, I.J. (2010) The siderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: Another biological function of these two siderophores. *Environ Microbiol Report*, **2**, 419-425.
- Braud, A., Hannauer, M., Milsin, G.L.A. and Schalk, I.J. (2009a) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol*, **191**, 5317-5325.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. and Schalk, I.J. (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol*, **11**, 1079-1091.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, **45**, 198-207.
- Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. (1994) Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **58**, 390-396.

- Cheng, Y. and Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, **22**, 3099-3108.
- Chu, B.C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., Peacock, R.S., Slavinskaya, Z. and Vogel, H.J. (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals*, **23**, 601-611.
- Clément, E., Mesini, P.J., Pattus, F., Abdallah, M.A. 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., Célia, H., Folschweiller, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2005) The crystal structure of the pyoverdinin outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J Mol Biol*, **34**, 121-134.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T. and Dell, A., Abdallah, M.A. (1990) Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals*, **3**, 155-170.
- Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M.A., Pattus, F. and Schalk, I.J. (2002) The interaction between pyoverdinin and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry*, **41**, 14591-14601.
- 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-pyoverdinin uptake in ~~*Pseudomonas aeruginosa*~~ *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J Biol Chem*, **282**, 2987-2995.

- Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.M., Schalk, I.J. and Pattus, F. (2009) FpvA bound to non-cognate pyoverdines: molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Mol Microbiol*, **72**, 1246-1259.
- Gumbart, J., Wiener, M.C. and Tajkhorshid, E. (2007) Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophys. J.*, **93**, 496-504.
- Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010) Secretion of newly synthesized pyoverdine by *Pseudomonas aeruginosa* involves an efflux pump. *FEBS Lett*, **584**, 4751-4755.
- Hider, R.C. and Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*, **27**, 637-657.
- Imperi, F., Tiburzi, F. and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 20440-20445.
- Lamont, I.L., Konings, A.F. and Reid, D.W. (2009) Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Biometals*, **22**, 53-60.
- Li, X.Z. and Nikaido, H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, **69**, 1555-1623.
- Nader, M., Journet, L., Meksem, A., Guillon, L. and Schalk, I.J. (2011) Mechanism of ferrisiderophore uptake by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane transporter FpvA: no diffusion channel formed at any time during ferrisiderophore uptake. *Biochemistry*, **50**, 2530-2540.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 730-750.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 313-339.
- Nikaido, H. and Takatsuka, Y. (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, **1794**, 769-781.

- Schalk, I.J. (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochemi*, **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., Hannauer, M. and Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol*, **in press**.
- 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. *Mol Microbiol*, **39**, 351-360.
- Schalk, I.J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorselaer, 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.
- Schons, V., Atkinson, R.A., Dugave, C., Graff, R., Mislin, G.L., Rochet, L., Hennard, C., Kieffer, B., Abdallah, M.A. and Schalk, I.J. (2005) The structure-activity relationship of ferric pyoverdine bound to its outer membrane transporter: implications for the mechanism of iron uptake. *Biochemistry*, **44**, 14069-14079.
- Shirley, M. and Lamont, I.L. (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **191**, 5634-5640.

- 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., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959-964.
- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *J Bacteriol*, **192**, 117-126.
- Takase, H., Nitanaï, H., Hoshino, K. and Otani, T. (2000) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, **68**, 1834-1839.
- Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol*, **15**, 22-30.
- Wasielewski, E., Atkinson, R.A., Abdallah, M.A. and Kieffer, B. (2002) The three-dimensional structure of the gallium complex of azoverdin, a siderophore of *Azomonas macrocytogenes* ATCC 12334, determined by NMR using residual dipolar coupling constants. *Biochemistry*, **41**, 12488-12497.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010a) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, **38**, 1447-1459.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010b) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Report*, **2**, 412-418.



## LEGENDS

### **Figure 1: Metal accumulation via the FpvA/PVD pathway in *P. aeruginosa* strains with**

**and without PvdRT-OpmQ expression. A.** PAO1*pvdD* (PVD-deficient strain, yellow bars), PAO1*pvdFfpvA* (PVD- and FpvA-deficient strain; blue bars) and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (PVD- and PvdRT-OpmQ-deficient strain, pink bars) at an OD<sub>600</sub> of 1 were incubated at 30°C in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 for 45 min in the presence of 5 μM apo-PVD. The cells were harvested, washed and Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> contents were determined by ICP-AES.

**B and C.** The experiment was repeated with incubation of the cells with 5 μM PVD-Cd (panel B) or PVD-Co (panel C). PVD-metal complexes were prepared by incubating each metal overnight in the presence of a fourfold excess of PVD to ensure that all the metal was bound to siderophore. We determined Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> contents by ICP-AES for both PVD-metal complexes tested.

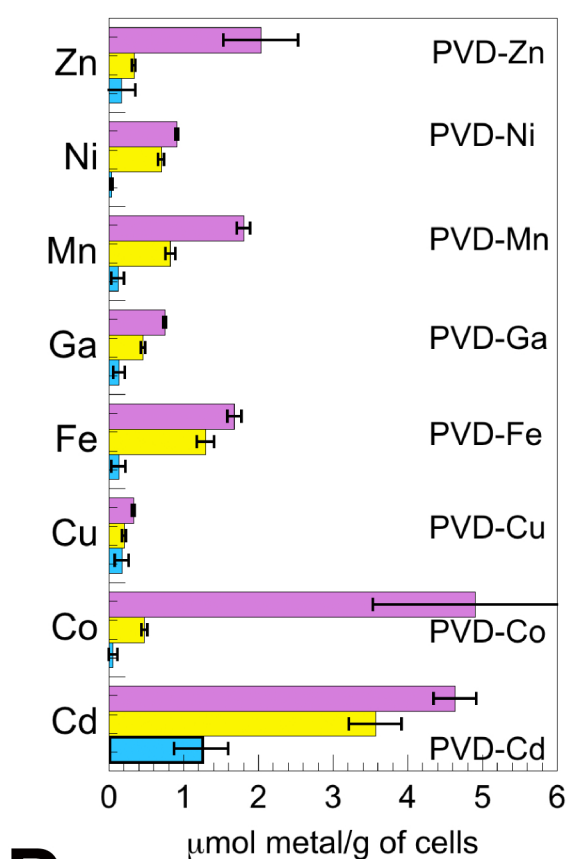
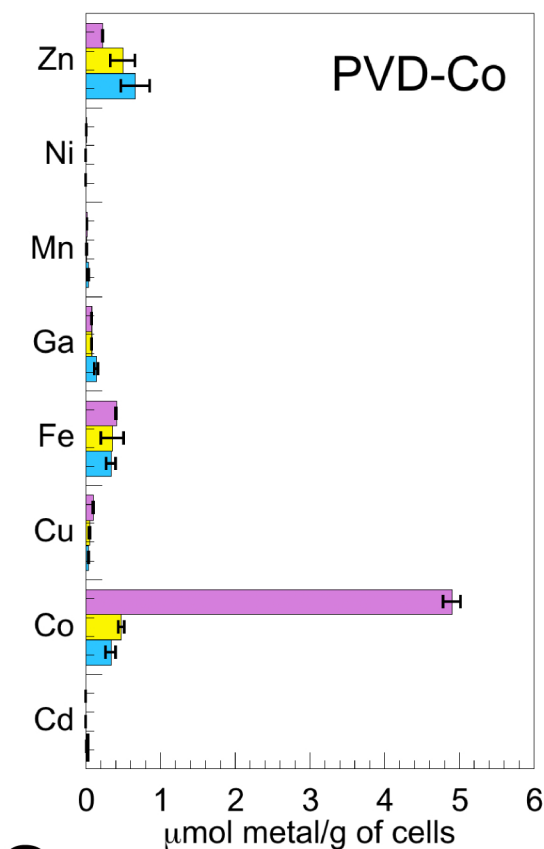
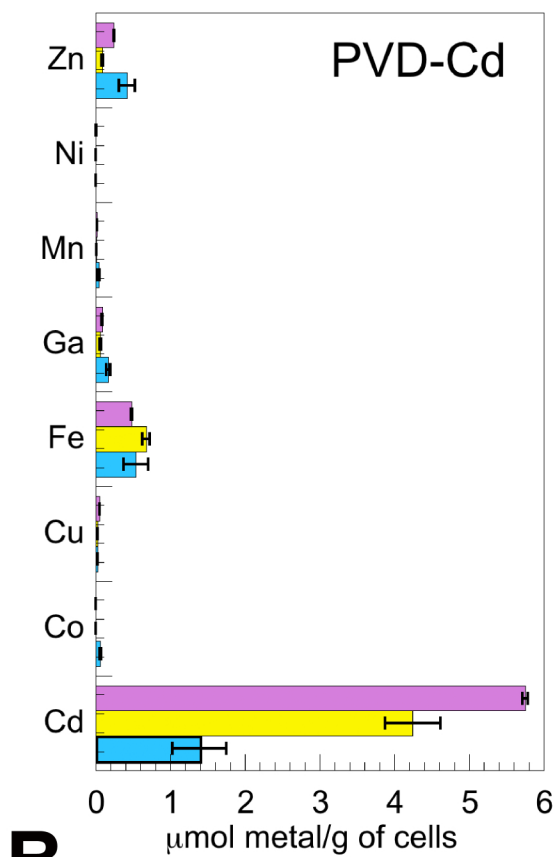
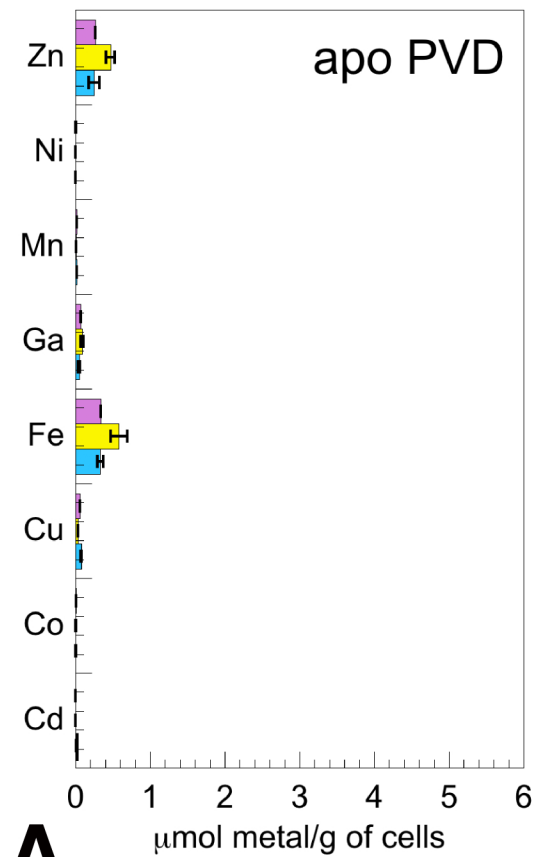
**C.** The experiment was repeated with incubation of the cells with 5 μM of the other PVD-metal complexes tested. Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> contents were determined by ICP-AES for each PVD-metal complex tested, but this panel summarizes only the bacterial content of the metal in complex with PVD incubated with the cells. For example, Cd<sup>2+</sup> content was determined when the cells were incubated in the presence of PVD-Cd, Co<sup>2+</sup> content was determined when the cells were incubated in the presence of PVD-Co, and so on. For all panels, the data presented are the means of three experiments.

**Figure 2: Fluorescent PVD or PVD-metal accumulation in *P. aeruginosa* strains.**

PAO1*pvdD*, a PVD-deficient strain; PAO1*pvdFfpvA*, a PVD- and FpvA-deficient strain; PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, a PVD- and PvdRT-OpmQ-deficient strain and the corresponding complemented strain with a plasmid carrying the *pvdRT-opmQ* genes were incubated, at an OD<sub>600</sub> of 1, at 30°C, for 45 min in the presence of various PVD-metal complexes at a concentration of 2 μM. PVD-metal complexes were prepared by incubating PVD overnight in the presence of a 1.5-fold excess of each metal, to ensure that there was no metal-free siderophore. After cellular fractionation, the fluorescence (emission at 450 nm) of each cell compartment was determined by spectrofluorimetry (excitation at 400 nm). The experiment was repeated with apo-PVD and apo-PVD plus a large excess of desferrichrome. Periplasm: PAO1*pvdFfpvA*, light blue bars; PAO1*pvdD*, yellow; PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, pink and PAO1*pvdDpvdRTopmQ*(pUCP22 ::*pvdRTopmQ*), green. Cytoplasm: PAO1*pvdFfpvA*, black; PAO1*pvdD*, orange; PAO1*pvdDpvdRTopmQ*, purple and PAO1*pvdDpvdRTopmQ*(pUCP22 ::*pvdRTopmQ*), dark green. The data presented are the means of three experiments.

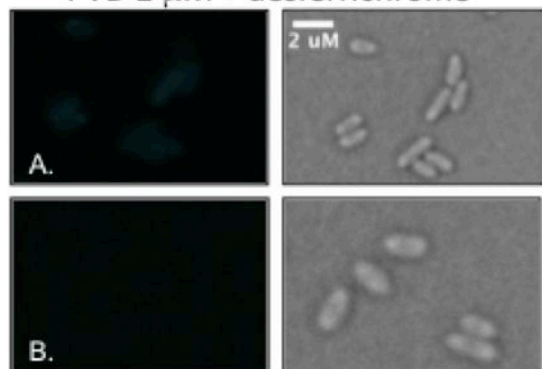
**Figure 3: Epifluorescence microscopy.** (A) PAO1*pvdD* (PVD-deficient strain), (B) PAO1*pvdDpvdRTopmQ* (PvdRT-OpmQ- and PVD-deficient strain) and (C) the corresponding complemented strain carrying a plasmid with the *pvdRT-opmQ* genes were incubated, at an OD<sub>600</sub> of 1, at 30°C, for 45 min in the presence of each PVD-metal complex, prepared as in Figure 1 and added to a concentration of 2 μM. As a control, the experiment was repeated in the presence of metal-free PVD and a 100-fold excess of desferrichrome. For each pair of images, the image on the left was taken with Ex 400-400 HQ, Em 470 HQ, DC 455 (Filter speciation) and the image on the right was taken by light microscopy (white bar = 2 μm). For each PVD-metal complex studied, the excitation energy was chosen so as to allow

detection of differences in fluorescence intensity in PAO1*pvdD* and PAO1*pvdDpvdRTopmQ* cells. Images were obtained for three independent cultures, for all strains, and representative images are shown. Data are shown only for PVD-Co, PVD-Ni and PVD-Zn, but equivalent data were obtained for all the other PVD-metal complexes studied.

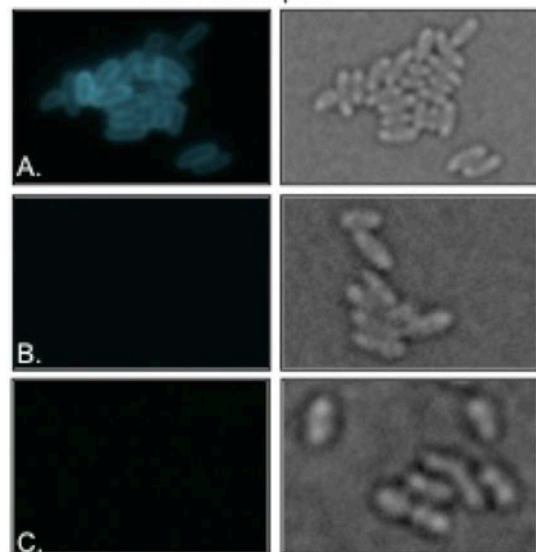




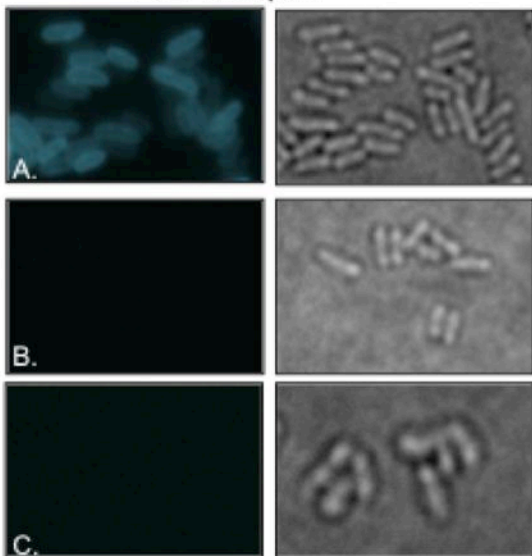
PVD 2  $\mu$ M + desferrichrome



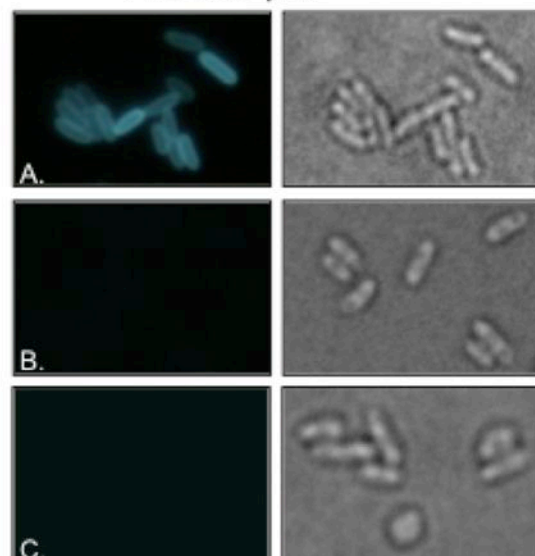
PVD-Co 2  $\mu$ M



PVD-Ni 2  $\mu$ M



PVD-Zn 2  $\mu$ M



Tables

Metal cation	PVD-metal 1:1		PVD-metal 1:10	
Fe <sup>3+</sup>	2.9	(1.4-6.1)	0.6	(0.1-4.2)
Hg <sup>2+</sup>	3.2	(1.8-5.5)	0.9	(0.5-1.8)
Cu <sup>2+</sup>	5.7	(4.0-8.2)	6.7	(4.0-11.3)
Cr <sup>2+</sup>	6.5	(3.5-12.0)	7.3	(4.8-11.3)
Pb <sup>2+</sup>	8.6	(5.7-12.8)	8.3	(5.3-12.9)
Zn <sup>2+</sup>	28.2	(23.0-34.6)	19.9	(14.7-19.5)
Tb <sup>3+</sup>	30.7	(19.4-48.4)	26.5	(18.2-38.6)
Eu <sup>3+</sup>	12.7	(8.8-18.5)	27.4	(16.3-46.1)
Tl <sup>+</sup>	31.3	(26.8-36.6)	29.7	(24.3-36.2)
Co <sup>2+</sup>	38.4	(32.1-45.9)	40.0	(31.6-50.7)
Ag <sup>+</sup>	40.9	(31.7-52.9)	40.6	(34.0-48.4)
Sn <sup>2+</sup>	44.3	(28.0-70.1)	50.1	(40.3-62.3)
Cd <sup>2+</sup>	30.7	(25.7-36.6)	50.9	(40.1-64.6)
Ni <sup>2+</sup>	52.7	(38.6-71.8)	54.1	(41.8-70.1)
Mn <sup>2+</sup>	74.4	(50.8-109.0)	65.4	(44.5-96.0)
Al <sup>3+</sup>	480.7	(315.8-731.7)	1.3 x 10 <sup>4</sup>	(7.7 <sup>e3</sup> -2.2 <sup>e4</sup> )

**Table 1: Inhibition constant  $K_i$  (nM) of the PVD-metal complexes in competition with PVD-<sup>55</sup>Fe on FpvA.** The experiment was carried out on strain PAD07 ( $OD_{600}=0.3$ , PVD- and pyochelin-deficient strain) incubated in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 at 0°C (to prevent PVD-Fe uptake), in the presence of 1 nM PVD-<sup>55</sup>Fe and various concentrations of PVD-metal complexes prepared at two ratios: 1:1 (siderophore:metal) and 1:10. The numbers in brackets are 95% confidence intervals. The order in which the metals are presented reflects their affinity for FpvA when bound to PVD: affinity was highest with PVD-Fe and lowest with PVD-Al.

Metal cation	Succinate medium	50 mM Tris-HCl pH 8.0	PVD (100 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O)
Ag <sup>+</sup>	0.000	0.017	0.003
Al <sup>3+</sup>	1.957	0.182	0.878
Cd <sup>2+</sup>	0.006	0.000	0.068
Co <sup>2+</sup>	0.008	0.024	0.123
Cr <sup>3+</sup>	0.049	0.028	0.121
Cu <sup>2+</sup>	0.258	0.126	0.196
Fe <sup>3+</sup>	0.292	0.104	0.206
Ga <sup>3+</sup>	0.022	0.068	0.070
Mg <sup>2+</sup>	126.781	0.007	0.196
Mn <sup>2+</sup>	0.056	0.012	0.112
Ni <sup>2+</sup>	0.002	0.116	0.031
Pb <sup>+</sup>	0.023	0.018	-0.001
Zn <sup>2+</sup>	0.084	0.038	0.364

Table 2: Metal concentrations ( $\mu$ M) in succinate medium, Tris-HCl buffer and 100  $\mu$ M of PVD solution in water, as determined by ICP-AES



Metals in the absence of PVD	Cd <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Ga <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
PAO1	30	4	150	>1000	<0.49	500	15	60
PAO1 <i>pvdRTopmQ</i>	30	7	60	>1000	<0.49	600	15	60
PAO1 <i>pvdD</i>	10	2	50	>1000	<0.49	100	10	11
PAO1 <i>pvdDpvdRTopmQ</i>	10	3	10	>1000	<0.49	200	9	12
PVD-metal complexes preformed before addition to the culture	Cd <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Ga <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
PAO1 <i>pvdD</i>	30	2	400	600	6	100	60	350
PAO1 <i>pvdDpvdRTopmQ</i>	15	15	150	360	15	15	30	130

**Table 3: Toxic effects of Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on *P. aeruginosa* growth.** MIC<sub>50</sub> (μM) was determined for each metal, for PAO1, PAO1*pvdD*, PAO1*pvdRTopmQ* and PAO1*pvdDPvdRTopmQ* cultures after 24 h of growth. MIC<sub>50</sub> is the minimal concentration of metal inhibiting bacterial growth by 50 %. The MIC<sub>50</sub> values presented are means from an experiment carried out in triplicate.

## SUPPLEMENTAL MATERIALS

Figure SM 1:

Fluorescence spectra for 2  $\mu\text{M}$  PVD-metal complexes in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Excitation at 400 nm.

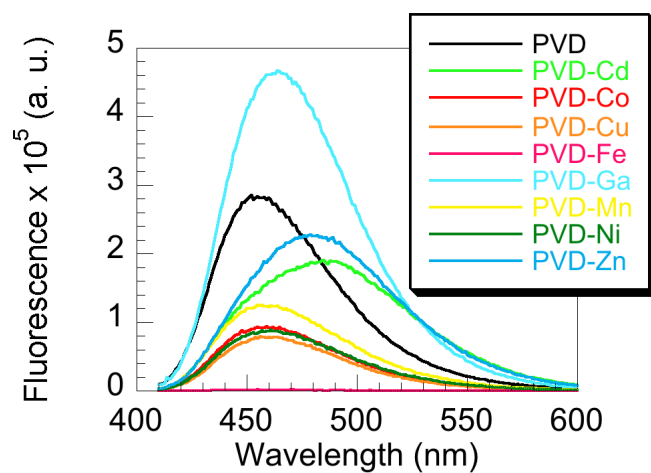


Figure SM 2:

Fluorescence spectra for 2  $\mu\text{M}$  PVD-metal complexes in 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, sucrose 20 %. Excitation at 400 nm.

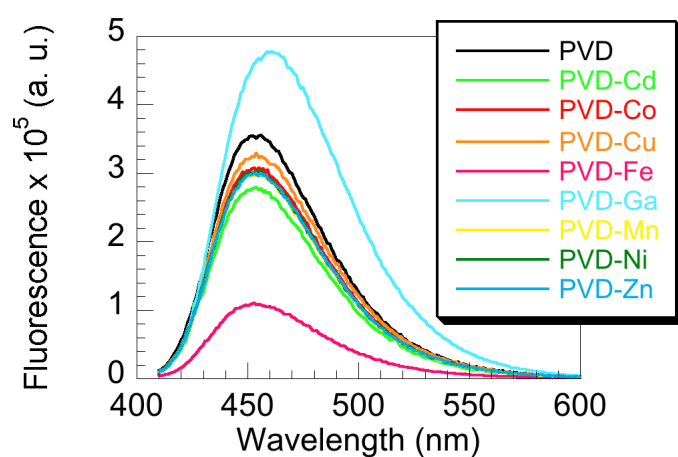
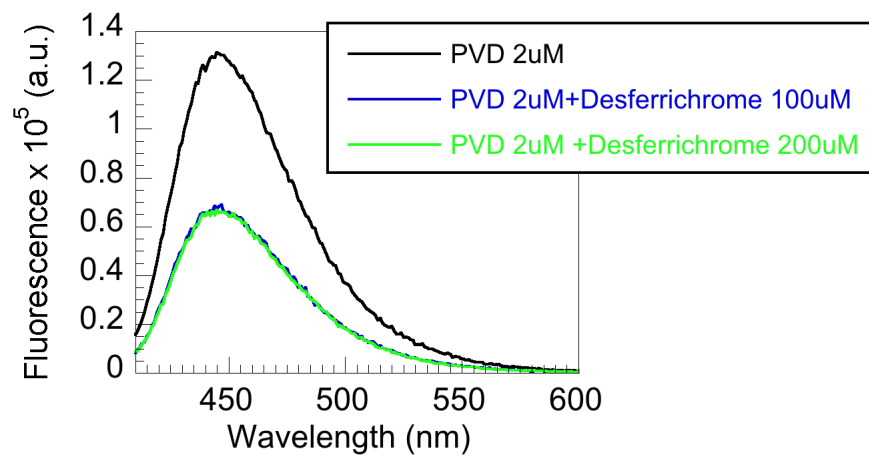


Figure SM 3:

Fluorescence spectra for 2  $\mu\text{M}$  apo PVD in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 in the presence or absence of a 50- and 100-fold excess of desferrichrome. Excitation at 400 nm.





## II. Discussion de l'article 2

Pour cette étude, nous avons utilisé deux approches parallèles et complémentaires. Nous avons d'une part mesuré par ICP-AES la quantité de métaux accumulés dans différents mutants de *P. aeruginosa*. En parallèle, nous avons également suivi l'accumulation dans les bactéries de la Pvd grâce aux propriétés de fluorescence de ce sidérophore. En effet, cette molécule est fluorescente et selon le métal chélaté cette fluorescence est modulée : elle est augmentée avec la chélation de la plupart des métaux et elle est éteinte lorsque la Pvd est en complexe avec le fer. Cette approche, nous a permis de corrélérer l'accumulation dans la bactérie de fluorescence correspondant à la Pvd avec l'accumulation de métaux.

Cette étude a été réalisée sur trois mutants : PAO1 qui est une souche déficiente pour la production de Pvd, PAO1

fpvApvdF

, une souche déficiente pour la production de Pvd et de FpvA et enfin PAO1

pvdDpvdRTopmQ

, une souche déficiente pour la production de Pvd et l'expression de la pompe PvdRT-OpmQ. La souche délétée pour le récepteur FpvA permet d'évaluer la quantité de métaux liée à la surface des cellules bactériennes et celle transportée dans la bactérie par diffusion ou par un autre sidérophore que la Pvd. La comparaison de la quantité de métaux et de Pvd accumulés entre la souche PAO1

pvdD

 et PAO1

pvdFfpvA

 permet de déterminer la quantité de complexe Pvd-métaux transporté par le système FpvA/Pvd. Cette approche a permis de montrer que FpvA transporte les métaux ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) en complexe avec Pvd (Figure 1 de l'article 2). Ce récepteur de sidérophores n'est donc pas sélectif du complexe Pvd-Fe mais peut lier et transporter la Pvd en complexe avec différents métaux autres que le fer. Probablement tout complexe capable de se lier au site de liaison de FpvA à la surface de la cellule sera transporté dans le périplasme, mais peut être pas avec la même efficacité. L'étape sélective étant plus l'étape de liaison que l'étape de transport. En effet, de manière surprenante, il n'y a pas de relation entre l'affinité des différents complexes Pvd-métaux pour FpvA et la quantité de ces métaux transportée. Apparemment, l'efficacité de transport n'est pas la même selon les différents complexes Pvd-métaux transportés.

Nous avons également comparé l'accumulation de métaux et de Pvd entre la souche PAO1

pvdD

 et PAO1

pvdDpvdRTopmQ

. Cette seconde étude a montré qu'en absence d'expression de la pompe PvdRT-OpmQ, une quantité encore plus importante de métaux et de Pvd s'accumulent. Le  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont les métaux qui présentent l'accumulation la plus importante. Le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Ga}^{3+}$  et le  $\text{Ni}^{2+}$  s'accumulent quant à eux beaucoup moins

(Figure 1 de l'article 2). Cette observation suggère que PvdRT-OpmQ excrète ces différents complexes Pvd-métaux transporté par FpvA et qui s'accumulent en absence de l'expression de PvdRT-OpmQ. Une accumulation de Pvd-Fe a également été observée pour la souche PAO1*pvdDpvdRT-OpmQ*, suggérant qu'en cas d'excès de transport de Pvd-Fe par FpvA, PvdRT-OpmQ peut également expulser ce complexe. Par microscopie de fluorescence et par fractionnement cellulaire, nous avons montré que la Pvd s'accumulait dans le périplasma et non dans le cytoplasme des souches étudiées. La pompe PvdRT-OpmQ excrète donc les complexes Pvd-métaux du périplasma et non du cytoplasme vers le milieu extracellulaire.

Dans cet article, nous avons montré que le mutant de la pompe à efflux accumulait certains métaux sous forme de complexe Pvd-métal. Afin de vérifier l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans le recyclage des complexes Pvd-métaux, nous avons observé des souches déficientes dans la production de Pvd et délété pour la pompe à efflux au microscope après incubation avec les différents complexes Pvd-Métaux. En effet, excepté le fer, tous les complexes Pvd-Métaux étudiés sont fluorescents et cette fluorescence est plus importante que la Pvd seule. Une accumulation de fluorescence dans le périplasma de la souche PAO*pvdDpvdRTopmQ* est observée dans le cas de tous les métaux (Figure 3 de l'article 2). La souche PAO*pvdDpvdRTopmQ* (pUCP22 ::*pvdRTopmQ*) présente quant à elle un phénotype identique à la PAO*pvdD*. Pour confirmer cette accumulation de fluorescence, nous avons effectué un fractionnement cellulaire, c'est-à-dire séparé le périplasma du cytoplasme et mesuré la fluorescence par spectrofluorimétrie. Cette méthode, montre une accumulation de fluorescence dans le périplasma des deux souches avec cependant une accumulation nettement plus importante dans le cas de la souche PAO*pvdDpvdRTopmQ* et plus particulièrement dans le cas du  $Mn^{2+}$  (Figure 2 de l'article 2). Par ces deux techniques, nous ne pouvons pas déterminer si c'est uniquement une accumulation de Pvd ou de complexe Pvd-Métal. De plus, si l'on effectue des spectres de chaque complexe dans le tampon Tris-HCl 200 mM pH 8, sucrose 20 % (tampon utilisé pour le fractionnement), on observe une fluorescence homogène de tous les complexes et cette fluorescence est identique à la Pvd (Figure SM2). Alors que si l'on effectue les même spectre dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, on observe un signal de fluorescence spécifique à chaque complexe métallique et différent de celui de la Pvd (Figure SM1).

Finalement, afin d'étudier la toxicité de l'accumulation de ces métaux pour le mutant de la pompe à efflux, nous avons incubé des souches productrices de Pvd (PAO1 et PAO*pvdRTopmQ*) ou déficientes dans la production de Pvd (PAO*pvdD* et PAO*pvdDpvdRTopmQ*) avec des concentrations croissantes des différents métaux ou

complexes Pvd-Métaux testés. La concentration minimal inhibant la croissance bactérienne de 50% a été déterminée dans différentes conditions. Dans les cas de l'incubation des souches productrices de Pvd avec les métaux libres, ceux-ci peuvent être complexé par la Pvd durant la croissance bactérienne. En ce qui concerne les souches déficientes dans la production de Pvd, les métaux vont rester sous forme libre. Les résultats obtenus montrent que les souches productrices de Pvd présente une sensibilité moins importante vis-à-vis des métaux comparé aux souches déficientes pour la production de Pvd (Tableau 3 de l'article 2). Ces résultats confirment ceux observés précédemment (Braud et al., 2010) montrant que la présence de Pvd permettait de protéger les cellules de la toxicité des métaux. Les résultats obtenus montrent clairement une toxicité très importante du  $\text{Ga}^{3+}$  suivit du  $\text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ . L'absence de la pompe PvdRT-OpmQ n'affecte que la toxicité de  $\text{Cu}^{2+}$  mais pas des autres métaux. Cependant, lorsque l'on apporte ces métaux, sous forme de complexe avec la Pvd, aux souches déficientes dans la production de Pvd (PAOpvdD et PAOpvdDpvdRTopmQ), on observe une diminution de la toxicité des métaux pour la souche PAOpvdD à l'exception de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  (Tableau 3 de l'article 3). Dans le cas de cette expérience, l'absence de la pompe à efflux augmente la sensibilité de la souche aux différents métaux excepté le  $\text{Ga}^{3+}$  sans tout de fois atteindre celle observée pour les souches incubées avec les métaux seuls. Cette légère augmentation de toxicité peut être due a une dissociation partielle du complexe dans le périplasme de la bactérie ou à une diminution de la résistance bactérienne du à l'absence de PvdRT-OpmQ.

Ces résultats indiquent que les métaux restent très probablement majoritairement chélatés par la Pvd. Cette chélation permet de protéger la bactérie de la toxicité du métal. Ce dernier ne pouvant pas diffuser dans le cytoplasme ou interagir avec des protéines.

### **Conclusion du chapitre :**

Durant cette thèse, nous avons identifié la pompe à efflux PvdRT-OpmQ impliquée dans la sécrétion de la Pvd néosynthétisée. Cette pompe est donc impliquée dans l'excrétion de Pvd nouvellement synthétisée (Hannauer et al., 2010) et le recyclage vers le milieu extracellulaire de la Pvd ayant transporté du fer (Imperi et al., 2009; Yeterian et al., 2010). Dans les deux cas, la Pvd est prise en charge par la pompe au niveau du périplasme et transportée à travers la membrane externe vers le milieu extracellulaire. Nous avons

également montré que la biosynthèse de la Pvd implique un précurseur ayant une chaîne grasse de 14 carbones qui permet probablement l'ancrage du sidérophore dans les membranes durant la biosynthèse. Cette chaîne doit être hydrolysée par l'acylase PvdQ avant la sécrétion du sidérophore vers le milieu extracellulaire par PvdRT-OpmQ. PvdRT-OpmQ est seulement le deuxième exemple de pompe à efflux identifié dans la sécrétion de sidérophores néosynthétisés. Le premier exemple est la pompe TolC impliquée dans la sécrétion de l'entérobactine chez *E. coli*

Nous avons également montré qu'en plus d'intervenir dans le recyclage de la Pvd, cette pompe à efflux est aussi impliquée dans le contrôle de la sélectivité du métal transporté par la voie Pvd. En effet, dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate les différents métaux et les complexes Pvd-métaux, ainsi formés sont transportés dans la bactérie par le récepteur de membrane externe FpvA. La pompe qui excrète la Pvd néosynthétisée, la Pvd ayant transporté du fer, expulse également du périplasma les complexes Pvd-métaux autre que le complexe Pvd-Fe, contrôlant ainsi la sélectivité du métal transporté par la voie FpvA/Pvd. Dans le cas du complexe Pvd-Fe, la pompe peut également intervenir lorsque un excès de ce composé a été transporté par FpvA, puisque la délétion de *pvdRTopmQ* entraîne une accumulation de Pvd-Fe. Les différents complexes Pvd-métaux transporté par FpvA reste majoritairement sous forme de complexe et ne se dissocie pas dans le périplasma, car la toxicité de ces métaux n'est pas augmentée de manière dramatique en absence d'expression de PvdRT-OpmQ. En contrôlant la sélectivité de transport vis-à-vis du métal de la voie d'acquisition du fer via la Pvd, on peut considérer que PvdRT-OpmQ joue également un rôle dans la tolérance aux métaux chez *P. aeruginosa*. Une telle fonction n'avait jamais été décrite auparavant pour une pompe à efflux.



**Chapitre 5 :**  
**Étude du mécanisme de transport du fer via la Pvd chez *P.***  
***aeruginosa***  
(Résultats complémentaires)



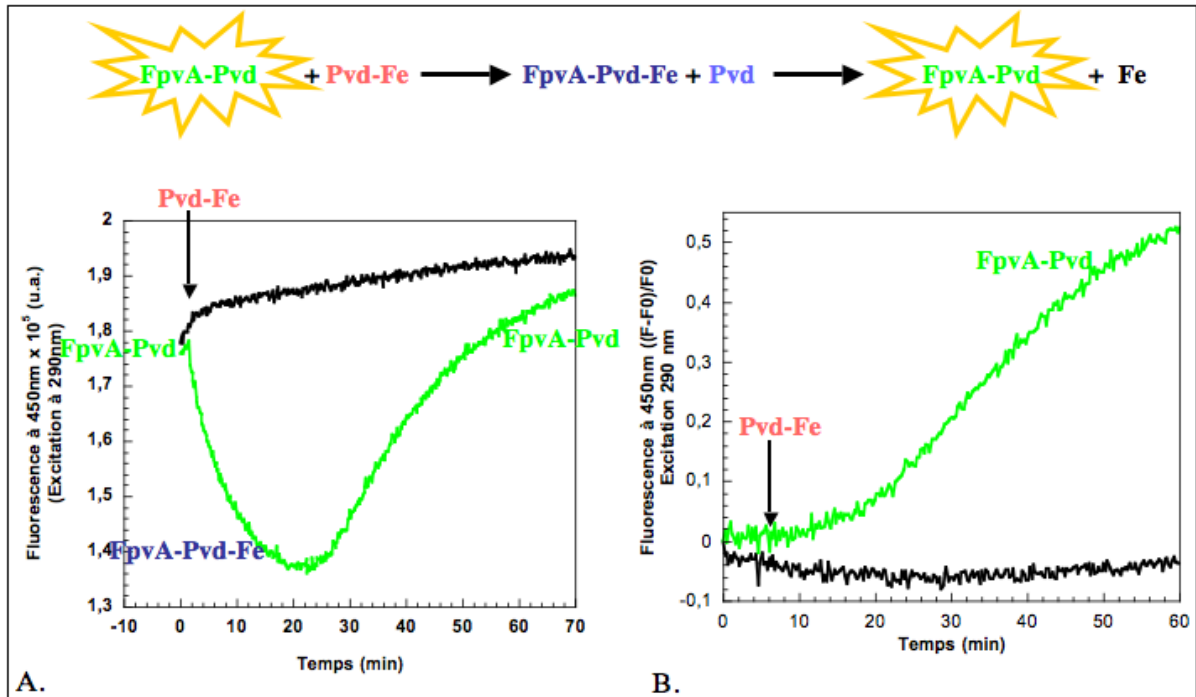
## **Étude du signal de FRET lors de l'acquisition du fer par la Pvd**



## I. Introduction

Un des atouts de la Pvd par rapport aux autres sidérophores est sa capacité à faire du transfert d'énergie de fluorescence (FRET) avec les Trps des protéines (Folschweiller et al., 2002; Schalk et al., 1999). Ces propriétés spectrales permettent de suivre *in vivo* et en temps réel le transport du fer chez cette bactérie (Figure 38A)(Schalk et al., 2001). Le signal de transport se caractérise dans une souche sauvage tout d'abord par une baisse de fluorescence suivie d'une réaugmentation pour atteindre à nouveau la ligne de base (Figure 38A). La baisse de fluorescence correspond à la formation du complexe FpvA-Pvd-Fe (Clement et al., 2004). En effet, en absence de fer, tous les récepteurs FpvA à la surface de la cellule bactérienne sont fluorescents lorsque excités à 290 nm (Schalk et al., 1999). Ce FRET avait tout d'abord été attribué à la liaison de l'apo Pvd au récepteur FpvA (Schalk et al., 1999), mais nous avons démontré récemment qu'il était dû à la liaison au récepteur FpvA de divers complexes Pvd-métaux fluorescent formés probablement avec des traces de métaux du milieu de culture (Greenwald et al., 2008). Après addition de Pvd-Fe, le complexe ferrique déplace le complexe Pvd-metal fluorescent du site de liaison de FpvA, ce qui se traduit par une diminution de la fluorescence lorsque les bactéries sont excitées à 290 nm (Figure 38A).

La signification biologique de la seconde partie du signal de FRET, la remontée de fluorescence, était moins claire lorsque j'ai démarré cette thèse. Lorsque le transport du fer est suivi par FRET chez une souche mutée pour la production de Pvd, seul la remontée de fluorescence est observée (seconde partie du signal, Figure 38B (Schalk et al., 2002)). Dans une telle souche, la seule source de Pvd, est le complexe Pvd-Fe ajouté aux cellules. Dans ce cas, le récepteur n'est pas chargé en Pvd-metal fluorescent et l'on n'observe pas de diminution de fluorescence lors de la formation du complexe FpvA-Pvd-Fe. En revanche la remontée de fluorescence est toujours observée. Elle est donc dû à une interaction entre la Pvd qui vient de libérer le fer dans la bactérie et une protéine possédant des Trp. Cette protéine pourrait être le récepteur FpvA, et le signal observé pourrait correspondre à la liaison de Pvd recyclé dans le milieu extracellulaire par PvdRT-OpmQ au récepteur FpvA. Afin de vérifier que cette protéine est ou n'est pas le récepteur FpvA, nous avons étudié, dans le cadre de cette thèse, le transport du fer avec une souche mutée pour la production de Pvd et ayant une délétion des trois gènes *pvdRT-opmQ* codant pour la pompe à efflux. Un tel mutant ne peut plus exporter le sidérophore et pourra ainsi nous indiquer si la protéine impliquée dans le FRET est FpvA, la pompe à efflux ou une autre protéine.

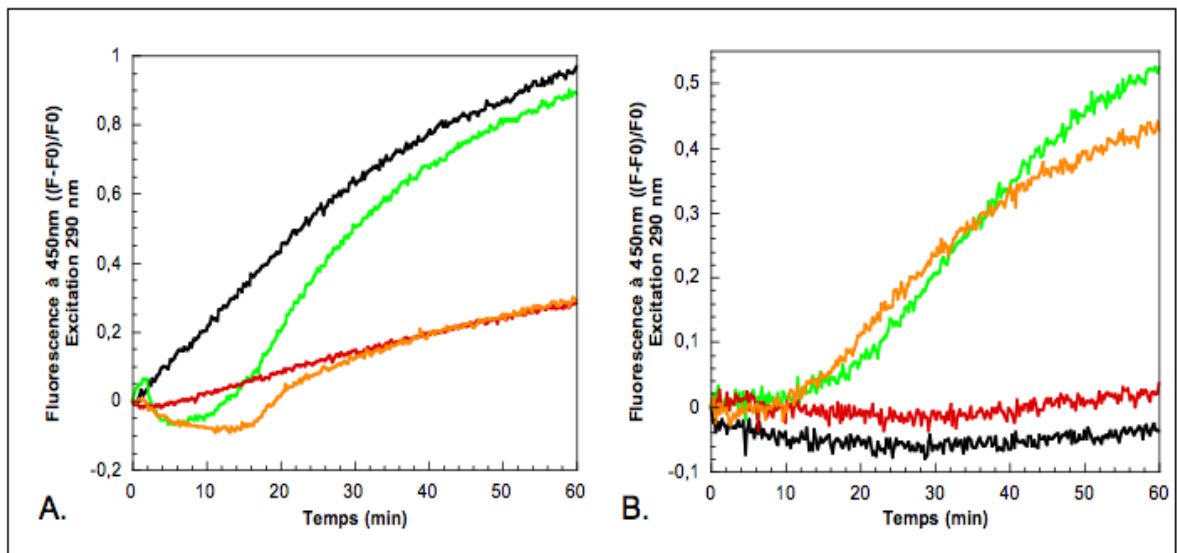


**Figure 38 :** Visualisation par FRET des interactions FpvA-Pvd et FpvA-Pvd-Fe avec les différentes protéines lors du transport du fer par la Pvd

Des cellules produisant la Pvd et surexprimant le récepteur FpvA (A : PAO1(pPVR2) (Schalk et al., 1999)) et des cellules déficientes dans la production de Pvd (B : PAOpvdD) sont resuspendues dans du tampon Tris HCl 50 mM à pH8 à une DO à 600 nm de 1 et l'émission de fluorescence est mesurée à 447 nm (excitation à 290 nm). L'expérience est réalisée en absence de fer (cinétique en noir) et en présence de 150 nM de Pvd-Fe (cinétique en vert). La flèche indique l'addition du complexe Pvd-Fe.

## II. Résultats et discussions

Le signal de FRET observé en présence de Pvd-Fe pour le mutant délété pour les gènes *pvdRT-opmQ* a le même type d'allure avec les deux étapes, baisse de fluorescence puis augmentation, que celui observé pour la souche sauvage (Figure 39). En revanche, l'amplitude du signal est beaucoup plus faible et la cinétique de la première est nettement ralentie. L'expérience répétée dans les souches non-productrices de Pvd (Figure 39 B) confirme que la cinétique de la seconde étape (remontée de fluorescence) n'est pas affectée. La présence des deux étapes, baisse de fluorescence et remonté de fluorescence, pour le mutant producteur de Pvd et délété pour les gènes *pvdRT-opmQ*, indiquent que ni FpvA ni la pompe à efflux sont impliqués dans ce FRET. La protéine impliquée dans ce FRET doit être périplasmique ou insérée dans la membrane interne. Cette protéine pourrait être une protéine intervenant dans la dissociation du complexe Pvd-Fe ou une chaperonne amenant l'apo-Pvd à la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. De précédentes études avaient permis de montrer que la cinétique de dissociation du complexe Pvd-Fe est indépendante de la concentration de Pvd-Fe (Greenwald et al., 2007). Le FRET entre l'apo Pvd et cette protéine non identifiée démarre un court laps de temps après la dissociation. Ce délai augmente avec la quantité de Pvd-Fe ajoutée aux cellules. Ces observations suggèrent que le signal de FRET observé pourrait impliquer une protéine chaperonne interagissant avec la Pvd libérée après la dissociation du complexe Pvd-Fe. Cette protéine pourrait intervenir dans la séquestration de la Pvd, jusqu'à ce que celle-ci soit recyclée dans le milieu extracellulaire, afin d'éviter la reformation du complexe Pvd-Fe dans le périplasma. L'une des protéines pouvant potentiellement intervenir dans ce mécanisme de FRET est la protéine FpvF. De récentes études de spectrométrie de masse effectuée au laboratoire ont en effet montré que cette protéine qui possède des Trp est capable de lier le complexe Pvd-Fe ou l'apo Pvd, mais aucun FRET n'a été observé lorsque la protéine FpvF purifiée a été incubée en présence d'apo Pvd *in vitro*. Mais le complexe formé *in vitro* a peut être une conformation différente ne permettant pas le FRET ou alors c'est une autre protéine qui est impliquées dans ce signal de FRET *in vivo*.



**Figure 39 :** Suivi du transport du complexe Pvd-Fe par FRET dans des mutants de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ.

A. Visualisation du transport du fer dans des souches productrices de Pvd. Des cellules PAO1 (courbe en vert) et PAO1pvdRTopmQ (courbe en orange) sont lavées puis resuspendues à une DO à 600 nm de 1 dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 puis incubées à 29°C. Après l'ajout de 150 nM de Pvd-Fe, l'émission de fluorescence est mesurée toute les 300 ms pendant 1h avec une excitation à 290 nm. L'expérience est répétée sans ajout de Pvd-Fe (PAO1 courbe en noire et PAOpvdRTopmQ en rouge).

B. Visualisation du transport du fer dans des souches déficientes pour la production de Pvd. L'expérience est effectuée comme dans B avec PAO1pvdD (courbe en vert) et PAOpvdDpvdRTopmQ (courbe en orange). L'expérience est répétée en l'absence de Pvd-Fe (P AO1pvdD courbe en noire et PAOpvdDpvdRTopmQ courbe en rouge).



**Étude du mécanisme de translocation du complexe Pvd-Fe à  
travers FpvA.**



## I. Introduction

La première structure de récepteur de sidérophore a été publiée en 1998 et depuis les structures de 6 récepteurs de sidérophores ont été résolues et au total 16 structures différentes avec différents ligand ont été résolues. Tous ces récepteurs sont constitués d'un tonneau  $\beta$  d'environ 40 Å de diamètre obturé par un domaine globulaire appelé bouchon. Aucun canal n'est présent dans ces structures pour permettre le passage d'un ferrisidérophore. Ce canal se forme très probablement uniquement sous l'action de la protéine TonB et de la force proton motrice. Le mécanisme impliqué reste toujours méconnu à l'heure actuel et différents scénarios sont proposés (voir page 29 du chapitre 2).

Notre équipe, depuis quelques années, essaie d'élucider ce mécanisme. Différentes approches ont été utilisées, tout d'abord avec des analogues photoactivables de la Pvd. L'objectif dans cette approche était de marquer des résidus du canal durant le passage du sidérophore photoactivable (Schons et al., 2005). Malheureusement les taux de marquages obtenus n'ont pas permis d'aller à l'identification des résidus alkylés. Par biologie moléculaire, Mirella Nader a durant sa thèse, cloné et surexprimé les différents domaines de FpvA (Nader et al., 2011). Cette étude a montré, que le tonneau  $\beta$  exprimé en absence du bouchon était correctement inséré dans la membrane externe, mais était incapable de transporter ou de lier le complexe Pvd-Fe. Le site de liaison de la protéine doit être inaccessible soit parce que les boucles extracellulaires ferment le canal, soit parce que le tonneau est comprimé dû à la pression exercée par les lipides de la membrane externe. Le tonneau et le bouchon ont également été exprimé séparément dans une même souche : le tonneau a été cloné au niveau du chromosome et le bouchon sur un plasmide et ceci dans une même souche. Les études fonctionnelles ont montré qu'un récepteur reconstitué et fonctionnel se trouvait dans la membrane externe d'une telle souche. Ce récepteur reconstitué est capable de lier le complexe Pvd-Fe avec la même affinité que la souche sauvage et de le transporter dans la cellule avec cependant une efficacité plus faible qu'un récepteur sauvage. Cette étude indique que les deux domaines tonneau et bouchon peuvent s'assembler *in vivo* de manière à former un récepteur fonctionnel.

Durant cette thèse, nous avons voulu aller plus loin dans la compréhension du fonctionnement des récepteurs de sidérophores, en utilisant toujours comme modèle le récepteur FpvA. Le récepteur FpvA possède 17 Trps dans sa séquence, mais tous ces Trps

sont localisés dans le tonneau. Aucun Trp n'est présent dans le bouchon. Nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme de transport pouvait impliquer une migration totale ou partielle du bouchon en interaction avec la Pvd-Fe, de sa position dans le tonneau vers le périplasma, le ferrisidérophore étant entraîné par le bouchon durant cette migration vers le périplasma. Le bouchon serait comme un ascenseur pour le complexe Pvd-Fe. Pour vérifier ce mécanisme, nous avons introduit des Trps dans le bouchon. Si une interaction entre la Pvd-Fe et le bouchon existe dans le périplasma, la présence de Trps dans le bouchon et les propriétés de la Pvd et du complexe Pvd-Ga à faire du FRET avec les Trp devrait permettre de visualiser cette interaction par FRET. En effet, le complexe Pvd-Ga est fluorescent et est transporté par FpvA avec la même efficacité que Pvd-Fe (Folschweiller et al., 2002). Pour ce faire, nous avons substitué des résidus tyrosine (Y) ou phénylalanine (F) du bouchon par des tryptophanes (W). En tout, 9 résidus tyrosines ou phénylalanines sont présents sur le bouchon, mais seuls 4 ont pu être substitués par des tryptophanes.

## II. Résultats et discussions

### A. Localisation des mutations sur le bouchon et effet sur le transport du fer

Nous avons prévu de muter les résidus suivants F180, Y200, Y207, Y208, F212, F217, Y219, Y231 et Y243. Seuls 5 mutations (F180W ; Y200W ; Y207W ; F212W ; Y219W) ont été obtenues sur les 9 envisagés. Les positions 180 et 219 du bouchon sont plus enfouies dans le tonneau, les positions 200, 207 et 212 sont plutôt à la surface du récepteur près du site de liaison (Figure 40).



**Figure 40 : Localisation des différentes mutations sur le bouchon**

Les mutations F180W, Y200W, Y207W, F212W et Y219W sont représentées respectivement en bleu foncé, en jaune, en orange, en bleu ciel et en rose foncé.

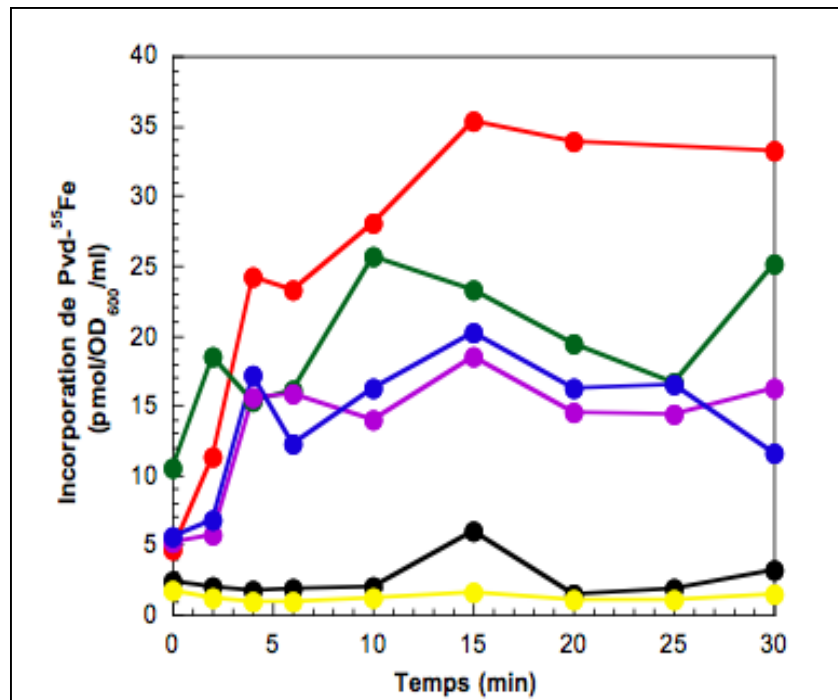
Les différents gènes mutés ont été clonés dans le plasmide pUCP18. Nous avons transformé en parallèle des souches  $\Delta fpvA$  et  $\Delta fpvA/pvdF$  (souche muté pour la production de Pvd). Malheureusement, aucune colonie n'a été obtenue en transformant avec le plasmide portant la mutation Y207W. Cette construction n'est peut-être pas viable *in vivo*.

Les différents inserts mutés ont aussi été amplifiés par PCR et introduit dans le plasmide pET20b(+) en phase avec la séquence *pelB* et une étiquette histidine en vue de purifier indépendamment chacune des protéines.

### B. Capaciter à transporter le $^{55}\text{Fe}$ en présence de Pvd

Le mutant  $fpvA(Y200W)$  ne transporte pas le  $^{55}\text{Fe}$  en présence de Pvd (Figure 41). La substitution du résidu en position 200 du bouchon altère apparemment la capacité du récepteur à transporter le complexe Pvd-Fe. En effet, la structure aux rayons X de FpvA-Pvd-

Fe indique que ce résidu est impliqué dans la liaison du complexe Pvd-Fe (Cobessi et al., 2005a). Un transport du fer a été observé pour les 3 autres mutants (F180W, F212W, Y219W) mais avec une efficacité moins importante que la souche sauvage (Figure 41).



**Figure 41 :** Incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  par les différentes souches PAO1fpvA(F180W), PAO1fpvA(Y200W), PAO1fpvA(F212W), PAO1fpvA(Y219W),

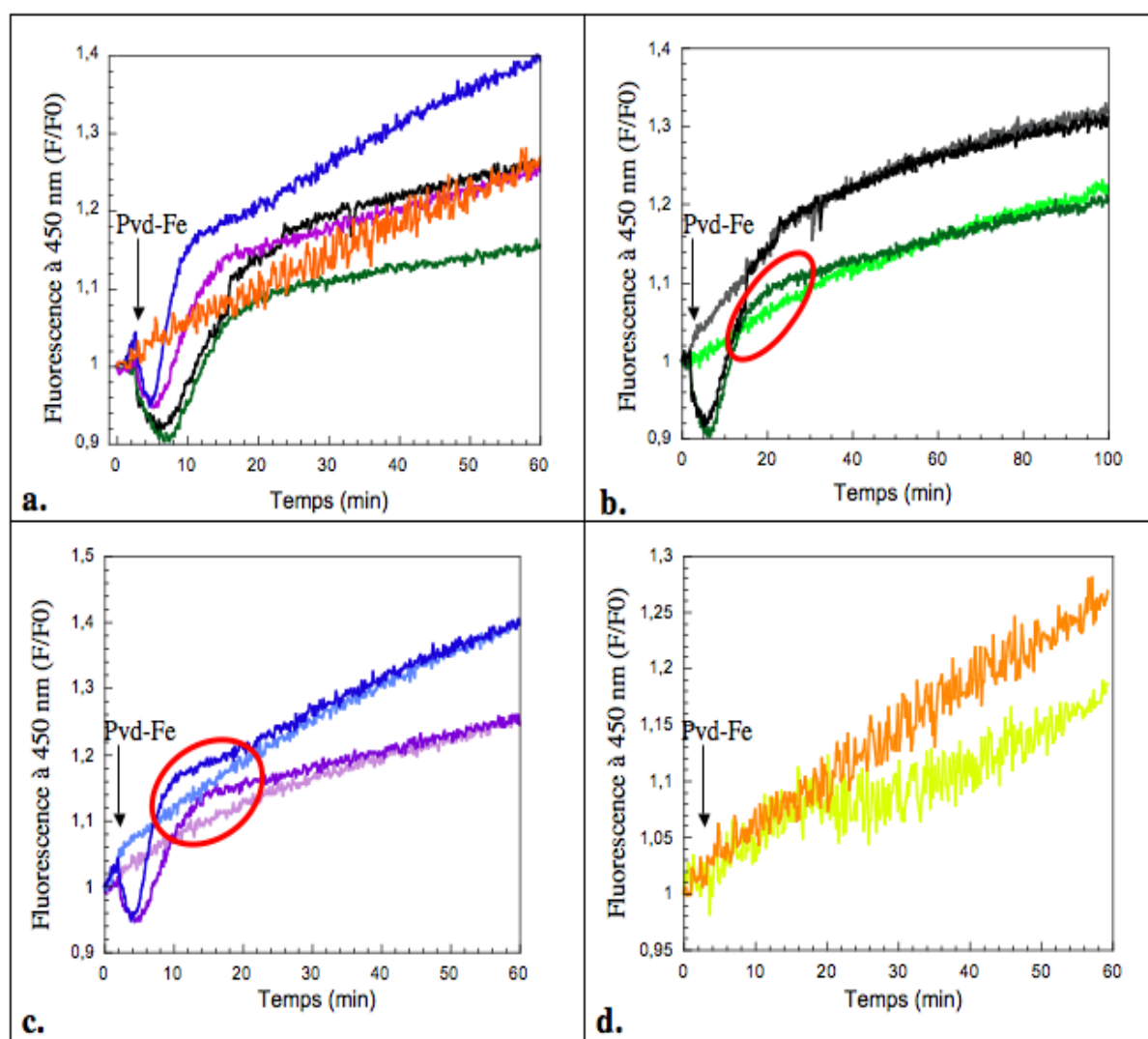
Les différentes souches sont lavées et resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1. Le transport est initié en ajoutant 100 nM de complexe Pvd- $^{55}\text{Fe}$  et 100  $\mu\text{l}$  de cette suspension sont prélevés à différents temps. L'expérience correspondant à la souche sauvage PAO1 est représentée en rouge. L'expérience a été répétée en présence du protonophore CCCP (cinétique en noire). Les cinétiques correspondant aux mutants PAO1fpvA(F180W), PAO1fpvA(Y200W), PAO1fpvA(F212W) et PAO1fpvA(Y219W) sont représentés respectivement en vert, jaune, mauve et bleu.

### C. Transport suivi par FRET

Les capacités de la Pvd à faire du FRET avec les Trps des protéines ont également été utilisées pour suivre le transport du fer par les mutants. Pour les 3 mutants capables d'incorporer du  $^{55}\text{Fe}$  en présence de Pvd, un signal de FRET très semblable à la souche sauvage a été observé : une baisse de fluorescence correspondant à la formation du complexe FpvA-Pvd-Fe, suivie d'une remontée de fluorescence (Figure 42a). Cependant, concernant cette seconde partie du signal, pour les trois mutants, une légère différence dans l'allure du profil a été observée comparé aux cellules sauvages. La remontée de fluorescence dépasse légèrement la ligne de base pour finalement se superposer à cette courbe quelques minutes plus tard (Figure 42b-c). Cette variation de fluorescence ou cette bosse n'a jamais été observée avec les souches sauvages et pourrait être dû à un signal de FRET entre l'apo Pvd

(Pvd-Fe n'étant pas fluorescent) et les Trps introduits au niveau du bouchon. L'équipe a montré dans des travaux précédents que le fer se dissocie de la Pvd dans le périplasma (Greenwald et al., 2007; Yeterian et al., 2010). Ceci nous conduit à émettre l'hypothèse que la dissociation du fer de son sidérophore se déroule dans le périplasma mais avec un sidérophore toujours lié au bouchon du récepteur.

Le mutant PAO1*fpvA*(Y200W) (Figure 42d, courbe en jaune) quant à lui ne présente pas de variation de fluorescence caractéristique du transport du fer via la Pvd, confirmant que cette mutation affecte la capacité du récepteur à transporter Pvd-Fe.



**Figure 42 :** Suivi du transport du complexe Pvd-Fe par FRET dans les souches PAO1*fpvA*(F180W), PAO1*fpvA*(Y200W), PAO1*fpvA*(F212W), PAO1*fpvA*(Y219W)

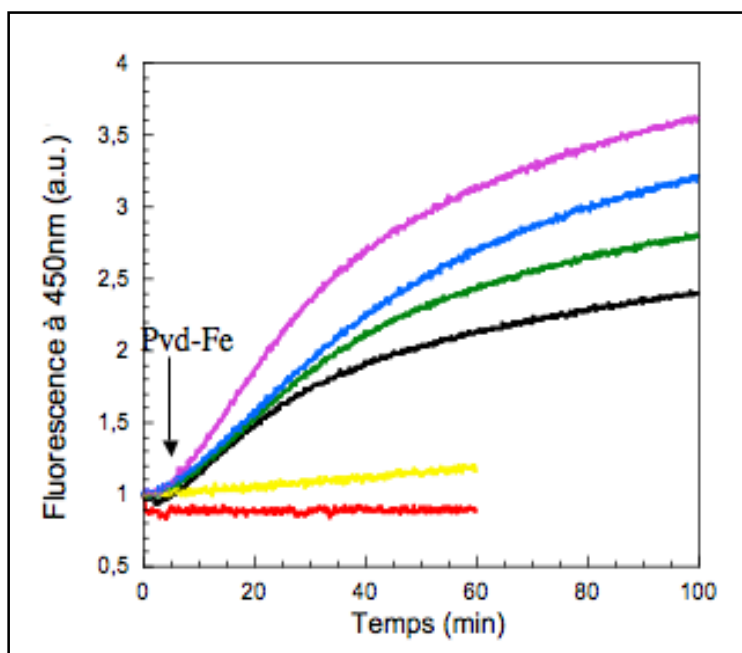
Les cellules sont resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1 et l'émission de fluorescence est mesurée à 400 nm (excitation à 290 nm). Le transport est initié par l'ajout de 150 nM de complexe Pvd-Fe (le moment de l'ajout est indiqué par une flèche). A : PAO1*fpvA*(*fpvA*) (noir), PAO1*fpvA*(F180W) (vert), PAO1 *fpvA*(Y200W) (orange), PAO1*fpvA*(F212W) (mauve) et PAO1*fpvA*(Y219W) (Bleu) (Bleuel et al.). B : PAO1*fpvA*(*fpvA*) avec (noir) et sans Pvd-Fe gris et PAO1*fpvA*(F180W) avec (vert foncé) et sans (vert clair) Pvd-Fe. C : PAO1*fpvA*(F212W) avec (mauve foncé) et sans (mauve clair) Pvd-Fe et PAO1*fpvA*(Y219W) avec (bleu foncé) et sans (bleu clair) Pvd-Fe. D : PAO1*fpvA*(Y200W) avec (orange) et sans (jaune) Pvd-Fe.

#### **D. Effet des mutations sur la cinétique de dissociation du complexe Pvd-Fe.**

Le fait que seul l'apo Pvd soit fluorescente et non la forme ferrique permet de suivre *in vivo* et en temps réelle la cinétique de dissociation du fer de son sidérophore. Ceci implique néanmoins d'utiliser de souches non productrices de Pvd afin de s'affranchir de la fluorescence de la Pvd neosynthétisée. Après addition de Pvd-Fe (complexe non-fluorescent), l'émission de fluorescence est suivie à 450 nm avec une excitation à la longueur d'onde d'absorption du sidérophore (400 nm). Pour les mutants capables de transporter le  $^{55}\text{Fe}$  (Figure 41) une augmentation de fluorescence est observée en fonction du temps très similaire à celle observée pour la souche sauvage (Figure 43). Pour PAO1 $fpvA$ (F212W), il semble que la cinétique soit plus rapide, mais d'autres expériences sont encore à faire avant de pouvoir conclure sur ce point. De précédentes études cinétiques réalisées au laboratoire avaient montré que l'étape limitante dans l'acquisition du fer par la Pvd, n'est pas la cinétique de dissociation du fer de son sidérophore, mais l'étape de translocation à travers la membrane externe via le récepteur FpvA (Greenwald et al., 2007). Une cinétique de dissociation du fer plus rapide pour le mutant PAO1 $fpvA$ (F212W) implique très probablement que ce récepteur est capable de transporter plus rapidement le complexe Pvd-Fe à travers la membrane externe. La position de cette mutation sur FpvA ne permet pas avec l'état actuel des connaissances concernant ce transporteur de proposer une explication à cette possible augmentation de la cinétique de transport.

Pour les deux autres mutants (F180W et Y219W), les cinétiques de dissociation du complexe Pvd-Fe sont équivalentes à la souche sauvage, sauf qu'il semblerait que plus d'apo Pvd se forment. D'autres tests cinétiques sont nécessaires, avec différentes concentrations de Pvd-Fe pour vérifier cette observation.





**Figure 43 :** Suivi de la dissociation du complexe Pvd-Fe dans les souches *PAO1pvdFfpvA(F180W)*, *PAO1pvdFfpvA(Y200W)*, *PAO1pvdFfpvA(F212W)*, *PAO1pvdFfpvA(Y219W)*

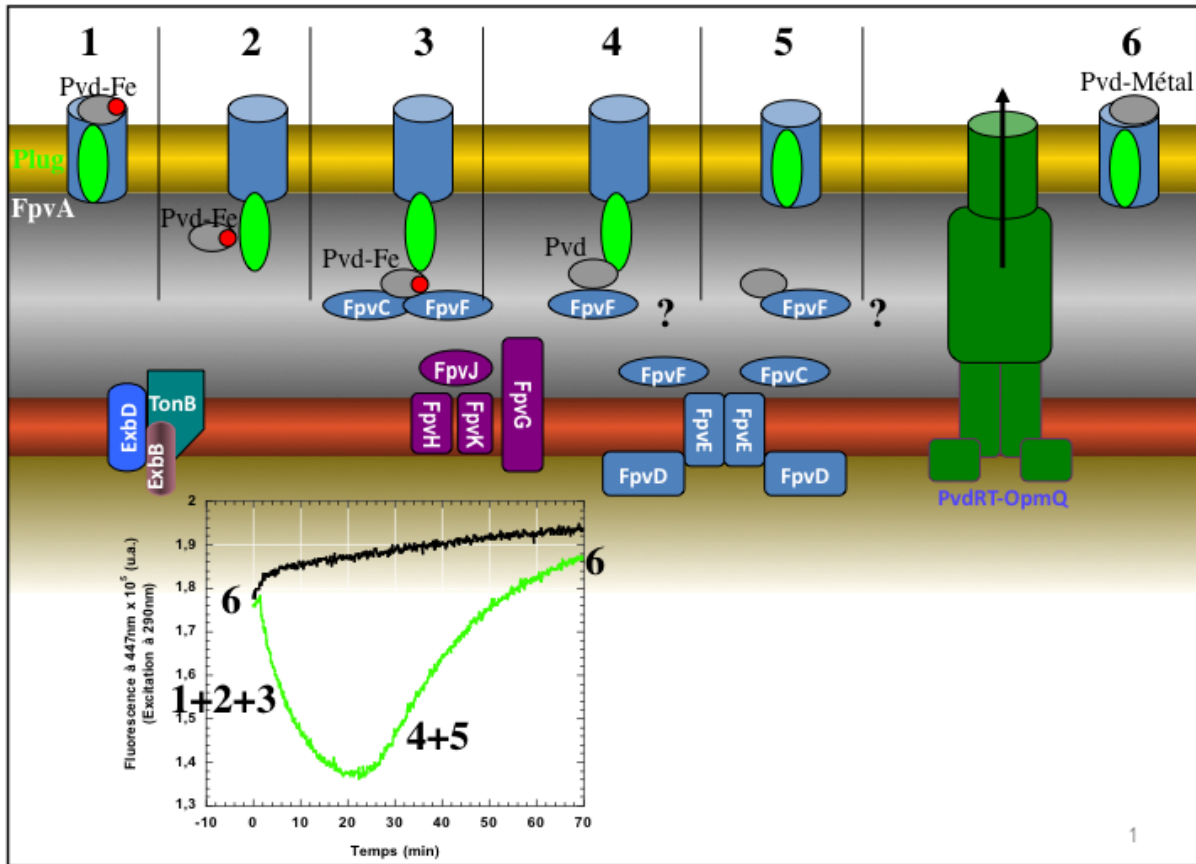
Les souches (*PAO1pvdFfpvA* en rouge ; *PAO1pvdFfpvA(fpvA)* en noir ; *PAO1pvdFfpvA(F180W)* en vert ; *PAO1pvdFfpvA(Y200W)* en jaune, *PAO1pvdFfpvA(F212W)* en mauve et *PAO1pvdFfpvA(Y219W)* en bleu) sont resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1 et l'émission de fluorescence mesurée à 447 nm (excitation à 280 nm). Le transport est initié par l'ajout de 150 nM de complexe Pvd-Fe aux cellules (le moment de l'ajout est indiqué par la flèche).

### Conclusion du chapitre :

Les études effectuées durant cette thèse ont permis d'avancer dans la compréhension du signal de fluorescence observé à 447 nm (excitation à 280 nm), lorsque *P. aeruginosa* est incubée en présence de Pvd-Fe. Nous savions déjà que la première étape (baisse de fluorescence) est due à la formation du complexe FpvA-Pvd-Fe à la surface des cellules. Durant cette thèse, nous avons montré que la seconde étape était due à une interaction entre une protéine non-identifiée et probablement périplasmique avec l'apo sidérophore formé après dissociation du métal. En introduisant des Trp dans le bouchon du récepteur FpvA, l'amplitude de la seconde partie du signal de FRET augmente légèrement, suggérant une interaction entre apo Pvd et ce domaine de FpvA durant le transport. Une telle interaction ne peut s'expliquer que si le complexe Pvd-Fe se dissocie dans le périplasme en interaction avec le domaine bouchon. Karl Brilllet a montré récemment au laboratoire que le complexe Pvd-Fe se lie avec les deux protéines périplasmique FpvC et FpvF. Ces deux protéines seraient donc également impliquées dans cette étape ainsi que FpvG, une protéine de fonction encore

inconnue, mais dont la mutation inhibe totalement la dissociation du complexe Pvd-Fe. Est ce que toutes ces protéines forment un complexe multiprotéique lié au domaine bouchon de FpvA durant l'étape de dissociation du fer de son sidérophore ? Clairement d'autres études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Après dissociation du fer de la Pvd, on peut ensuite imaginer une dissociation de l'apo Pvd du bouchon de FpvA pour interagir avec la protéine non identifiée du périplasme responsable de la remontée de fluorescence observée à 447 nm lorsque les bactéries sont excitées à 280 nm en présence de Pvd-Fe (Figure 44). Le fer serait pris en charge par une protéine périplasmique.

Pour progresser dans la compréhension de ce mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe par FpvA et ensuite le mécanisme de dissociation du fer du sidérophore il faudrait dans un premier temps purifier le domaine bouchon ayant les mutations (F180W ; Y200W ; Y207W ; F212W ; Y219W) pour vérifier *in vitro* que ces protéines sont capables de lier le complexe Pvd-Fe ainsi que l'apo Pvd et que ces liaisons se traduisent par un signal en FRET (excitation à 290 nm et mesure de l'émission de fluorescence à 450 nm). Vu que nous savons purifier les protéines FpvF et FpvC et que de plus nous avons des anticorps contre ces protéines, il serait intéressant d'étudier les interactions protéine-protéine entre FpvA ou le domaine bouchon et ces deux protéines périplasmiques. Ceci peut être fait par immunoprécipitation ou éventuellement par spectrométrie de masse.



**Figure 44 : Schéma récapitulatif du mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe à travers le récepteur FpvA.** Le complexe Pvd-Fe se fixe au récepteur spécifique de membrane externe FpvA (1). Cette fixation provoque le déplacement du complexe Pvd-métal préalablement fixé sur le récepteur. Le complexe Pvd-Fe est ensuite transporté vers le périplasma de la bactérie à travers le récepteur FpvA grâce à l'énergie de la force proton motrice fournie par le complexe TonB-ExBb-ExbD (2). Dans le périplasma, le complexe Pvd-Fe serait reconnu par les protéines FpvC et FpvF qui sont associés au transporteur de type ABC codés par les gènes FpvCDEF (3). Ces deux protéines permettraient la dissociation du complexe Pvd-Fe tout en restant fixé au bouchon du récepteur FpvA (4) . La dissociation serait probablement effectuée par les protéines FpvG-H-J-K. La Pvd libre serait ensuite prise en charge par la protéine FpvF qui l'emmènerai vers la pompe à efflux afin qu'elle soit recyclée (5). Le transporteur reprendrait ensuite sa conformation initiale.



**Chapitre 6 :**  
**Etude de la voie d'acquisition du fer par le desferrichrome**  
**chez *P. aeruginosa***  
(Article 3)



### **Article 3**

**Identification de la voie d'acquisition du fer par le ferrichrome  
chez *P. aeruginosa***

**The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*  
involves iron release mechanism with acetylation of the  
siderophore and recycling of the modified desferrichrome**

Melissa Hannauer, Yaniv Barda, Gaëtan L. A. Mislin, Abraham Shanzer and  
Isabelle J. Schalk





## I. Introduction de l'article 3

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction bibliographique, *P. aeruginosa* possède dans son génome de nombreuses voies d'acquisition du fer. Elle est capable de produire deux sidérophores la Pvd et la Pch, mais est également capable d'utiliser de nombreux sidérophores exogènes, produits par d'autres micro-organismes : l'entérobactine, le desferrichrome, la desferrioxamine, le citrate ou encore la cépabactine. Les voies de transport du fer via la Pvd et la Pch ont été très étudiées ces dernières années. En revanche, quasiment rien n'est connu des voies de transport utilisant des sidérophores exogènes.

La voie de transport utilisant le desferrichrome chez *E. coli* a été une des voies les plus étudiées des 30 dernières années et est considérée comme l'archétype dans le domaine. Au cours de cette thèse, nous avons étudié la voie du desferrichrome chez *P. aeruginosa* afin de comparer les similitudes et les différences avec les mécanismes décrits chez *E. coli*. L'un des objectifs étant de voir dans quelle mesure les mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer par un sidérophore donné sont conservés au niveau des espèces bactériennes. Dans cette étude, nous avons utilisé le ferrichrome ainsi qu'un analogue fluorescent du ferrichrome synthétisé par l'équipe d'A. Shanzer (Weizmann Institut, Israël).



## The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome<sup>∇†</sup>

Mélicha Hannauer,<sup>1</sup> Yaniv Barda,<sup>2</sup> Gaëtan L. A. Mislin,<sup>1</sup> Abraham Shanzer,<sup>2</sup> and Isabelle J. Schalk<sup>1\*</sup>

Métaux et Microorganismes: Chimie, Biologie et Applications, FRE 3211 CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France,<sup>1</sup> and Department of Organic Chemistry, The Weizmann Institute of Science, P.O. Box 26, Rehovot 76100, Israel<sup>2</sup>

Received 24 November 2009/Accepted 18 December 2009

The uptake of iron into *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by two major siderophores produced by the bacterium, pyoverdine and pyochelin. The bacterium is also able to utilize several heterologous siderophores of bacterial or fungal origin. In this work, we have investigated the iron uptake in *P. aeruginosa* PAO1 by the heterologous ferrichrome siderophore. <sup>55</sup>Fe uptake assays showed that ferrichrome is transported across the outer membrane primarily (80%) by the FiuA receptor and to a lesser extent (20%) by a secondary transporter. Moreover, we demonstrate that like in the uptake of ferripyoverdine and ferripyochelin, the energy required for both pathways of ferrichrome uptake is provided by the inner membrane protein TonB1. Desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake in *P. aeruginosa* was also dependent on the expression of the permease FiuB, suggesting that this protein is the inner membrane transporter of the ferrisiderophore. A biomimetic fluorescent analogue of ferrichrome, RL1194, was used *in vivo* to monitor the kinetics of iron release from ferrichrome in *P. aeruginosa* in real time. This dissociation involves acylation of ferrichrome and its biomimetic analogue RL1194 and recycling of both modified siderophores into the extracellular medium. FiuC, an *N*-acetyltransferase, is certainly involved in this mechanism of iron release, since its mutation abolished desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake. The acetylated derivative reacts with iron in the extracellular medium and is able to be taken up again by the cells. All these observations are discussed in light of the current knowledge concerning ferrichrome uptake in *P. aeruginosa* and in *Escherichia coli*.

Iron is essential for life for practically all living organisms and plays a number of key roles in biology. DNA and RNA synthesis, glycolysis, energy generation by electron transport, nitrogen fixation, and photosynthesis are examples of processes in which iron-containing enzymes play vital roles. However, under physiological conditions iron forms highly insoluble ferric hydroxide complexes, which severely limits its bioavailability. To overcome the problem of iron inaccessibility, bacteria excrete high-affinity iron chelators termed siderophores, which are able to solubilize iron and deliver it into the cells (3, 64).

*Pseudomonas aeruginosa* is a ubiquitous environmental bacterium that is capable of infecting a wide variety of animal, insects, and plants. As a human pathogen, *P. aeruginosa* is the leading source of Gram-negative nosocomial infections (59) and causes chronic lung infections in approximately 90% of individuals suffering from cystic fibrosis (40). Under iron-limited conditions, *P. aeruginosa* produces two major siderophores, pyoverdine (PVD) (62) and pyochelin (PCH) (15). *P. aeruginosa* is also capable of utilizing numerous siderophores secreted by other microorganisms: pyoverdins from other pseudomonas, enterobactin (49), cepabactin (45), mycobactin and carboxymycobactin (38), fungal siderophores (ferrichrome [39]; deferrioxamines [39, 60]; and desferrichrysin,

desferricrocin, and coprogen [44]), and natural occurring chelators such as citrate (14, 23) (for a review, see reference 47).

In Gram-negative bacteria, the uptake of ferrisiderophores always involves a specific transporter at the level of the outer membrane (4). The energy required for this process is provided by the proton motive force (PMF) of the inner membrane by means of an inner membrane complex comprising TonB, ExbB, and ExbD (21, 51, 63). *In silico* analysis of the *P. aeruginosa* genome (<http://www.pseudomonas.com>) revealed 32 genes encoding putative TonB-dependent transporters (13), of which only 12 are involved in metal (mostly iron) uptake (38). FpvA and FpvB are the outer membrane transporters involved in the uptake of PVD-Fe (19, 48), and FptA transports PCH-Fe (25). Concerning the heterologous siderophores, there are two transporters, FoxA and FiuA, involved in the transport of ferrioxamine B and ferrichrome (39). The mechanism involved in the translocation of ferrisiderophores across the outer membrane by the TonB-dependent transporters has been studied mostly in *E. coli* (for a review, see reference 5) and in the case of *P. aeruginosa* has been studied only for the FpvA/PVD and the FptA/PCH systems. The structures of FpvA (8, 11, 65) and FptA (12) have been solved and their interactions with PVD and PCH investigated at the molecular level (26, 27, 45, 53). Three *tonB* genes, encoding the energy coupler TonB, have been found in the *P. aeruginosa* genome, i.e., *tonB1*, *tonB2*, and *tonB3*. Disruption of *tonB1* abrogates PVD- and PCH-mediated iron uptake (50, 58) and heme uptake (67). Inactivation of *tonB2* has no adverse effect on iron or heme acquisition, but *tonB1 tonB2* double mutants are more compromised with respect to growth in iron-restricted medium than is a single

\* Corresponding author. Mailing address: Métaux et Microorganismes: Chimie, Biologie et Applications, FRE 3211, ESBS, Blvd. Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France. Phone: 33 3 68 85 47 19. Fax: 33 3 68 85 48 29. E-mail: isabelle.schalk@unistra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 4 January 2010.

*tonB1* knockout mutant (67). Mutation of *tonB3* appears to result in defective twitching motility (28), and the gene product is most likely not involved in iron uptake.

In *P. aeruginosa*, many ferrisiderophore outer membrane transporters are also involved in a signaling cascade regulating the expression of genes involved in iron uptake. This is the case for FpvA (PVD uptake), FoxA (ferrioxamine), and FiuA (ferrichrome) (38, 39, 43, 61). Such a signaling cascade involves an extracytoplasmic function (ECF) sigma factor and an inner membrane anti-sigma factor. Equivalent cell surface signaling is present in *Escherichia coli* for ferricitrate uptake by FecA but not for ferrichrome, ferrioxamine, and enterobactin uptake by FhuA, FhuE, and FepA, respectively.

Little is known about the translocation of ferrisiderophores across the inner membrane in *P. aeruginosa*. In *E. coli*, this step involves a specific ABC transporter for almost every siderophore used by this bacterium: FhuBCD for the uptake of ferrichrome and ferrioxamine (33–36), FecBCD for the uptake of ferricitrate (6, 56) and, FepBCD for the uptake of ferrienterobactin (9). In *P. aeruginosa*, the only characterized inner membrane siderophore transport protein is FptX, a proton motive force-dependent permease, which functions in PCH-Fe utilization (16). The inner membrane FoxB is involved in the utilization of ferrichrome and ferrioxamine B, but it remains to be determined whether this protein functions in the transport of ferrisiderophore or in the release of iron from ferrichrome or ferrioxamine (17). The genome clearly shows a *fepBCDG* homologue for the transport of ferrienterobactin. For the other iron uptake pathways present in *P. aeruginosa*, the transporters involved at the level of the inner membrane have not been identified. An import ABC transporter is present in the *pvd* locus (PA2407 to PA2410; <http://www.pseudomonas.com>), but its mutation does not affect PVD-Fe uptake (46).

In *P. aeruginosa*, the mechanism of ferrisiderophore dissociation has been investigated only for the PVD pathway. This step occurs in the periplasm by a mechanism involving no chemical siderophore modification but involving a reduction of iron and a recycling of the siderophore into the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ efflux pump (20, 54, 66). In *E. coli*, the mechanism of ferrisiderophore dissociation has been investigated for the ferrichrome and ferrienterobactin pathways. Iron release from ferrichrome occurs in the cytoplasm and probably involves iron reduction (41) followed by acetylation of the siderophore and its recycling into the growth medium (24). For the ferrienterobactin pathway, a cytoplasmic esterase hydrolyzes the siderophore (7).

In the present work, we have investigated the ferrichrome pathway in *P. aeruginosa* using both ferrichrome and a fluorescently labeled biomimetic ferrichrome analogue. We evaluated the siderophore properties of the fluorescent analogue and identified the different transporters involved in the uptake across the outer and inner membranes. Furthermore, we demonstrated that following ferrichrome uptake, iron is released from the siderophore by a mechanism involving an acetylation of the chelator and the modified desferrichrome is secreted back into the growth medium.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and siderophores.**  $^{55}\text{FeCl}_3$  was purchased from Perkin-Elmer-Life and Analytical Sciences (Boston, MA). Ferrichrome and the protonophore car-

TABLE 1. Strains used in this study<sup>a</sup>

Species and strain	Description	Reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type	52
PAD07	PVD <sup>-</sup> PCH <sup>-</sup>	57
PAD08	PVD <sup>+</sup> PCH <sup>+</sup> $\Delta\text{tonB}_1$	57
PAD14	PVD <sup>-</sup> PCH <sup>-</sup> $\Delta\text{tonB}_1$	57
PA0470	PVD <sup>+</sup> PCH <sup>+</sup> $\Delta\text{fiuA}$	29
PA0476	PVD <sup>+</sup> PCH <sup>+</sup> $\Delta\text{fiuB}$	29
PA0478	PVD <sup>+</sup> PCH <sup>+</sup> $\Delta\text{fiuC}$	29
<i>E. coli</i> BW25113entB::Kan <sup>r</sup>	Ent <sup>-</sup>	2

<sup>a</sup> PA0470, PA0476, and PA0478 were from the comprehensive *P. aeruginosa* transposon mutant library at the University of Washington Genome Center (29). The location of the mutation was confirmed by PCR with primers flanking the insertion sites. Further information can be found at <http://www.genome.washington.edu/UWGC/Pseudomonas/index.cfm>.

bonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) were purchased from Sigma. PVD was purified and PVD- $^{55}\text{Fe}$  prepared as described previously (1, 55). PCH synthesis and PCH- $^{55}\text{Fe}$  preparation were as reported earlier (45). Tetrahydrofuran (THF) was dried by overnight treatment with KOH and subsequent filtration through basic alumina. Flash column chromatography separations were performed using Silica Gel 60 (230 to 400 mesh) (Merck, Darmstadt, Germany).

**Organic synthesis.** Synthesis of RL1194 was performed as shown in Fig. S1 in the supplemental material, utilizing in part procedures described previously by Meijler et al. (42) and Dayan et al. (18). Sixty-five milligrams (0.3 mmol) of Boc-NHCH<sub>2</sub>-CONOHCH<sub>3</sub> (compound 1) (18) was treated for 30 min at room temperature with a 2:1 mixture of methylene chloride and trifluoroacetic acid (TFA). Removal of excess TFA and solvent resulted in the salt of compound 2, which was used in the next step without further purification. Compound 3 was synthesized as described previously (42). The trifluoroacetate salt of H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CONOHCH<sub>3</sub> dissolved in 5 ml dry THF was added to a solution of 112 mg (0.075 mmol) of compound 3 in 5 ml dry THF. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was purified by flash chromatography using chloroform followed by 7% methanol (MeOH) in chloroform as the eluting solvent, resulting in 35 mg (0.035 mmol, 47%) of RL1194 as a yellow oil: <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 8.58 (d, 1H), 8.51 (d, 1H), 8.40 (d, 1H), 7.72 (t, 1H), 7.48 (broad, 3H), 7.22 (d, 1H), 4.18 (m, 8H), 3.88 (d, 6H), 3.63 (m, 8H), 3.35 (s, 8H), 3.24 (s, 9H), 2.69 (d, 2H), 2.48 (d, 6H), 1.67 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 0.96 (t, 3H); mass spectrum (MS)-ES<sup>+</sup>, *m/z* 1024.52 [M + Na]<sup>+</sup>, MS-ES<sup>-</sup>, *m/z* 1000.53 [M - H]<sup>-</sup>.

**Bacterial strains and growth media.** All of the strains used in this study are presented in Table 1. The strains were grown overnight in a succinate medium [the composition, in g/liter, is as follows: 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, with the pH adjusted to 7.0 by addition of NaOH] in the presence of 50 μg/ml tetracycline and 500 μg/ml streptomycin for PAD07 and PAD14; 50 μg/ml tetracycline for PA0470, PA0476, PA0478, and PAD08; and 50 μg/ml kanamycin and 10% Casamino Acids for BW25113entB::Kan<sup>r</sup>. To obtain expression of the ferrichrome uptake pathway in PAO1, PAD07, PAD08, PAD14, PA0470, PA0476, or PA0478 cells, the bacteria were grown in the presence of 5 μM desferrichrome.

**$^{55}\text{Fe}$  uptake.** To prepare the desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$  and RL1194- $^{55}\text{Fe}$  complexes, 200 μM desferrichrome or RL1194 was incubated for 20 min in the presence of 10 μM  $^{55}\text{Fe}$  in 0.1N HCl. PVD- $^{55}\text{Fe}$  and PCH- $^{55}\text{Fe}$  were prepared as reported previously (45, 55). PVD- $^{55}\text{Fe}$ , desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$ , and RL1194- $^{55}\text{Fe}$  uptake assays were carried out as reported previously for the FpvA/PVD system (55) and that for PCH- $^{55}\text{Fe}$  as described in reference 45. An overnight culture in iron-limited medium was harvested, and the bacteria were prepared at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1 for the PCH- $^{55}\text{Fe}$  uptake assay and of 3 for the other siderophore- $^{55}\text{Fe}$  uptake assays in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and incubated at 37°C. Transport assays were initiated by adding 300 nM PVD- $^{55}\text{Fe}$ , desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$ , or RL1194- $^{55}\text{Fe}$ . Aliquots (100 μl) of the suspension were removed at different times, filtered, and washed with 2 ml 0.5 N HCl, and the retained radioactivity was counted. For PCH- $^{55}\text{Fe}$  uptake (because of interaction of PCH with the filters), aliquots (300 μl) were removed and centrifuged at 12,000 × *g* for 2 min, and the supernatants containing the unbound ferrisiderophore were removed and radioactivity counted. The  $^{55}\text{Fe}$  uptake assays were repeated for all siderophores in the presence of 200 μM CCCP.

**Fluorescence spectroscopy.** Fluorescence experiments were performed on PAD07 cells with a PTI (Photon Technology International TimeMaster; Bior-

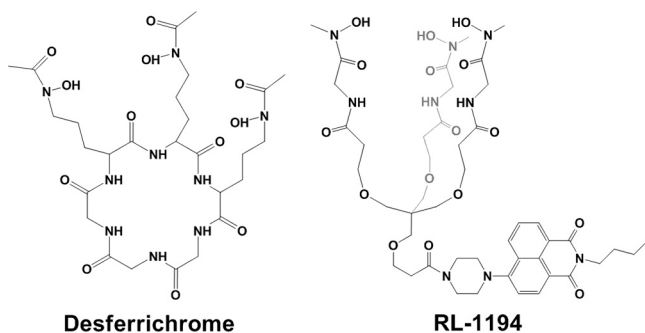


FIG. 1. Structures of desferrichrome (left) and the fluorescent bio-mimetic analogue RL1194 (right).

itech) spectrofluorimeter. The cells were washed with 2 volumes of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and resuspended in the same buffer to a final  $OD_{600}$  of 1. 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, and the fluorescence emission ( $\lambda_{em}$ ) was measured at 535 nm. RL1194-Fe at different concentrations was added and the fluorescence monitored every second for the duration of the experiment. As a control, the experiments were repeated in the absence of siderophores.

**Siderophore recycling.** An overnight culture of PAD07 or BW25113*entB::Kan<sup>r</sup>* cells was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at a final  $OD_{600}$  of 1. The cells were then incubated at 30°C in the presence of 800 nM RL1194-Fe or desferrichrome-Fe. Aliquots of 1 ml were removed and centrifuged and the supernatant collected. The fluorescence of the supernatant was measured at 535 nm with the excitation wavelength set at 400 nm. The experiment was repeated at 0°C. At this temperature, no siderophore-Fe uptake occurs.

**Iron chelation and uptake by the recycled siderophore.** An 800 nM concentration of  $FeCl_3$  was added to 800 nM RL1194-Fe or metal-free RL1194, both in 50 mM Tris-HCl solution (pH 8.0). The kinetics of iron chelation was monitored at 535 nm (excitation wavelength set at 400 nm). In parallel, an overnight culture of PAD07 cells was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at a final  $OD_{600}$  of 1. The cells were then incubated for 2 h at 30°C in the presence of 800 nM RL1194-Fe. Afterwards, the cells were pelleted and the supernatant containing the recycled RL1194 (RL1194<sub>recy</sub>) harvested. An 800 nM concentration of  $FeCl_3$  was added to 1 ml of this supernatant and the iron chelation monitored at 535 nm.

For the transport assay, 1 ml of the supernatant containing the recycled RL1194 or recycled desferrichrome (desferrichrome<sub>recy</sub>) was incubated with 80 nM  $^{55}FeCl_3$  for 20 min, and 500  $\mu$ l of this mixture was incubated at 37°C with PAD07 cells prepared at an  $OD_{600}$  of 3 in 1 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. After different times of incubation, 300- $\mu$ l aliquots were removed and filtered and the radioactivity counted. The uptake experiment was repeated with PAD07 cells treated with 200  $\mu$ M CCCP.

## RESULTS

**Iron uptake by ferrichrome involves the outer membrane transporter FiuA.** Previously, Llamas et al. have shown that the expression of FiuA and FoxA is regulated by the absence of iron and the presence of ferrichrome in the culture medium (39, 43). Moreover, growth experiments with a strain unable to produce PVD and PCH under iron-deficient conditions with or without ferrichrome indicated that FiuA and FoxA were the transporters involved in the uptake of ferrichrome (39). Here, we used a  $^{55}Fe$  uptake assay to investigate further the ferrichrome iron uptake pathway(s) in *P. aeruginosa* and to study its possible ability to transport, in addition to ferrichrome, the fluorescent analogue RL1194 (Fig. 1). In order to rule out any effect caused by the endogenous siderophores PVD and PCH, a *P. aeruginosa* mutant unable to produce either of these two siderophores, PAD07 (Table 1), was used. The bacteria were incubated in the presence of desferrichrome- $^{55}Fe$  (Fig. 2A) and RL1194- $^{55}Fe$  (Fig. 2B) and the radioactivity incorporated

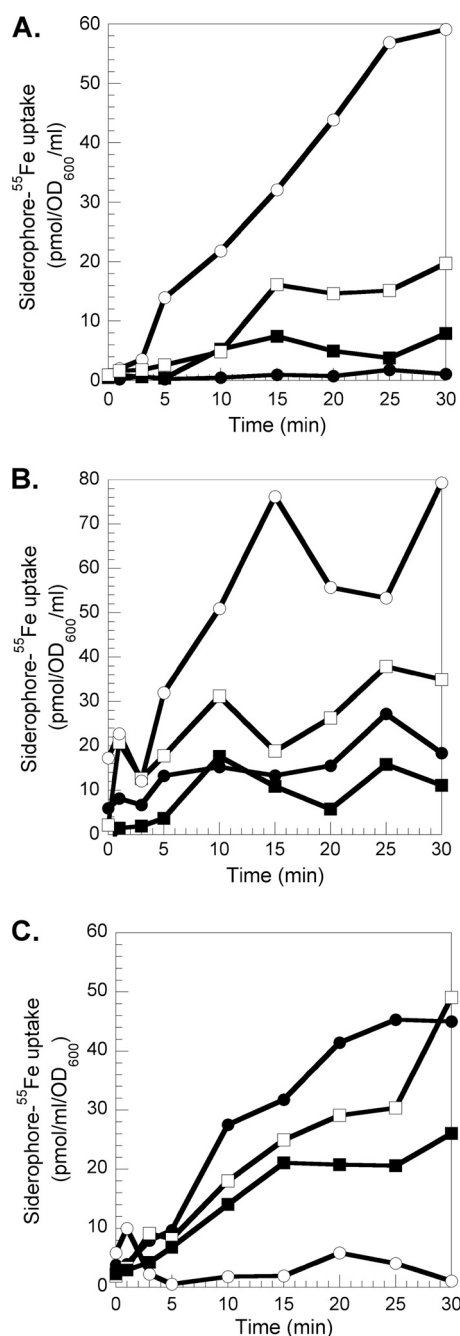


FIG. 2. Desferrichrome- $^{55}Fe$  and RL1194- $^{55}Fe$  uptake in PAD07 and PA0470. (A and B) PAD07 or PA0470 ( $\Delta$ FiuA) cells at an  $OD_{600}$  of 3 were incubated for 10 min in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. Transport assays were started by adding 300 nM ferrichrome- $^{55}Fe$  (A) or RL1194- $^{55}Fe$  (B) (PAD07, ○; PA0470, □). Aliquots (100  $\mu$ l) of the suspension were removed at different times and filtered, and the retained radioactivity was counted. The experiment was repeated in the presence of 200  $\mu$ M CCCP (PAD07, ●; PA0470, ■). (C) PAD07 cells at an  $OD_{600}$  of 3 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer were incubated in the presence of 300 nM ferrichrome- $^{55}Fe$  (●). The experiment was repeated in the presence of 200  $\mu$ M CCCP (○), 900 nM RL1194-Fe (■), or 3  $\mu$ M RL1194-Fe (□). The experiments were repeated three times with comparable results.



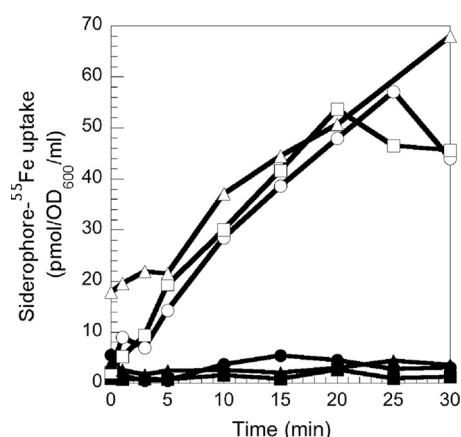


FIG. 3. Desferrichrome-<sup>55</sup>Fe, PVD-<sup>55</sup>Fe, or PCH-<sup>55</sup>Fe uptake in PAD07. PAD07 cells were prepared at an OD<sub>600</sub> of 3 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Transport assays were started by adding either 300 nM desferrichrome-<sup>55</sup>Fe (○), PVD-<sup>55</sup>Fe (□), or PCH-<sup>55</sup>Fe (△). Aliquots (100 μl) of the suspension were removed at different times and the radioactivity counted. The uptake assays were repeated in the presence of 200 μM CCCP (desferrichrome-<sup>55</sup>Fe, ●; Pvd-<sup>55</sup>Fe, ■; PCH-<sup>55</sup>Fe, ▲). The experiments were repeated three times with comparable results.

into the bacteria monitored. The experiment was repeated with cells pretreated with the protonophore CCCP. This compound inhibits the proton motive force (PMF) of the bacteria and therefore any TonB-dependent iron uptake (10). Figure 2A and B show PMF-dependent desferrichrome-<sup>55</sup>Fe (60 pmol/ml/OD<sub>600</sub> unit) and RL1194-<sup>55</sup>Fe (80 pmol <sup>55</sup>Fe/ml/OD<sub>600</sub> unit) uptake in *P. aeruginosa*. When the *fiuA* gene was mutated (strain PA0470), a 70% decrease of the desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake was observed, confirming again that FiuA is the ferrichrome outer membrane transporter in *P. aeruginosa*. A 70% decrease of RL1194-<sup>55</sup>Fe uptake was observed as well, indicating that FiuA is able to transport RL1194 with the same efficiency as ferrichrome. Since the <sup>55</sup>Fe uptake was not completely abolished by the *fiuA* mutation for both chelators, *P. aeruginosa* may use FoxA as a second transporter for the uptake of ferrichrome. Such an observation has already been made by Llamas et al., who suggested FoxA as a second candidate (39). FoxA, like FiuA, seems to be able to transport RL1194-Fe. Competition uptake assays between desferrichrome-<sup>55</sup>Fe and increasing concentrations of RL1194-Fe (Fig. 2C) or RL1194-<sup>55</sup>Fe and increasing concentrations of desferrichrome-Fe (data not shown) also demonstrated that both siderophores are transported by the same TonB-dependent outer membrane receptors, FiuA and FoxA. Finally, the <sup>55</sup>Fe uptake assays carried out with PAD07 cells in the presence of either desferrichrome, PVD, or PCH showed that all three iron uptake pathways (ferrichrome/FiuA, PVD/FpvA, and PCH/FptA) transport iron with the same efficiency (Fig. 3). Probably, as shown previously for *E. coli* (30), the limitation is not the amount of siderophore outer membrane receptor present but the amount of TonB.

**Ferrichrome uptake by the FiuA transporter involves the energy coupler TonB1.** In *P. aeruginosa*, iron uptake by the PCH/FptA and PVD/FpvA pathways involves TonB1. To find out if this same TonB protein is involved in the uptake of iron

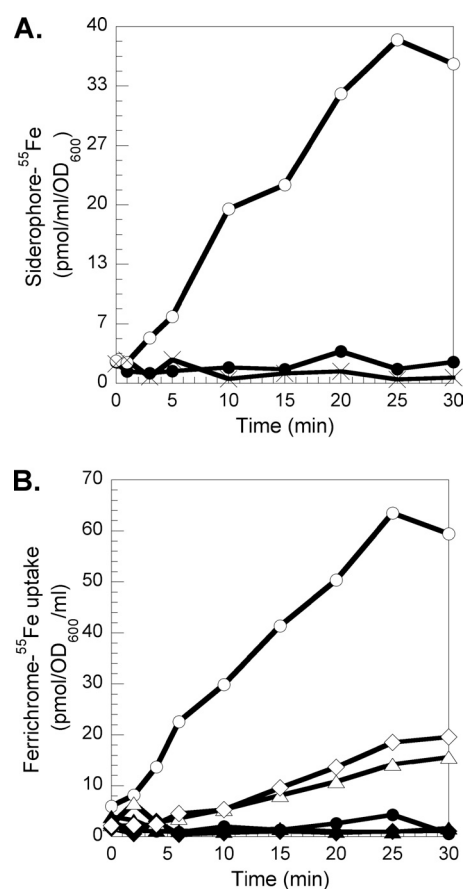


FIG. 4. (A) Desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake in PAD08 (a *tonB1* *P. aeruginosa* mutant). PAD07 (○) and PAD08 (×) cells were prepared at an OD<sub>600</sub> of 3 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). Transport assays were started by adding 300 nM desferrichrome-<sup>55</sup>Fe. Aliquots (100 μl) of the suspension were removed at different times and the radioactivity counted. The uptake assays were repeated in the presence of 200 μM CCCP (desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake in PAD08 cells, ●). The experiments were repeated with PAD14 (a *tonB1* mutant unable to produce PVD and PCH) with comparable results. (B) Desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake in PA0476 (a *fiuB* *P. aeruginosa* mutant) and PA0478 (a *fiuC* *P. aeruginosa* mutant). Transport assays were carried out with PA01 (○), PA0476 (◇), and PA0478 (△) as for panel A and repeated in the presence of 200 μM CCCP (PA01, ●; PA0476, ◆; PA0478, ▲).

by ferrichrome, desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake by PAD08 and PAD14 was measured (Fig. 4). Both strains are *tonB1* mutants, and PAD14 is also PVD and PCH deficient. With both strains, no more ferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake was observed, indicating that this iron uptake pathway in *P. aeruginosa* is TonB1 dependent.

**Ferrichrome uptake involves the inner membrane permease FiuB.** The *fiuB* (PA0476) gene is adjacent to genes required for ferrichrome uptake in *P. aeruginosa* PA01, such as *fiuA*, *fiuI*, and *fiuR* (38, 39), and is predicted to encode an inner membrane permease (www.pseudomonas.com) with 11 membrane-spanning helices (determined with Phobius [31], available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/phobius/>). No ABC transporter is present in the proximity of *fiuA*, *fiuI*, and *fiuR*, suggesting that FiuB could be the transporter of ferrichrome at the level of the inner membrane. To investigate this hypothesis, desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake assays were carried out with PA0476, a *fiuA* mutant (Fig. 4B). The data clearly showed an inhibition of

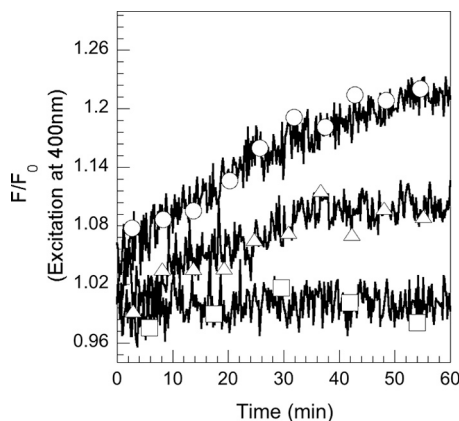


FIG. 5. Kinetics of desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$  dissociation in *P. aeruginosa* PAD07 cells. PAD07 cells were washed and resuspended at an  $\text{OD}_{600}$  of 1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and incubated at 29°C. After addition of RL1194-Fe (400 nM [ $\Delta$ ] and 1.2  $\mu\text{M}$  [ $\circ$ ]), the fluorescence at 535 nm was monitored (with the excitation wavelength set at 400 nm). The experiment was repeated in the absence of siderophores ( $\square$ ). The experiments were repeated three times with comparable results.

desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$  incorporation compared to the transport by wild-type PAO1, suggesting that FiuB is important for  $^{55}\text{Fe}$  uptake by desferrichrome.

**Iron release from the siderophore in *P. aeruginosa* PAD07 cells.** The fluorescence of RL1194 is quenched upon iron complexation and regained upon iron release. These spectral properties were used to follow in vivo and in real time the iron release from RL1194 in *P. aeruginosa* cells. PAD07 cells were incubated in the presence of increasing concentrations of RL1194-Fe and the fluorescence at 535 nm monitored (with the excitation wavelength set at 400 nm) (Fig. 5). In the presence of both RL1194-Fe and bacteria, an increase of fluorescence was observed, corresponding to iron release from the siderophore and formation of metal-free RL1194. This rise of fluorescence occurs immediately after addition of RL1194-Fe. The kinetics of metal release from the siderophore increased with the concentration of RL1194-Fe incubated with the bacteria, and saturation was reached at concentrations higher than 1.2  $\mu\text{M}$  (data not shown).

**RL1194 recycling after iron release into *P. aeruginosa* PAD07 cells.** The fluorescence properties of RL1194 were used here to follow the fate of the siderophore after iron release into the bacteria. PAD07 cells were incubated in the presence of 800 nM nonfluorescent RL1194-Fe complex. At different times, aliquots were removed, the cells pelleted, and the fluorescence in the supernatant monitored at 535 nm (with the excitation wavelength set at 400 nm) (Fig. 6). An increase of fluorescence at 535 nm was observed in the extracellular medium, which was absent in the experiment without cells or when the cells were incubated at 0°C in order to avoid siderophore-Fe uptake. This increase of fluorescence at 535 nm suggests that metal-free RL1194 is recycled into the extracellular medium after having released its iron in the bacteria. The fluorescence spectrum of this recycled RL1194 was similar to that of RL1194 before iron uptake, with a maximum of fluorescence emission at 535 nm (data not shown).

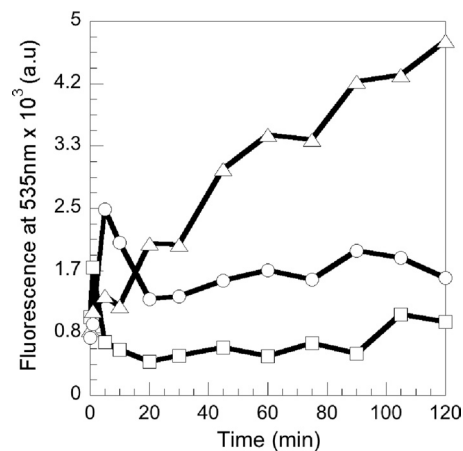


FIG. 6. Recycling of RL1194 after iron release into *P. aeruginosa* PAD07 cells. PAD07 cells at an  $\text{OD}_{600}$  of 1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) were incubated in the presence of 800 nM RL1194-Fe (at 0°C [ $\circ$ ] or at 30°C [ $\Delta$ ]). At different times, aliquots were removed, the cells pelleted, and the increase of fluorescence at 535 nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 400$  nm) monitored in the supernatant. The experiment was repeated at 30°C in the absence of siderophores ( $\square$ ).

**Chemical and biochemical characterization of recycled desferrichrome and recycled RL1194.** Mass spectrum analyses of RL1194<sub>recy</sub> indicated a triacetylation of the molecule ( $m/z$  1129.24,  $\text{MH}^+$ ; calculated for triacetyl-RL1194- $\text{H}^+$ , 1129.19), and that for the desferrichrome<sub>recy</sub> indicated a diacetylation ( $m/z$  772.45,  $\text{MH}^+$ ; calculated for diacetyl-desferrichrome- $\text{H}^+$ , 772.78). To test whether RL1194<sub>recy</sub> was still able to chelate iron, the molecule was incubated with one equivalent of  $\text{FeCl}_3$  and formation of RL1194<sub>recy</sub>-Fe was observed by the decrease in fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}} = 400$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 535$  nm) (Fig. 7A). This clearly shows that despite the triacetylation of RL1194<sub>recy</sub>, the molecule is still able to chelate iron. In order to investigate the ability of RL1194<sub>recy</sub> and desferrichrome<sub>recy</sub> to transport iron into PVD- and PCH-deficient *P. aeruginosa* cells, RL1194<sub>recy</sub> was loaded with  $^{55}\text{Fe}$  and incubated in the presence of bacteria (Fig. 7B).  $^{55}\text{Fe}$  was incorporated into the cells, indicating that RL1194<sub>recy</sub> is, despite the acetylation, a fully functional siderophore able to chelate iron and to start a new iron uptake cycle. The same experiment was repeated with recycled desferrichrome (desferrichrome<sub>recy</sub>) harvested from the medium of *P. aeruginosa* and from *E. coli* cells (Fig. 7C) incubated with ferrichrome. Both desferrichromes<sub>recy</sub> were able to chelate  $^{55}\text{Fe}$  and transport it into *P. aeruginosa* cells. In conclusion, the mechanism of iron release from ferrichrome in *P. aeruginosa* involves acetylation of the chelators, like in *E. coli* (24). Due to the ease of hydrolysis of the acetylated *N*-hydroxyl group by ferric chloride, a Lewis acid, the siderophore is still able to chelate iron and transport it into the bacteria like in *E. coli* (24).

**Ferrichrome uptake involves FiuC, a cytoplasmic *N*-acetyltransferase.** The *fiuC* (PA0478) gene is, like *fiuB*, adjacent to *fiuA* in *P. aeruginosa* PAO1. This gene is predicted to encode a cytoplasmic *N*-acetyltransferase (www.pseudomonas.com). Mutation of this gene completely abolished desferrichrome- $^{55}\text{Fe}$  uptake (Fig. 4B), indicating that this protein is necessary

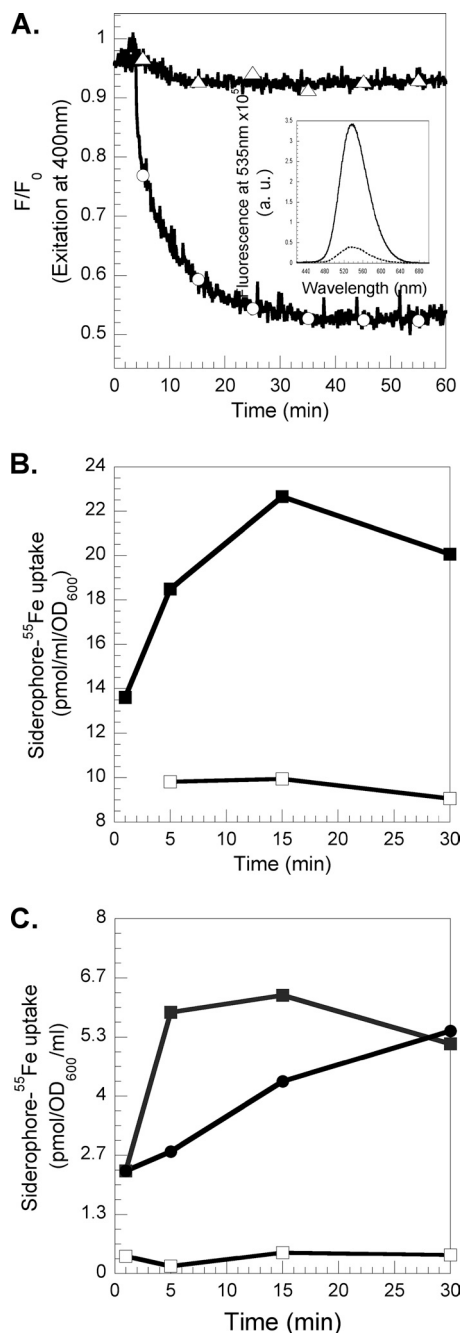


FIG. 7. (A) Iron chelation by RL1194<sub>recy</sub>. PAD07 cells at an OD<sub>600</sub> of 1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) were incubated at 30°C in the presence of 800 nM RL1194-Fe. After 2 h of incubation, the cells were collected, the supernatant containing the recycled RL1194 (RL1194<sub>recy</sub>) incubated in the presence of 800 nM Fe (○); iron was added after 2 min, and the fluorescence at 535 nm monitored ( $\lambda_{ext} = 400$  nm). The experiment was repeated with supernatant of PAD07 cells incubated in the presence of 800 nM RL1194 at 0°C (△).  $F_0$ , fluorescence at time zero;  $F$ , fluorescence at time  $t$ . The inset shows the fluorescence emission spectra of metal-free RL1194<sub>recy</sub> (solid line) and of RL1194<sub>recy</sub>-Fe (dashed line). (B) <sup>55</sup>Fe uptake into *P. aeruginosa* PAD07 cells by RL1194<sub>recy</sub>. PAD07 at an OD<sub>600</sub> of 3 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at 37°C was incubated in the presence of 800 nM RL1194<sub>recy</sub> loaded with <sup>55</sup>Fe (■), and 300  $\mu$ l of cell suspension was removed at different times and filtered and the radioactivity retained counted. The experiment was repeated in the presence of 200  $\mu$ M CCCP (□). (C) <sup>55</sup>Fe uptake into *P. aeruginosa*

for *P. aeruginosa* to gain access to iron by the ferrichrome pathway.

## DISCUSSION

The ferrichrome pathway in *E. coli* has been the subject of extensive investigation during the last 20 years and became the archetype in the field (for a review, see reference 4). *P. aeruginosa* uses the heterologous siderophore ferrichrome (39), but little is known concerning the mechanisms involved in the ferrichrome pathway in this bacterium. As shown by a previous proteomic approach and here by <sup>55</sup>Fe uptake assays, ferrichrome is transported mostly by FiuA and to a lesser extent by FoxA. The same was observed with the fluorescently labeled biomimetic ferrichrome analogue RL1194: 80% of RL1194 was transported by FiuA and 20% by the second transporter (Fig. 2B). A second transporter for ferrichrome, FhuE, is also present in *E. coli* (22, 32) and transports ferrichrome with a lower efficiency than FhuA, the major transporter. Surprisingly, RL1194 was unable to transport iron to *E. coli* (data not shown), indicating that the siderophore specificities of FiuA and FoxA of *P. aeruginosa* seem to be significantly different from those of FhuA and FhuE in *E. coli*. Both transporters, FiuA and FoxA, are (like FpvA and FptA) regulated by TonB1 and the proton motive force of the inner membrane (Fig. 4).

The use of the fluorescently labeled biomimetic ferrichrome analogue RL1194 allowed us to follow *in vivo* and in real time the kinetics of iron release from ferrichrome in *P. aeruginosa* (Fig. 5). This mechanism of iron release involves acetylation of the siderophore and the recycling of the modified molecule to the extracellular medium (Fig. 6). Actually, both RL1194<sub>recy</sub> and desferrichrome<sub>recy</sub> were acetylated; mass spectrometry analyses have shown triacetylation for the first chelator and diacetylation for the second. In order to bind iron(III), the acetylated chelators should be hydrolyzed. Ferric chloride acts both as a Lewis acid, hydrolyzing the acetyl group, and as the source of iron(III). The combined data indicate that the mechanism involved in the iron release from ferrichrome in *P. aeruginosa* is very similar to that described previously for *E. coli*, where iron is released from ferrichrome in the cytoplasm by a mechanism involving iron reduction (41) followed by acetylation of the desferrisiderophore (24) (Fig. 8). The acetylation is probably the mechanism by which cells remove potentially deleterious metal chelators from the cytoplasm.

Our data also highlighted two new genes essential for ferrichrome uptake in *P. aeruginosa*. Both genes (encoding FiuB and FiuC, for PA0476 and PA0478, respectively) are located in the vicinity of *fhuA* in the *P. aeruginosa* genome. Their mutation almost completely abolished ferrichrome incorporation into the bacteria (Fig. 4B), indicating that these proteins, like FhuA and TonB1, are essential for ferrichrome uptake. FiuC is pre-

PAD07 cells by desferrichrome<sub>recy</sub>. PAD07 at an OD<sub>600</sub> of 3 in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at 37°C was incubated in the presence of 800 nM desferrichrome<sub>recy</sub> from *P. aeruginosa* (■) and from *E. coli* (●) loaded with <sup>55</sup>Fe, and 300  $\mu$ l of cell suspension was removed at different times and filtered and the radioactivity retained counted. The experiment was repeated in the presence of 200  $\mu$ M CCCP (data shown only for desferrichrome<sub>recy</sub> from *P. aeruginosa*) (□).



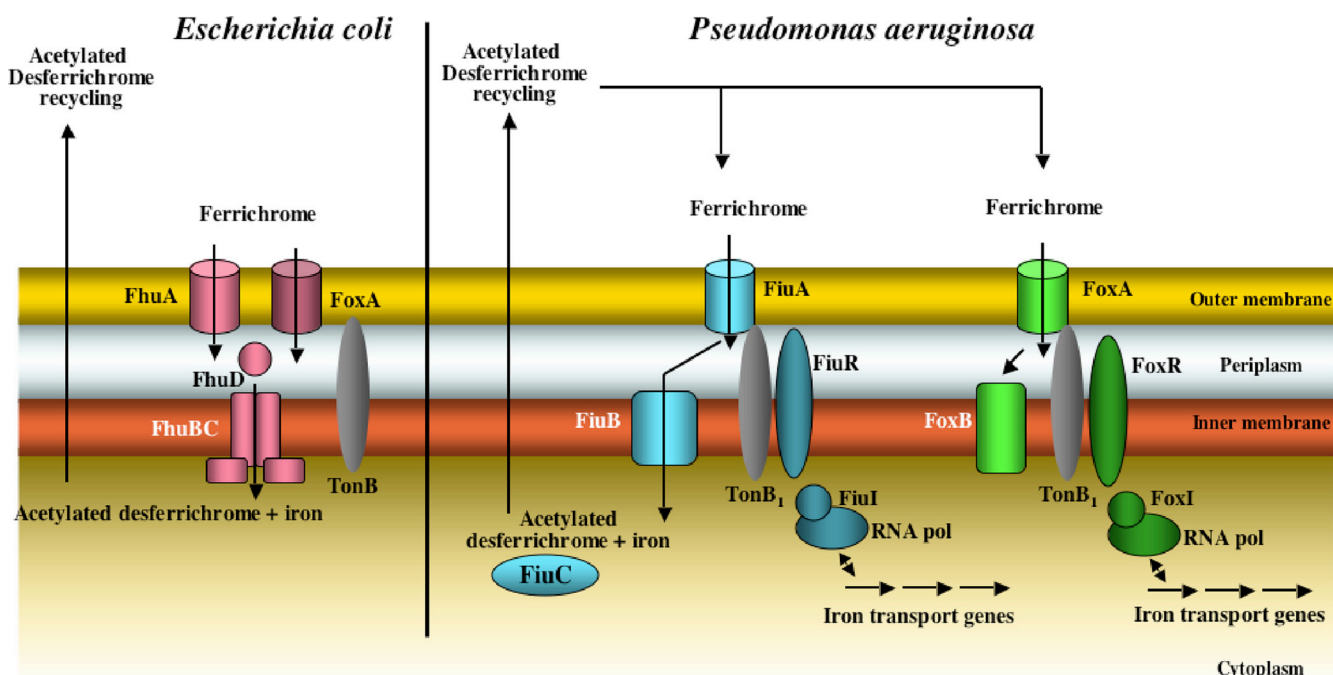


FIG. 8. The ferrichrome pathways in *E. coli* and *P. aeruginosa*. In *E. coli* the transport involves two TonB outer membrane transporters, FhuA and FhuE, and an inner membrane ABC transporter, FhuBCD. Iron is released by a mechanism probably involving metal reduction and acetylation of the desferrichrome, followed by siderophore recycling in the extracellular medium. In *P. aeruginosa*, transport involves two TonB<sub>1</sub> outer membrane transporters, FiuA and FoxA, and a permease, FiuB, for transport across the inner membrane. Iron is released from the siderophore by a mechanism similar to that in *E. coli*. FiuC is probably the *N*-acetyltransferase. FoxB seems also to be involved in ferrichrome transport; however, its function is so far unknown. In *P. aeruginosa*, both outer membrane transporters, FiuA and FoxA, are also involved in a signaling cascade regulating the expression of the genes involved in the ferrichrome pathway.

dicted to be a cytoplasmic *N*-acetyltransferase which is probably involved in the acetylation of ferrichrome during the iron release step. FiuB is predicted to be a permease with 11 membrane-spanning helices. Since FiuC is predicted to be cytoplasmic and FiuB a permease, it is tempting to suppose that FiuB is the transporter of ferrichrome across the inner membrane. In *E. coli*, this step is achieved by FhuBCD, an ABC transporter (33, 35–37). No homologue of this ABC transporter could be found in the *P. aeruginosa* genome (<http://www.pseudomonas.com>).

Mutation of FiuB and FiuC abolished desferrichrome-<sup>55</sup>Fe uptake with the same efficiency as mutation of the outer membrane transporter FiuA. Uptake occurs only if all the proteins necessary in the pathway are expressed, in order to avoid any ferrichrome accumulation in either the periplasm or cytoplasm of the bacteria. In *E. coli*, similarly, mutation of FhuBCD abolishes ferrichrome uptake. The inner membrane protein FoxB is also involved in the utilization of ferrichrome by *P. aeruginosa* (17). Mutagenesis of this membrane protein did not abolish ferrichrome utilization, suggesting that this function is redundant (17). FoxB is predicted to be an inner membrane protein with four membrane-spanning helices. In this study, it was not determined whether FoxB is involved in the transport of ferrichrome or in iron release from the siderophore.

Taken together, the data show that the ferrichrome pathway in *P. aeruginosa* has many similarities to the ferrichrome pathway described previously for *E. coli* (Fig. 8), indicating conservation among bacterial species. Like in *E. coli*, the transport of ferrichrome across the outer membrane involves a primary

transporter, FiuA, and a secondary one, FoxA (FhuA and FhuE in *E. coli*). In both bacteria, iron release from ferrichrome involves acetylation of the chelator and probably occurs in the cytoplasm. Consequently, acylated ferrichrome is recycled to the extracellular medium. One major difference between the two pathways is the type of transporter involved in the translocation of ferrichrome across the inner membrane: it is an ABC transporter in the case of *E. coli* and a permease in the case of *P. aeruginosa*. A second difference is the involvement of the outer membrane transporters FiuA and FoxA of *P. aeruginosa* in a signaling cascade regulating the expression of *fiuA* or *foxA* (38, 39, 43). These signaling cascades involve an ECF sigma factor (FiuI and FoxI) and an anti-sigma factor (FiuR and FoxR). No equivalent cell surface signaling is present in *E. coli* for ferrichrome uptake by FhuA or FhuE.

In conclusion, the *E. coli* ferrichrome and enterobactin pathways have been the archetypes in the field of ferrisiderophore transport for years, and it was believed that the mechanisms involved in these two pathways were probably common to all siderophore pathways in Gram-negative bacteria. The data presented here indicate that diversity can be found in the mechanisms involved in iron uptake by siderophores. Further studies have to be carried out to better understand all these diversities and their possible significance, depending on the specific microorganisms and their siderophores.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rachel Lazar for her skillful synthetic work.

This work was partially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and a grant from the ANR (Agence Nationale de Recherche, ANR-08-BLAN-0315-01) (I.J.S.) and by the Helen and Martin Kimmel Center for Molecular Design and the Kimmelman Center for Macromolecular Assemblies (A.S.). M. Hannauer had a fellowship from the French Ministère de la Recherche et de la Technologie. A.S. holds the Siegfried and Irma Ullman Professorial Chair.

## REFERENCES

- Albrecht-Gary, A. M., S. Blanc, N. Rochel, A. Z. Ocacktan, and M. A. Abdallah. 1994. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdinin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **33**:6391–6402.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006.0008.
- Boukhalfa, H., and A. L. Crumbliss. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**:325–339.
- Braun, V. 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front. Biosci.* **8**:1409–1421.
- Braun, V., and F. Endriss. 2007. Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**:219–231.
- Braun, V., and C. Herrmann. 2007. Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**:6913–6918.
- Brickman, T. J., and M. A. McIntosh. 1992. Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J. Biol. Chem.* **267**:12350–12355.
- Brillet, K., L. Journet, H. Celia, L. Paulus, A. Stahl, F. Pattus, and D. Cobessi. 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.
- Chenault, S. S., and C. F. Earhart. 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol. Microbiol.* **5**:1405–1413.
- Clément, E., P. J. Mesini, F. Pattus, M. A. Abdallah, and I. J. Schalk. 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., H. Célia, N. Folschweiler, I. J. Schalk, M. A. Abdallah, and F. Pattus. 2005. The crystal structure of the pyoverdinin outer membrane receptor FpvA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **347**:121–134.
- Cobessi, D., H. Celia, and F. Pattus. 2004. Crystallization and X-ray diffraction analyses of the outer membrane pyochelin receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**:1919–1921.
- Cornelis, P., and S. Matthijs. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* **4**:787–798.
- Cox, C. D. 1980. Iron uptake with ferripyochelin and ferricitrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **142**:581–587.
- Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr. 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**:4256–4260.
- Cuiv, P. O., P. Clarke, D. Lynch, and M. O'Connell. 2004. Identification of *rhuX* and *jptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *J. Bacteriol.* **186**:2996–3005.
- Cuiv, P. O., D. Keogh, P. Clarke, and M. O'Connell. 2007. FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence for transport redundancy at the inner membrane. *J. Bacteriol.* **189**:284–287.
- Dayan, I., J. Libman, Y. Agi, and A. Shanzer. 1993. Chiral siderophore analogs—ferrichrome. *Inorg. Chem.* **32**:1467–1475.
- Ghysels, B., B. T. Dieu, S. A. Beatson, J. P. Pirnay, U. A. Ochsner, M. L. Vasil, and P. Cornelis. 2004. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**:1671–1680.
- Greenwald, J., F. Hoegy, M. Nader, L. Journet, G. L. A. Mislin, P. L. Graumann, and I. J. Schalk. 2007. Real-time FRET visualization of ferripyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J. Biol. Chem.* **282**:2987–2995.
- Gumbart, J., M. C. Wiener, and E. Tajkhorshid. 2007. Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophys. J.* **93**:496–504.
- Hantke, K. 1983. Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **191**:301–306.
- Harding, R. A., and P. W. Royt. 1990. Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1859–1867.
- Hartman, A., and V. Braun. 1980. Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *J. Bacteriol.* **143**:246–255.
- Heinrichs, D. E., L. Young, and K. Poole. 1991. Pyochelin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *Infect. Immun.* **59**:3680–3684.
- Hoegy, F., H. Celia, G. L. Mislin, M. Vincent, J. Gallay, and I. J. Schalk. 2005. Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**:20222–20230.
- Hoegy, F., X. Lee, S. Noël, G. L. Mislin, D. Rognan, C. Reimann, and I. J. Schalk. 2009. Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **284**:14949–14957.
- Huang, B., K. Ru, Z. Yuan, C. B. Whitchurch, and J. S. Mattick. 2004. *tonB3* is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J. Bacteriol.* **186**:4387–4389.
- Jacobs, M. A., A. Alwood, I. Thaipisuttikul, D. Spencer, E. Haugen, S. Ernst, O. Will, R. Kaul, C. Raymond, R. Levy, L. Chun-Rong, D. Guenther, D. Bovee, M. V. Olson, and C. Manoil. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:14339–14344.
- Kadner, R. J., and K. J. Heller. 1995. Mutual inhibition of cobalamin and siderophore uptake systems suggests their competition for TonB function. *J. Bacteriol.* **177**:4829–4835.
- Kall, L., A. Krogh, and E. L. Sonnhammer. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* **35**:W429–W432.
- Killmann, H., and V. Braun. 1998. Conversion of the coprogen transport protein FhuE and the ferrioxamine B transport protein FoxA into ferrichrome transport proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:59–67.
- Koster, W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* **152**:291–301.
- Koster, W. 1991. Iron(III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol. Met.* **4**:23–32.
- Koster, W., and V. Braun. 1986. Iron hydroxamate transport of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the *fhuB* gene and identification of the protein. *Mol. Gen. Genet.* **204**:435–442.
- Koster, W., and V. Braun. 1989. Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Mol. Gen. Genet.* **217**:233–239.
- Koster, W., A. Gudmundsdottir, M. D. Lundrigan, A. Seiffert, and R. J. Kadner. 1991. Deletions or duplications in the BtuB protein affect its level in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:5639–5647.
- Llamas, M. A., M. J. Mooij, M. Sparrius, C. M. Vandembroucke-Grauls, C. Ratledge, and W. Bitter. 2008. Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Mol. Microbiol.* **67**:458–472.
- Llamas, M. A., M. Sparrius, R. Kloet, C. R. Jimenez, C. Vandembroucke-Grauls, and W. Bitter. 2006. The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:1882–1891.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2**:1051–1060.
- Matzanke, B. F., S. Anemuller, V. Schunemann, A. X. Trautwein, and K. Hantke. 2004. FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry* **43**:1386–1392.
- Meijler, M. M., R. Arad-Yellin, Z. I. Cabantchik, and A. Shanzer. 2002. Synthesis and evaluation of iron chelators with masked hydrophilic moieties. *J. Am. Chem. Soc.* **124**:12666–12667.
- Mettrick, K. A., and I. L. Lamont. 2009. Different roles for anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **74**:1257–1271.
- Meyer, J. M. 1992. Exogenous siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: possible involvement of porin OprF in iron translocation. *J. Gen. Microbiol.* **138**:951–958.
- Mislin, G. L. A., F. Hoegy, D. Cobessi, K. Poole, D. Rognan, and I. J. Schalk. 2006. Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **357**:1437–1448.
- Ochsner, U. A., P. J. Wilderman, A. I. Vasil, and M. L. Vasil. 2002. Gene-Chip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* **45**:1277–1287.
- Poole, K., and G. A. McKay. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* **8**:d661–d686.
- Poole, K., S. Neshat, K. Krebs, and D. E. Heinrichs. 1993. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fvpA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**:4597–4604.
- Poole, K., L. Young, and S. Neshat. 1990. Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**:6991–6996.
- Poole, K., Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and C. R. Dean. 1996. The

- Pseudomonas aeruginosa tonB* gene encodes a novel TonB protein. Microbiology **142**:1449–1458.
51. Postle, K., and R. J. Kadner. 2003. Touch and go: tying TonB to transport. Mol. Microbiol. **49**:869–882.
  52. Royle, P. L., H. Matsumoto, and B. W. Holloway. 1981. Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. J. Bacteriol. **145**:145–155.
  53. 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.
  54. Schalk, I. J., M. A. Abdallah, and F. Pattus. 2002. Recycling of pyoverdine on the FpvA receptor after ferric pyoverdine uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry **41**:1663–1671.
  55. Schalk, I. J., C. Hennard, C. Dugave, K. Poole, M. A. Abdallah, and F. Pattus. 2001. Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. Mol. Microbiol. **39**:351–360.
  56. Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun. 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171**:2626–2633.
  57. Takase, H., H. Nitanaï, K. Hoshino, and T. Otani. 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. Infect. Immun. **68**:1834–1839.
  58. Takase, H., H. Nitanaï, K. Hoshino, and T. Otani. 2000. Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. Infect. Immun. **68**:4498–4504.
  59. Van Delden, C., and B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg. Infect. Dis. **4**:551–560.
  60. Vasil, M. L., and U. A. Ochsner. 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. Mol. Microbiol. **34**:399–413.
  61. Visca, P., L. Leoni, M. J. Wilson, and I. L. Lamont. 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. Mol. Microbiol. **45**:1177–1190.
  62. Wendenbaum, S., P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer, and M. A. Abdallah. 1983. The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. Tetrahedron Lett. **24**:4877–4880.
  63. Wiener, M. C. 2005. TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? Curr. Opin. Struct. Biol. **15**:394–400.
  64. Winkelmann, G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. Biochem. Soc. Trans. **30**:691–696.
  65. Wirth, C., W. Meyer-Klaucke, F. Pattus, and D. Cobessi. 2007. From the periplasmic signaling domain to the extracellular face of an outer membrane signal transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: crystal structure of the ferric pyoverdine outer membrane receptor. J. Mol. Biol. **68**:398–406.
  66. Yeterian, E., L. W. Martin, I. L. Lamont, and I. J. Schalk. A resistance-division-nodulation (RND) efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. Rep., in press.
  67. Zhao, Q., and K. Poole. 2000. A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. FEMS Microbiol. Lett. **184**:127–132.



## II. Discussion de l'article 3

Ce travail a permis de mettre en évidence les différentes protéines impliquées dans l'assimilation du fer par le ferrichrome chez *P. aeruginosa*. De précédentes études de protéomique avaient montré que les transporteurs de membrane externe FiuA et FoxA étaient exprimées en condition de carence en fer et en présence de ferrichrome (Llamas et al., 2006). Nous avons confirmé l'implication de FiuA dans le transport du ferrichrome par délétion de ce gène et par des études d'incorporation de <sup>55</sup>Fe (Figure 1 de l'article 3). Les résultats confirment les données de protéomique obtenues précédemment : FiuA est le récepteur de membrane externe majoritairement impliqué dans le transport du complexe desferrichrome-fer du milieu extracellulaire vers le périplasma de la bactérie (80% du transport) et FoxA est le transporteur secondaire (20% du transport). Les mêmes résultats d'incorporation de <sup>55</sup>Fe par FiuA et FoxA ont été obtenus avec l'analogue fluorescent RL1194. Le transport du ferrichrome et de RL1194-Fe par FiuA et FoxA est TonB dépendant car en l'absence de TonB1 aucun transport n'est observé (Figure 4A de l'article 3). Nous n'avons malheureusement pas observé de transport avec la molécule RL1194 chez *E. coli*. Ceci suggère que la spécificité des récepteurs de *P. aeruginosa* vis-à-vis de la structure des sidérophores est différente de celle des récepteurs FhuA et FhuE de *E. coli*.

Nous avons également montré que le gène *fiuB* codant pour une perméase de la membrane interne est très probablement impliqué dans le transport du ferrichrome du périplasma vers le cytoplasme chez *P. aeruginosa*. Une mutation de ce gène inhibe tout transport de fer en présence de desferrichrome (Figure 2 A de l'article 3). De manière équivalente, chez *E. coli*, une délétion du gène *fhuD* correspondant à la protéine périplasmique associée au transporteur ABC impliqué dans le passage du ferrichrome à travers la membrane interne, entraîne une inhibition totale du transport du fer (Koster, 1991). Pour ces deux voies, transport du ferrichrome chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, il semble y avoir un couplage entre le transport à travers la membrane interne et le transport à travers la membrane externe. Lorsque le transport du ferrichrome à travers la membrane interne ne peut se faire dû par exemple, à une délétion du gène du transporteur impliqué, l'entrée du ferrisidérophore à travers la membrane externe est bloquée et aucune accumulation de ferrisidérophore est observée dans le périplasma.

En utilisant les propriétés de fluorescence de RL1194, nous avons pu suivre *in vivo* et en temps réel la dissociation du complexe RL1194-Fe (Figure 5 de l'article 3). Après

dissociation, le desferrichrome et RL1194 sont recyclés dans le milieu extracellulaire (Figure 6 de l'article 3). Des études de spectrométrie de masse ont permis de montrer que le desferrichrome recyclé est diacétylé et que RL1194 est triacétylé. Finalement, nous avons identifié la protéine FiuC comme étant essentielle au transport du fer via le ferrichrome : sa mutation inhibe le transport (Figure 4 B de l'article 3) . Cette protéine est prédite comme étant une N-acétyltransférase. Elle interviendrait donc dans l'acétylation du ferrichrome lors de la dissociation du complexe. Le mécanisme d'acétylation permet probablement à la bactérie d'empêcher le desferrichrome de rechélater du fer dans le cytoplasme. Dans le milieu extracellulaire, les molécules acétylées doivent être hydrolysées afin de pouvoir chélater efficacement le fer et de recommencer un cycle de transport. Le chlorure de fer peut agir comme acide de Lewis et hydrolyser les groupements acétyles du desferrichrome qui pourra ensuite à nouveau chélater le fer.

Cette étude a également permis de montrer que les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport du fer pour un sidérophore donné ne sont pas forcément conservés selon l'espèce bactérienne. Les voies de transport du fer par le desferrichrome chez *E. coli* et *P. aeruginosa* ont des similitudes et des différences. Pour les similitudes, on retrouve pour les deux bactéries deux récepteurs de sidérophores pour le transport à travers la membrane externe et un mécanisme apparemment identique pour la dissociation du fer du desferrichrome dans le cytoplasme bactérien. Les différences entre *E. coli* et *P. aeruginosa* pour le transport du ferrichrome se situe surtout au niveau du passage au travers de la membrane interne, chez *E. coli* un transporteur ABC est impliqué et pour *P. aeruginosa* deux perméases. Chez *E. coli*, il y a une convergence des deux voies d'entrée du ferrichrome à travers la membrane externe (FhuA et FhuE) qui se rejoignent pour utiliser le transporteur ABC FhuBCD pour le passage de la membrane interne. Dans le cas de *P. aeruginosa*, les deux voies d'entrée par la membrane externe (FiuA et FoxA) sont suivies par deux voies distinctes de passage à travers la membrane interne (FiuB et FoxB). Enfin, il est important de remarquer également que FiuA et FoxA chez *P. aeruginosa* sont couplés dans une cascade de signalisation impliquant des facteurs sigma et anti-sigma régulant l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer via le desferrichrome (Llamas et al., 2008; Llamas et al., 2006; Mettrick and Lamont, 2009). Ces systèmes de régulation sont absents chez *E. coli*.

### **Conclusion du chapitre :**

Durant ce travail de thèse, nous avons caractérisé la voie d'assimilation du fer par le ferrichrome. Cette voie d'acquisition du fer présente de nombreuses différences avec la voie Pvd. Tout d'abord, ce mécanisme impliquait un transport du complexe sidérophore-fer jusqu'au cytoplasme de la bactérie grâce à une perméase. Le complexe ferrichrome fer est dissocié par modification du sidérophore accompagné d'une réduction du fer. De même si l'on compare cette voie à celle décrite chez *E. coli* pour le ferrichrome, on constate que le passage à travers la membrane interne ne s'effectue pas par une perméase mais un transporteur ABC. Nous avons montré qu'il existait dans une même bactérie différentes voies d'acquisition du fer par les sidérophores. Par ailleurs, pour un sidérophore donnée, les protéines et les mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer par ce sidérophore peuvent varier d'un organisme à l'autre.





**Chapitre 7 :**

**Étude de l'effet de l'arséniate sur le transport du fer par les  
sidérophores chez *P. aeruginosa* et *E. coli***



## I. Introduction

Toutes les voies de transport du fer via des sidérophores chez *E. coli* impliquent au niveau de la membrane externe un transporteur TonB dépendant et au niveau de la membrane interne un transporteur ABC. Par exemple, pour l'acquisition du fer par l'entérobactine et le desferrichrome chez *E. coli*, les deux sidérophores après chélation du fer sont reconnus par un récepteur de membrane externe spécifique, respectivement FepA et FhuA (Boulangier et al., 1996; Ozenberger et al., 1987). Ensuite, le transport à travers la membrane interne s'effectue dans les deux cas par un transporteur ABC (Fecker and Braun, 1983; Koster, 1991; Ozenberger et al., 1987), FhuBCD pour le desferrichrome et FepBCDG pour l'entérobactine. Lorsque j'ai débuté ma thèse, peu de choses étaient connues concernant le mécanisme de transport du fer par la Pvd. Le récepteur FpvA avait été étudié et sa structure résolue, mais aucune autre protéine impliquée dans le transport n'avait été identifiée. Dans l'objectif d'identifier le transporteur ABC de la voie Pvd, nous avons au début de ma thèse étudié la dépendance énergétique du transport du fer pour différentes voies : desferrichrome et entérobactine chez *E. coli* et desferrichrome, entérobactine, Pvd et Pch chez *P. aeruginosa*. Nous voulions voir par une approche autre que génétique, comment toutes ces voies étaient similaires ou différentes.

On sait que le transport à travers la membrane externe est dépendant de la force proton motrice et nous avons montré au laboratoire qu'il pouvait être inhibé par le protonophore CCCP (Carbonyl Cyanide-m-chlorophenylhydrazone)(Clément et al., 2004). Une étude visant à déterminer la dépendance énergétique du transport de l'entérobactine a été effectuée il y a déjà quelques années (Pugsley and Reeves, 1977). Dans cet article, il est montré que le transport de l'entérobactine est affecté lorsque les bactéries sont incubées avec de l'arséniate. L'arséniate est un inhibiteur de la chaîne respiratoire conduisant à la formation de l'ATP en se substituant au phosphate. L'arséniate agit sur le transport à travers la membrane interne. On observe donc une inhibition du transport du fer via l'entérobactine lorsque le transport au niveau de cette membrane est bloqué. Le transport semble donc être couplé entre le récepteur de membrane externe et le passage à travers la membrane interne. Le même genre de phénomène a été observé pour le transport du ferrichrome chez *E. coli* en l'absence de la protéine périplasmique associée au transporteur ABC (Koster and Braun, 1990).

Dans le cas de *P. aeruginosa*, nous avons voulu étudier l'effet de l'arséniate sur le transport de différents complexes sidérophores-fer. Nous nous sommes intéressés en particulier à la voie ferrichrome et entérobactine chez *P. aeruginosa* et *E. coli* mais aussi à la voie Pvd et Pch de *P. aeruginosa*.

## II. Résultats et discussions

### A. Toxicité de l'arséniate et inhibition de la formation d'ATP

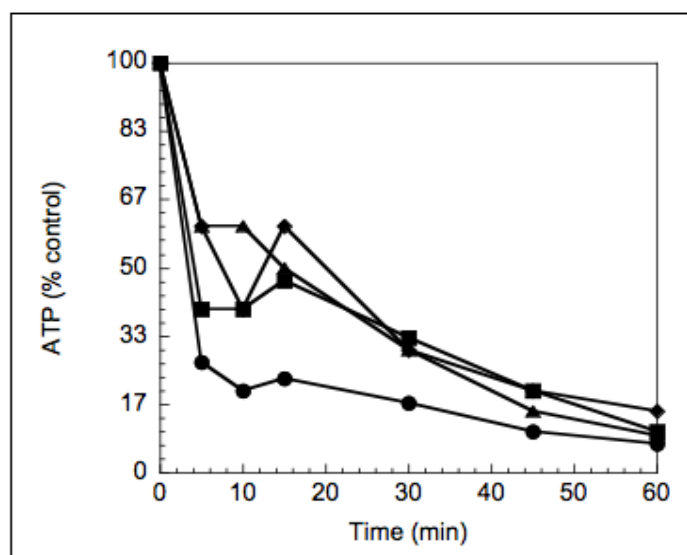
*P. aeruginosa* possède une membrane très imperméable comparé à *E. coli*. De ce fait, nous avons dans un premier temps testé la sensibilité de *P. aeruginosa* à l'arséniate (Tableau 4) puis dosé l'effet de différentes concentrations d'arséniate sur la formation d'ATP. L'arséniate devient toxique pour des concentrations supérieures à 20 mM (Tableau 4).

	Sans Arséniate	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM
Nb colonie	170	121	148	170	120	87
% de survivant	100%	71%	87%	100%	71%	51%

**Tableau 4 : Toxicité de l'arséniate sur la souche PAO1**

La souche PAO1 est incubée avec différentes concentrations d'arséniate puis des dilutions sont étalées sur boîte LB. Les boîtes sont incubés à 37 °C durant 24 h, puis les colonies sont comptées.

Le dosage de l'ATP dans les cellules de *P. aeruginosa* est effectué à l'aide du Kit ATP Bioluminescence Assay kit HS II (fournisseur Roche) en présence et en absence d'arséniate. La concentration d'ATP diminue rapidement quelque soit la concentration d'arséniate ajoutée. Curieusement, la diminution plus importante a été observée pour la concentration de 5 mM et moins pour les autres. Cependant, toutes les courbes atteignent la même valeur au bout de 60 minutes (Figure 45).



**Figure 45 : Dosage de la quantité d'ATP présente dans les cellules**

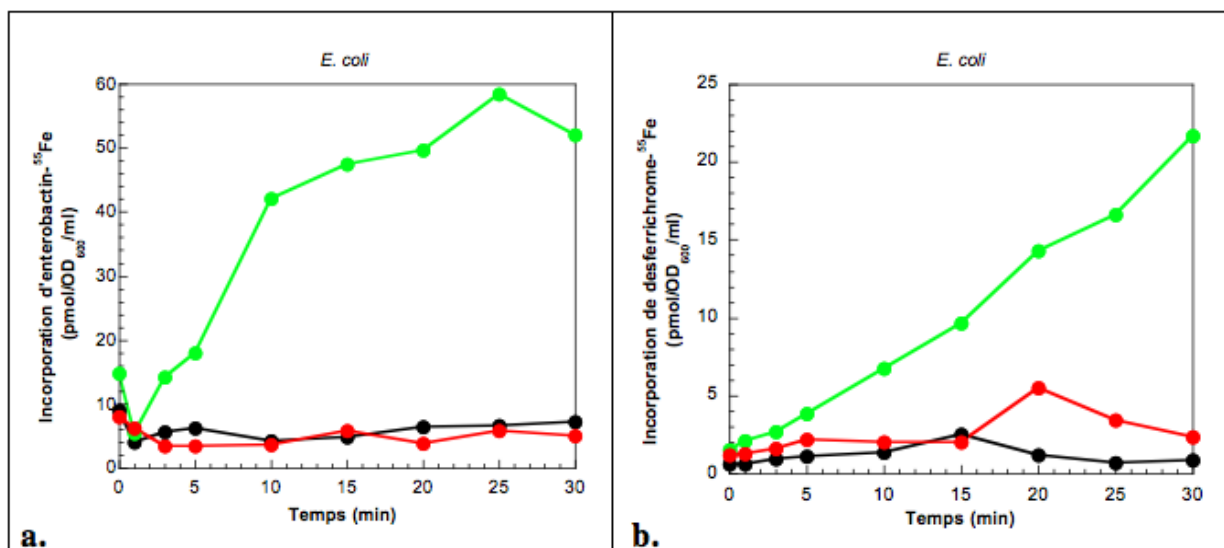
Le dosage est effectué sur une souche PAO1 dans une plaque 96 puits avec la luciférase. La souche a été resuspendue dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Les concentrations d'arséniate testées sont 5 mM (●), 10 mM (■) ; 20 mM (▲) et 50 mM (◆). Les valeurs sont rapportées en pourcentage par rapport au témoin.

## B. Effet de l'arséniate sur l'incorporation de fer radioactif

Nous avons suivi l'incorporation du  $^{55}\text{Fe}$  en présence de différents sidérophores chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, en présence et en absence d'arséniate. Sachant que le transport du fer par les sidérophores chez *E. coli* implique des transporteurs ABC, nous avons dans un premier temps voulu étudier l'effet de l'arséniate sur le transport du fer chez cette bactérie. Chez *E. coli*, on observe une inhibition de 100% du transport du fer par l'entérobactine et par le desferrichrome (Figure 46). Une inhibition du transport des ferrisidérophores au travers de la membrane interne bloque la translocation de ces mêmes composés à travers la membrane externe, c'est-à-dire l'entrée du sidérophore dans la bactérie. Les deux transports sont couplés. Chez *P. aeruginosa*, nous n'avons observé aucun effet de l'arséniate sur le transport de l'entérobactine et du ferrichrome (Figure 47). Pour le desferrichrome, nous avons montré (chapitre 6, (Hannauer et al., 2010)) qu'une perméase est impliquée dans le transport à travers la membrane interne. Cette perméase est prédite comme étant dépendante de la force proton motrice et non de l'ATP, ce qui est en accord avec nos résultats de transport. Dans le cas de l'entérobactine, les protéines impliquées dans le passage à travers la membrane interne n'ont pas été identifiées expérimentalement. Dans le génome, au niveau du locus de l'entérobactine, on retrouve des homologues au transporteur ABC impliqué dans le transport du complexe entérobactine-fer chez *E. coli*. L'absence d'inhibition de l'incorporation du  $^{55}\text{Fe}$  peut être due soit, à l'implication d'un second transporteur, de type perméase, dans le passage du complexe entérobactine-fer à travers la membrane interne, soit à une accumulation de fer dans le périplasma lorsqu'il y a inhibition du transport au niveau de la membrane interne. Il est intéressant de noter que l'efficacité de transport du fer par l'entérobactine est plus faible que pour le desferrichrome. On atteint une valeur de 16 pmol/OD<sub>600 nm</sub>/ml pour l'entérobactine alors que pour le ferrichrome, on a un maximum à 50 pmol/OD<sub>600 nm</sub>/ml.

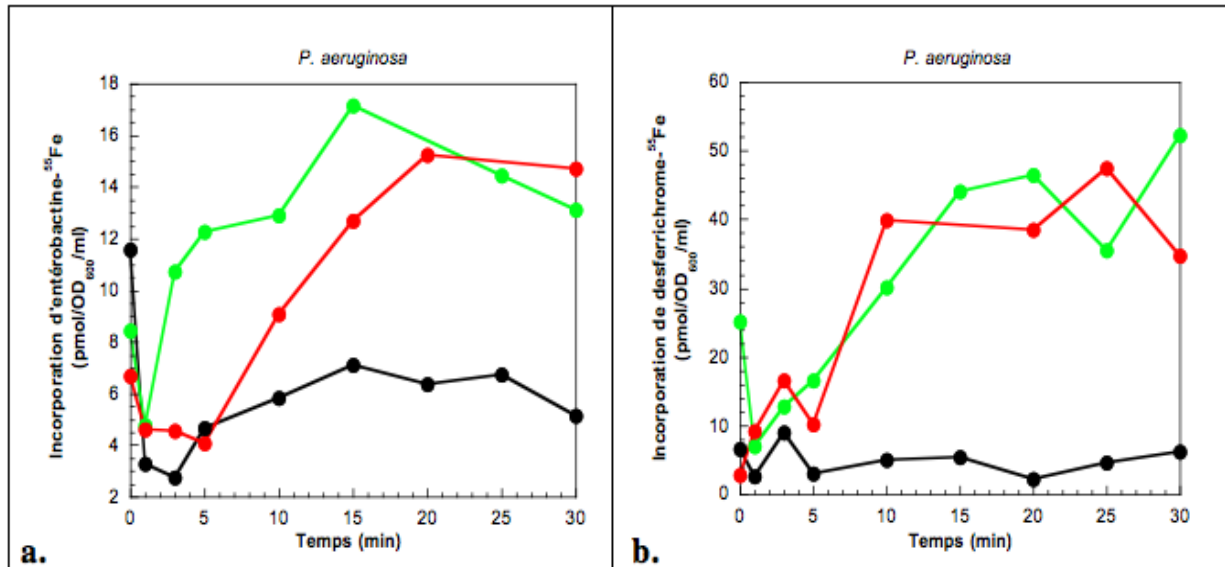
Dans le cas du transport du fer par la Pvd aucun effet de l'arséniate n'a été observé (Figure 48a). Pour cette voie, la dissociation du complexe Pvd-Fe s'effectue dans le périplasma contrairement aux autres sidérophores dont la dissociation s'effectue dans le cytoplasme. L'une des explications à l'absence d'effet de l'arséniate serait la capacité de la bactérie à stocker le fer dans le périplasma sous forme de complexe Pvd-Fe comme nous l'avons vu dans l'article 2 pour des complexes Pvd-métaux ou en complexes avec les protéines FpvC et FpvF (Figure 44 du chapitre 5). En effet, des données récentes du laboratoire ont montré que ces protéines peuvent interagir avec Pvd-Fe dans le périplasma de *P. aeruginosa*.

L'arséniate a un léger effet sur l'incorporation du fer par la Pch (environ 30 % (Figure 48b). Cependant, le transporteur impliqué dans le passage à travers la membrane interne est une perméase de la famille des MFS, c'est-à-dire indépendant de l'ATP. L'effet observé en présence de l'arséniate ne peut donc pas être dû au blocage du transport du complexe Pch-Fe au travers de la membrane interne. Mais une explication serait que l'arséniate agit sur la dissociation du complexe Pch-fer qui a lieu dans le cytoplasme, ce qui conduirait à une diminution de l'incorporation du fer dans la cellule. On a vu précédemment que c'était le cas pour le desferrichrome, ou en délétant l'enzyme responsable de l'acétylation du ferrichrome, on observe une inhibition du transport du fer via le ferrichrome dans la bactérie.



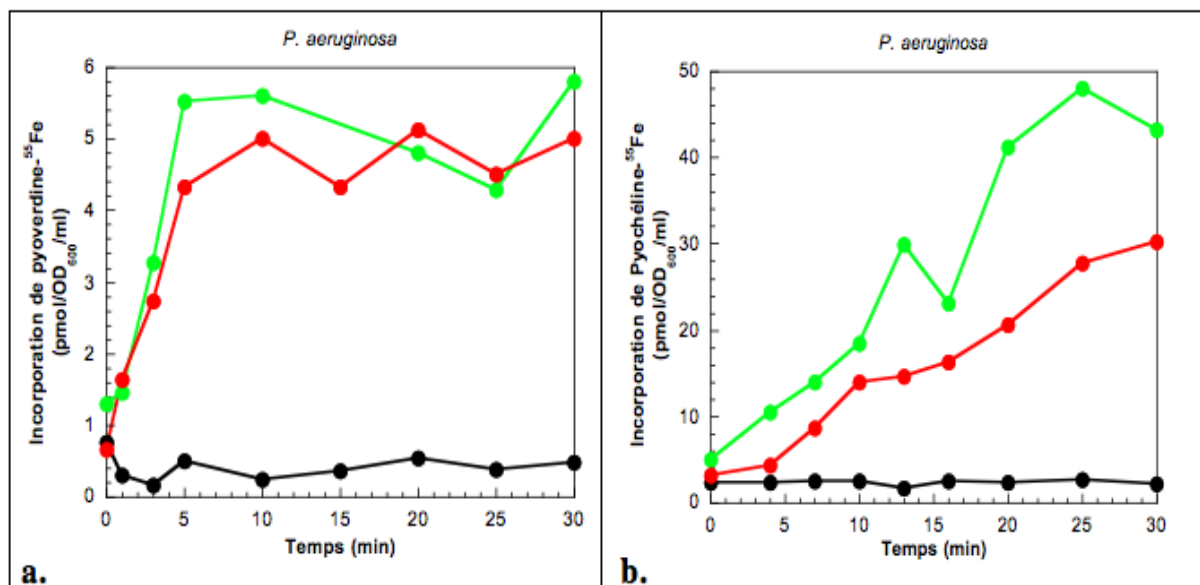
**Figure 46 : Incorporation de <sup>55</sup>Fe chez *E. coli***

Les cellules sont lavées puis resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1. Le transport est initié en ajoutant 100 nM de complexe sidérophore-fer. A. Transport du fer via l'entérobactine ; b. Transport du fer via le ferrichrome. La courbe en vert représente le transport des bactéries sans ajout d'inhibiteur, en rouge les bactéries incubées avec arsenate et en noir avec le CCCP. En présence d'arséniate, on observe la même inhibition de transport qu'en présence de CCCP. En bloquant le passage à travers la membrane interne, on bloque le transport du fer dans la bactérie.



**Figure 47 : Incorporation de <sup>55</sup>Fe chez *P. aeruginosa* par les sidérophores exogènes**

Les cellules sont lavées puis resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1. Le transport est initié en ajoutant 100 nM de complexe sidérophore-fer. Les courbes en vert correspondent au transport du fer chez PAO1 en absence d'inhibiteur. En noir incubation avec CCCP et en rouge avec NaAs. A. Transport du fer par l'entérobactine. B. Transport du fer par la voie desferrichrome. On constate que l'efficacité de transport par la voie de l'entérobactine est plus faible que celle du desferrichrome.



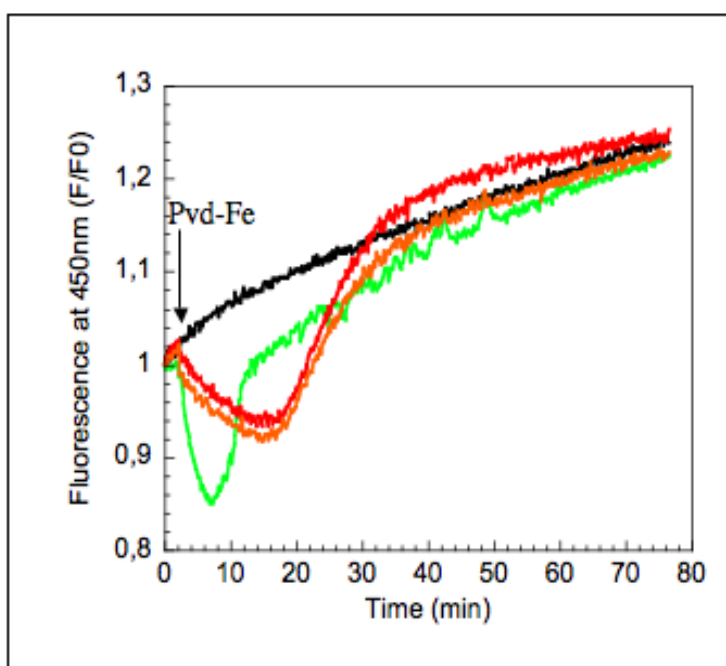
**Figure 48 : Incorporation de <sup>55</sup>Fe chez *P. aeruginosa* par les sidérophores endogènes**

Les cellules sont lavées puis resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1. Le transport est initié en ajoutant 100 nM de complexe sidérophore-fer. A. Transport du fer par la voie Pvd. B. Transport du fer par la Pch. Seul le CCCP a un effet sur l'incorporation de <sup>55</sup>Fe par la voie Pvd. Le blocage de l'ATP n'a pas d'impacte sur l'incorporation de fer par la bactérie. Dans le cas de la Pch, on observe un léger effet (20 à 30%) sur le transport du fer en présence d'arséniate.



### C. Effet de l'arséniate sur le signal caractéristique de FRET observé sur des souches Pvd+

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'effet de l'arséniate sur le signal caractéristique de FRET observé lors du transport du complexe Pvd-fer dans la cellule. Nous avons pu constater qu'un léger défaut de transport du complexe Pvd-Fe est observé en FRET pour les souches incubées avec l'arséniate par rapport à une souche sauvage (Figure 49). Le transport semble en effet être moins efficace par rapport à la souche sauvage. Pas contre, aucun effet de l'arséniate n'est observé sur la deuxième étape.



**Figure 49 : Effet de l'arséniate sur le signal de FRET**

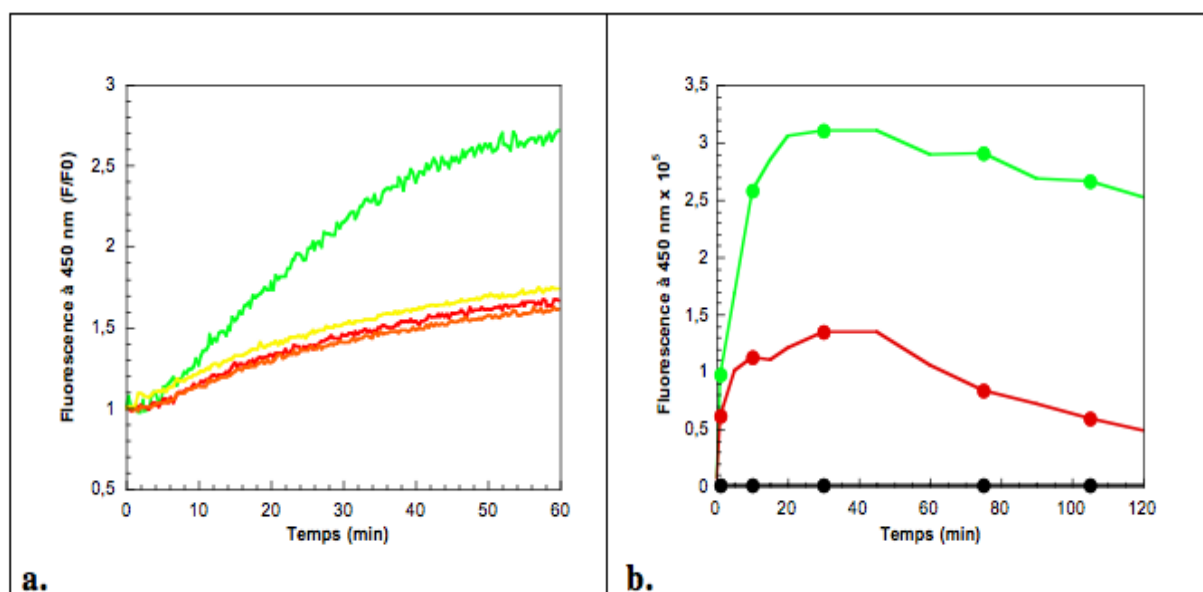
Les cellules K691 (surexprimant FpvA) sont lavées et resuspendues dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1 puis incubées avec différentes concentrations d'arséniate. Le transport est initié en ajoutant 150 nM de complexe Pvd-Fer. En noir : cellules seules ; en vert : cellules auxquels on a ajouté Pvd-Fe et en rouge et orange : cellules incubées avec Pvd-Fe et respectivement 1 mM ou 5 mM d'arséniate. On observe un défaut dans la première étape du signal (fixation de Pvd-Fe sur FpvA). La deuxième étape ne semblant pas être affectée.

### D. Effet de l'arséniate la dissociation du complexe Pvd-Fe

Grâce aux propriétés de fluorescence de la Pvd, nous pouvons suivre *in vivo* et en temps réel la dissociation du fer de la Pvd. En présence d'arséniate, une inhibition d'environ 50 % est observée pour cette dissociation (Figure 50a). Cette inhibition n'est pas dépendante de la concentration d'arséniate. L'énergie nécessaire au mécanisme de dissociation semble être dépendant de l'ATP.

### E. Effet de l'arséniate le recyclage de la Pvd

En utilisant les propriétés spectrales de la Pvd, nous avons également suivi le recyclage de la Pvd dans le périplasma après transport du fer dans la bactérie. Une inhibition de plus de 50% du recyclage est observée lorsque les cellules sont incubées en présence de l'arséniate (Figure 50b). Cette observation est en accord avec l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans le recyclage de la Pvd (Imperi et al., 2009 ; Yeterian et al., 2010) . Cette pompe est ATP dépendante.



**Figure 50 : Effet de l'arséniate sur la dissociation et le recyclage de la Pvd**

Les cellules sont lavées puis resuspendue dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 à une densité optique à 600 nm de 1. Le transport est initié en ajoutant 150 nM de complexe Pvd-Fer. a : Suivi de la dissociation du complexe Pvd-Fer dans des souches CDC5 (une souche délété pour la production de Pvd et surexprimant FpvA). En vert : cellules auquel est ajouté Pvd-Fer. Les courbes en rouge, orange et jaune correspondent à la même expérience mais avec des cellules préincubées en présence de respectivement 5 mM, 10 mM et 20 mM d'arséniate. b : Suivi du recyclage de la Pvd dans le milieu extérieur après dissociation du complexe Pvd-Fer. Les cellules sont incubées en présence de Pvd-Fer et à différents temps un aliquot est prélevé, les cellules centrifugées et la fluorecence mesurée dans le surnageant. La cinétique en vert, correspond à l'expérience avec les cellules CDC5 incubées en présence de Pvd-Fer, celle en noir, aux cellules CDC5 préincubées en présence de CCCP avant l'addition de Pvd-Fer et celle en rouge, aux cellules préincubées avec 5 mM d'arséniate.

### Conclusion du chapitre :

Les études effectuées en utilisant un inhibiteur de l'ATP ont montré dans le cas d'*E. coli* que les passages à travers la membrane externe et interne sont couplés pour la ferrientérobactine et le ferrichrome. Chez *P. aeruginosa*, on n'observe pas d'effet de l'arsenate sur le transport du fer par des sidérophores. Dans le cas du ferrichrome et de la ferripyocheline cela s'explique par l'implication d'une perméase dans le transport à travers la

membrane interne. Le transporteur impliqué dans le passage à travers la membrane interne dans la voie de l'entérobactine n'a pas encore été identifié. En ce qui concerne la Pvd, le complexe Pvd-Fe pourrait être stocké dans le périplasme de la bactérie ou être pris en charge par un autre transporteur ABC.



## **Conclusions et perspectives**



Durant cette thèse, nous nous sommes intéressées à différents aspects de la voie Pvd, le sidérophore majeur produit par *P. aeruginosa*. Nous avons étudié, les protéines et les mécanismes impliqués dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée, le mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe par FpvA au travers de la membrane externe et le mécanisme de contrôle de la sélectivité vis-à-vis du métal de cette voie.

Nous avons mis en évidence l'implication de la pompe à efflux ATP dépendante codée par les gènes *pvdR-pvdT-opmQ* dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée (Hannauer et al., 2010). Cette étude a été difficile et délicate car en absence de PvdRT-OpmQ, une autre pompe prend le relais et seul une inhibition partielle de la sécrétion de Pvd est observée et non une inhibition totale. Nous avons essayé d'identifier cette seconde pompe, mais sans succès pour l'instant. Cette étude concernant PvdRT-OpmQ est seulement le deuxième exemple décrit dans la littérature d'une pompe à efflux impliquée dans la sécrétion de sidérophores chez les bactéries Gram-négatives. L'autre exemple est EntS-TolC impliqué dans la sécrétion de l'entérobactine chez *E. coli* (Furrer et al., 2002; Bleuel et al., 2005). Contrairement au système EntS-TolC qui sécrète l'entérobactine du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, PvdRT-OpmQ récupère le sidérophore au niveau du périplasma pour le transporter à travers la membrane externe. PvdRT-OpmQ est composée de 3 protéines. Comme dans le cas du système d'efflux MacAB-TolC (Yamanaka et al., 2008), il existe probablement un passage entre la protéine de fusion PvdR et PvdT au niveau du périplasma qui permettrait à des substrats présents dans le périplasma d'être excrétés dans le milieu extracellulaire.

L'analyse par spectrométrie de masse du surnageant du double mutant PAO1*fpvApvdRTopmQ* a montré que cette souche ne produit qu'un précurseur de la Pvd ayant un chromophore non cyclisé et une chaîne grasse liée à la chaîne latérale sur le premier résidu sérine lié au chromophore. La sécrétion de ce précurseur nous permet d'émettre plusieurs hypothèses. Tout d'abord, la Pvd durant sa biosynthèse doit être liée à la membrane cytoplasmique et ne diffuse pas dans le périplasma. Avant la sécrétion de la Pvd dans le milieu extracellulaire, la chaîne grasse est clivée par PvdQ et le chromophore est cyclisé. Vu que le précurseur sécrété par le mutant PAO1*fpvApvdRTopmQ* est identique à celui sécrété par le mutant PAO1*pvdQ*, un système de régulation bipartite FpvA-PvdRT-OpmQ régulerait l'activité de PvdQ. En l'absence de ces deux transporteurs, FpvA et PvdRT-OpmQ, l'enzyme PvdQ est inactive et le précurseur de Pvd est sécrété. L'acylase PvdQ semble donc avoir deux fonctions : elle interviendrait d'une part dans la biosynthèse de la Pvd en clivant la chaîne

grasse pour permettre la sécrétion de la Pvd et d'autre part dans la régulation du quorum sensing en hydrolysant les AHLs (Bokhove et al., 2010 ; Huang et al., 2006; Sio et al., 2006). Ce travail sera publié en collaboration avec l'équipe de W. Quax qui a étudié l'hydrolyse *in vitro* de la chaîne grasse du précurseur de Pvd par PvdQ et résolue la structure de PvdQ avec la chaîne grasse issue de cette hydrolyse dans son site de liaison. L'ensemble de ces résultats sera publié dans un même article qui est en cours de rédaction.

Il serait intéressant d'approfondir l'étude de ce système d'efflux de Pvd en identifiant les interactions entre la pompe à efflux PvdRT-OpmQ et les autres protéines impliquées dans la voie Pvd tel que FpvA, PvdQ ou FpvC. Nous savons purifier ces 3 protéines et avons des anticorps polyclonaux correspondants. Il serait aussi intéressant d'identifier la seconde pompe à efflux capable de prendre le relais en l'absence de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Il faudrait pour cela étudier différents mutants délétés pour l'une des nombreuses pompes à efflux présentes chez *P. aeruginosa*. Il faudrait par exemple vérifier la sécrétion de Pvd chez le double mutant délété pour les gènes *pvdRTopmQ* et *mexABoprM* afin de vérifier si cette dernière pourrait intervenir dans la sécrétion de la Pvd en l'absence de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Par ailleurs, Véronique Gasser au laboratoire étudie actuellement l'implication de PvdRT-OpmQ dans la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*. Des résultats très prometteurs ont été obtenus indiquant que cette pompe joue effectivement un rôle essentiel dans la résistance de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques lorsque la bactérie pousse en milieu carencé en fer.

Nous nous sommes également intéressés au mécanisme de transport du complexe Pvd-Fe par FpvA au travers de la membrane externe. En fait, malgré la publication de nombreuses structures de récepteurs de sidérophores, on ne connaît toujours pas, le mécanisme de formation du canal dans le récepteur permettant le passage du ferrisidérophore. De précédentes études du groupe avaient montré que la Pvd était capable de faire du FRET avec les Trps des protéines (Schalk et al., 1999). Cette propriété permet de suivre *in vivo* et en temps réel le transport du fer par la Pvd avec les différentes étapes (Schalk et al., 2001): interaction avec FpvA puis avec une protéine encore non-identifiée du périplasme. FpvA ayant des Trps uniquement localisés dans la partie tonneau, nous avons supposé qu'il serait intéressant d'introduire des Trps dans le domaine bouchon. Cette introduction de Trps devrait permettrait de suivre une éventuelle interaction du sidérophore avec le bouchon durant le transport et plus particulièrement visualiser l'étape de dissociation du fer de la Pvd si celle-ci se déroule en interaction avec le bouchon dans le périplasme. Nous avons donc substitué 5



résidus tyrosines ou phénylalanines du bouchon par des tryptophanes et avons visualisé un signal supplémentaire en FRET pour les mutants F180W, F212W et Y219W. Cette variation du signal pourrait être dû à un mécanisme où le complexe Pvd-Fe se dissocie tout en restant lié au bouchon et déjà en interaction avec FpvC et FpvF. Lorsque le complexe Pvd-Fe est dissocié, Pvd est transporté vers PvdRT-OpmQ par FpvF et le fer par FpvC jusqu'au transporteur PvdDE. Pour vérifier ce scénario, il serait intéressant de surexprimer et purifier les bouchons avec ces mutations et de vérifier s'ils sont capables de lier le complexe Pvd-Fe ou Pvd-Ga en présence et en absence de FpvC et FpvF. Une interaction avec le complexe fluorescent Pvd-Ga devrait pouvoir être visualisé par FRET. Ensuite, il serait également intéressant d'introduire ces Trps dans le récepteur FpvA reconstitué (expression dans une même souche du tonneau à partir du chromosome et du bouchon à partir d'un plasmide) construit par M. Nader au laboratoire (Nader et al., 2011), afin de voir si la présence de ces Trps affecte le signal de FRET dans ce récepteur reconstitué. Mirella Nader avait montré qu'une souche exprimant un récepteur FpvA reconstitué était capable de transporter du fer via la Pvd, mais la plupart des étapes étaient ralenties.

Durant cette thèse, nous avons également étudié la capacité de FpvA de transporter des métaux autres que le fer en complexe avec la Pvd. Armelle Braud avait déjà montré que la Pvd en complexe avec de nombreux métaux était capable de se lier au site de liaison de FpvA avec des affinités allant de 0.5 nM pour le complexe Pvd-Fe à 13  $\mu$ M pour le complexe Pvd-Al. En comparant d'une part la quantité de métal accumulée en présence de Pvd et d'autre part la quantité de Pvd accumulée (suivie par fluorescence) dans les souches PAO1*pvdFfpvA* et PAO1*pvdD*, nous avons montré que FpvA pouvait en fait transporter différents complexes Pvd-métaux. Le site de liaison de FpvA n'est pas spécifique à Pvd-Fe et le mécanisme de translocation à travers le récepteur ne permet pas de sélectionner le complexe Pvd-Fe par rapport aux autres complexes éventuellement présents dans l'environnement de la bactérie. Ce résultat est très nouveau, car rien n'est décrit dans la littérature concernant la possibilité que des récepteurs de sidérophores transportent d'autres métaux que le fer en complexe avec le sidérophore correspondant.

Ces résultats nous ont conduit à supposer que la pompe PvdRT-OpmQ pourrait être impliqué dans le contrôle de la sélectivité du métal transporté par le système FpvA/Pvd en expulsant tout complexe Pvd-métal transporté autre que le complexe Pvd-Fe. Avec une approche similaire à celle décrite ci-dessus pour le transport de métaux par FpvA, nous avons montré que PvdRT-OpmQ joue un rôle essentiel dans le tri des complexes Pvd-métaux

transportés par le système FpvA/Pvd. En l'absence de la pompe, de nombreux complexes Pvd-métaux s'accumulent dans la bactérie. Ce résultat est également nouveau dans le domaine des sidérophores, car à ce jour, ceci est le premier exemple d'une pompe à efflux expulsant de la bactérie, des complexes Pvd-métaux autres que le complexe Pvd-Fe, qui pourraient être toxiques pour la cellule. Ces complexes restent associés dans le périplasme et ne semble pas se dissocier avant leur prise en charge par PvdRT-OpmQ. Il serait intéressant de vérifier si des systèmes équivalents existent chez d'autres voies de transport du fer ou s'il est spécifique à la voie Pvd.

La voie Pvd est incontestablement plus complexe que les différentes voies d'acquisition du fer décrites à ce jour chez *E. coli* et reste très différente et unique au niveau mécanistique. Pour continuer à mieux comprendre cette voie, il serait intéressant de clairement identifier les différentes étapes impliquées au niveau du périplasme dans la dissociation du complexe Pvd-Fe. A ce niveau également, cette voie semble très originale avec l'implication du gène PA2403 codant pour une protéine ayant des homologues avec le cytochrome b561. Ce type de protéine n'a jamais été décrit chez des bactéries et est impliqué chez les cellules eucaryotes dans le transfert d'électrons à travers la membrane. Les propriétés de fluorescence de la Pvd pourront être un outil précieux dans cette étude et devraient permettre de suivre *in vivo* et en temps réel les cinétiques de dissociation du complexe Pvd-Fe dans différents mutants. Reconstituer ce système *in vitro* avec des protéines purifiées pourrait être également un challenge intéressant. Dans le futur, il sera aussi intéressant d'étudier le fonctionnement de PvdRT-OpmQ et d'essayer de suivre le trajet du sidérophore au travers de cette pompe. Pour ce type d'étude, la capacité de la Pvd à faire du FRET avec les Trps devrait également être un outil clé pour suivre les différentes étapes de ce processus.

Durant cette thèse, je me suis également intéressée à l'acquisition du fer par le desferrichrome chez *P. aeruginosa*. Lorsque nous avons commencé cette étude, seules des données protéomiques réalisées en présence et en absence de fer et de desferrichrome avaient été publiées (Llamas et al., 2006). Cette étude montrait que le récepteur de membrane externe FiuA était induit en condition de carence en fer et en présence de desferrichrome. En suivant l'incorporation de <sup>55</sup>Fe en présence de desferrichrome sur le mutant de l'un des deux récepteurs de membranes externes, FiuA, nous avons montré que le récepteur FiuA est essentiellement impliqué dans le transport du ferrichrome à travers la membrane externe, et

que le récepteur FoxA pouvait également jouer ce rôle mais avec une efficacité moindre. Ces deux transporteurs de membranes externes sont TonB1 dépendant. Avec la même approche, nous avons également identifié les deux perméases FiuB et FoxB impliquées dans le transport du ferrichrome au travers de la membrane interne. Là également, les deux perméases ne transportent pas le ferrisidérophore avec la même efficacité, FiuB est impliqué dans 80 % du transport et FoxB seulement pour 20 %, dans nos conditions expérimentales.

Grâce à l'utilisation d'un analogue fluorescent du desferrichrome, nous avons pu montrer que le complexe ferrique était dissocié dans *P. aeruginosa* et ensuite recyclé dans le milieu extracellulaire. La dissociation implique FiuC, une N-acétyltransférase, acétylant le sidérophore après sa dissociation du fer. Par spectrométrie de masse, nous avons pu montrer que le desferrichrome acétylé est ensuite recyclé dans le milieu extracellulaire.

Dans la suite de ce projet, il serait intéressant de vérifier si une réduction du fer est nécessaire pour cette dissociation du complexe ferrichrome. En effet un tel mécanisme est proposé chez *E. coli* : la dissociation implique une réduction du fer ferrique en fer ferreux et une acétylation du desferrichrome par FhuF (Matzanke et al., 2004)). Il serait également intéressant, d'identifier le mécanisme impliqué dans l'efflux du desferrichrome acétylé de la bactérie vers le milieu extracellulaire. Aucune pompe à efflux n'est présente dans le locus du ferrichrome chez *P. aeruginosa*. Ceci suppose qu'une pompe localisée ailleurs dans le génome soit impliquée. Cette identification risque d'être difficile vu le nombre important de pompes à efflux présentes dans le génome de *P. aeruginosa*.

L'étude de l'acquisition du fer par les voies Pvd et desferrichrome chez *P. aeruginosa*, ainsi que les données dans la littérature concernant la voie Pch de *P. aeruginosa* et les voies d'acquisition du fer chez *E. coli*, montrent que les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus biologiques sont dépendant du sidérophore et de la bactérie. Ceci est un nouveau concept, car jusqu'à récemment il était convenu que les mécanismes mis en évidence chez *E. coli* étaient valables pour toutes les voies de transport du fer utilisant des sidérophores chez les bactéries Gram-négatives. L'étude de l'acquisition du fer par la Pvd montre que non. Par exemple, le fer peut se dissocier du sidérophore dans le cytoplasme comme pour les voies du ferrichrome ou de l'entérobactine ou dans le périplasme, comme pour la voie Pvd. La comparaison des voies du ferrichrome chez *E. coli* et *P. aeruginosa* indique que l'évolution a apporté ses variabilités pour une même voie dans deux organismes différents. La voie du ferrichrome est beaucoup plus complexe chez *P. aeruginosa* avec en supplément une cascade de signalisation qui régule l'expression de ces gènes. De plus le transporteur ABC impliqué

dans le passage à travers la membrane interne présent chez *E. coli* a été remplacé chez *P. aeruginosa* par une perméase. L'ensemble de cette étude montre également que la voie Pvd reste unique en son genre avec une dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasme et seul le fer est transporté dans le cytoplasme par probablement un transporteur ABC. La voie Pvd est pour l'instant la voie la plus complexe qui ait été étudiée.

Ces variabilités dans les mécanismes moléculaires impliqués dans l'assimilation du fer selon le sidérophore et la bactérie impliqués, montre que de nombreuses études sont encore nécessaires pour clairement comprendre tous ces systèmes. Par ailleurs, notre étude de contrôle de la sélectivité vis-à-vis du métal de la voie Pvd et également de la voie Pch (travaux d'A. Braud dans le laboratoire) montre que ces voies de transport du fer pourraient également transporter d'autres métaux biologiques essentiels pour la bactérie. Il serait donc intéressant de diriger les recherches dans ce sens pour d'autres voies d'acquisition du fer utilisant d'autres sidérophores.

**Chapitre 8 :**  
**Techniques utilisées pendant la thèse**



## **I. Purification de la Pvd**

Pour les expériences de LS-MS, d'ICP-AES et de MIC<sub>50</sub>, la Pvd a été purifiée comme décrit ci-après. Après 24h de culture en milieu carencé, les cellules sont centrifugées pendant 20 minutes à 5000 rpm. Le surnageant est récupéré, filtré sur membrane de 0,45 µm et acidifié à pH 3,6 avec de l'acide formique. Le mélange est mis à agiter en présence de résine C18. Après deux heures d'agitation, le tout est lavé sur un fritté avec de l'eau acide à pH 4 afin d'éliminer un maximum de sels. La Pvd est décrochée de la résine avec un mélange pyridine-acide acétique 2 M et acétonitrile (50/50). L'éluât est évaporé à l'évaporateur rotatif puis la Pvd est reprise dans de l'eau ultra pure, congelée et lyophilisée. La Pvd lyophilisée est soit analysée par LC-MS, soit resuspendue dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 pour les expériences d'ICP-AES ou dans du milieu succinate pour les études de MIC<sub>50</sub>. La Pvd ou le complexe Pvd-Fe utilisés dans les autres expériences ont été purifiés comme décrit précédemment (Demange et al., 1990).

## **II. Propriétés spectrales des sidérophores utilisés**

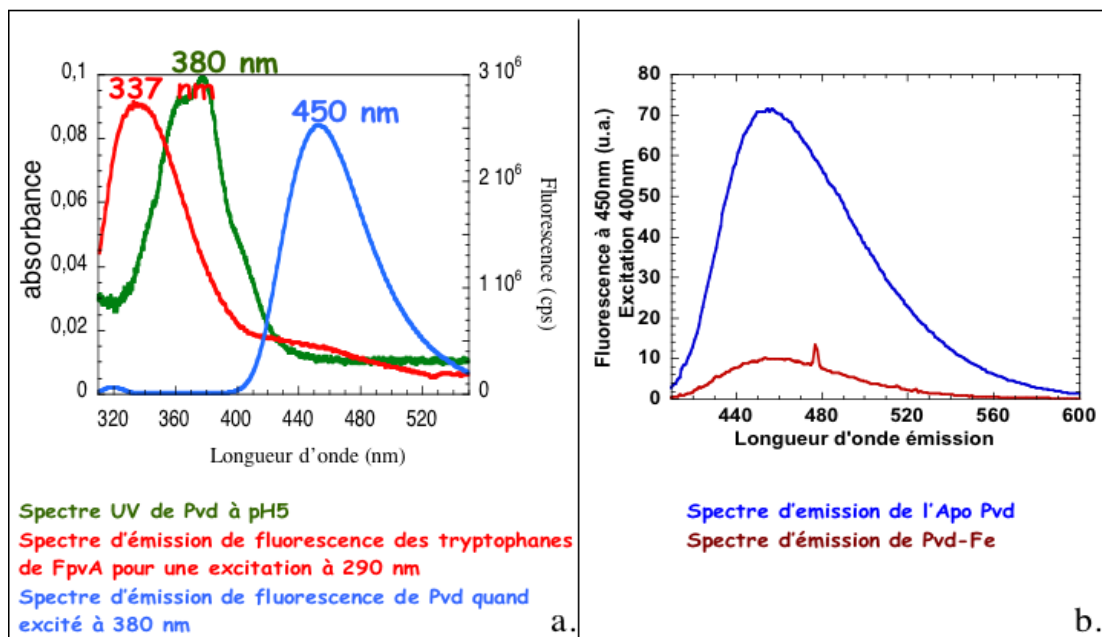
### **A. Caractéristiques spectrales de la Pvd et des complexes Pvd-Métaux**

À pH 5, la Pvd possède deux maximums d'absorption à 380 et 360 nm ( $\epsilon = 16500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Figure 51a) (Schalk et al., 1999). À pH 8, une seule bande d'absorption est observée à 400 nm ( $\epsilon = 19000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). En présence de fer, deux bandes à 400 nm ( $\epsilon = 19000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et 450 nm sont observées peu importe le pH (Schalk et al., 1999).

Lorsque l'apo Pvd est excitée à 400 nm, elle émet une fluorescence à 450 nm (Figure 50a). Cette fluorescence est modulée selon le métal chélaté. Par exemple, la fluorescence est complètement éteinte en présence de fer (Figure 51b) et en présence de nombreux autres métaux ( $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ...) elle est augmentée (Figure 52).

La Pvd a également les propriétés spectrales idéales pour faire du transfert d'énergie de fluorescence (FRET= Fluorescence Resonance Energy Transfert) avec les tryptophanes (Trp) des protéines. Les Trps sont des acides aminés fluorescents avec un maximum d'absorbance à 280-290 nm et une émission de fluorescence à 337 nm. Il y a un recouvrement

spectral entre l'émission de fluorescence des Trps et l'absorption de la Pvd (Figure 51a). Ce recouvrement indique qu'un transfert d'énergie de fluorescence est possible entre les Trps des protéines et la Pvd. Lorsque la Pvd est liée à une protéine contenant des Trps, la Pvd peut émettre de la fluorescence après excitation des Trps à 280 nm. Ce transfert d'énergie de fluorescence nécessite que le donneur (Trp) et l'accepteur (Pvd) soit à une distance de moins de 10 Å (Angström) (Stryer and Haugland, 1967). Cette technique est utilisée au laboratoire pour suivre les interactions entre la Pvd et les différentes protéines durant le transport (Schalk et al., 2002).

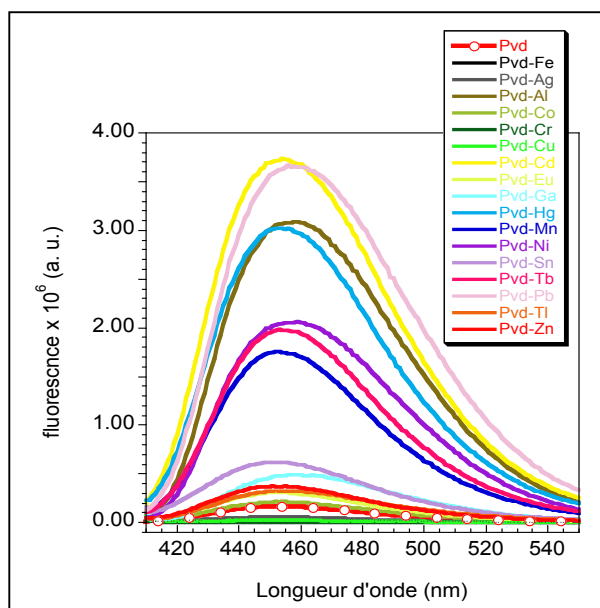


**Figure 51 : Caractéristiques spectrales de la Pvd**

Figure a : Le spectre d'absorption de la Pvd présente deux pics d'absorption à pH 5, à 360 et à 380 nm (spectre vert). Lorsque la Pvd est excitée à ces maximums d'absorption, elle émet de la fluorescence à 450 nm (spectre bleu). Sur la figure a, on voit également le spectre d'émission de fluorescence du récepteur FpvA (spectre rouge, excitation à 290 nm).

Figure b : Spectre d'émission de fluorescence de l'apo Pvd (spectre bleu) et de la Pvd ferrique (spectre rouge).



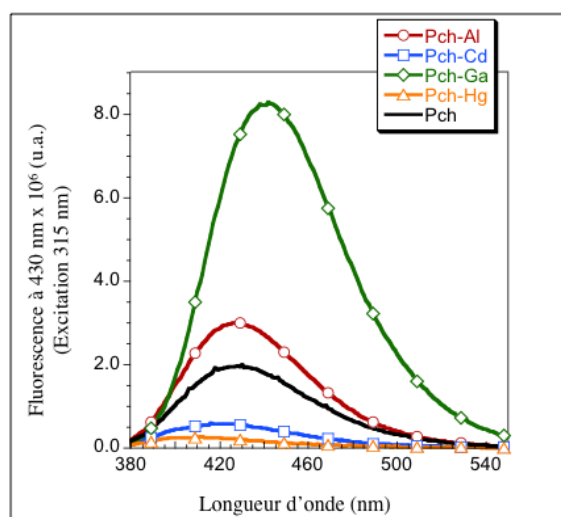


**Figure 52 : Spectre d'émission de fluorescence des différents complexes de Pvd-Métaux**

Sur cette figure, la plupart des complexes formés présentent une fluorescence équivalente voire supérieure à l'apo Pvd. Seuls les complexes Pvd-Fe, Pvd-Cu et Pvd-Ag présentent une extinction de la fluorescence de la Pvd (Braud et al., 2009b).

## B. Caractéristiques spectrales de la Pch et des complexes Pch-Métaux

La Pch en solution dans le méthanol a un maximum d'absorption à 347 nm et émet de la fluorescence à 430 nm. Cette fluorescence est éteinte lorsque le sidérophore est en complexe avec certains métaux comme le fer, le mercure et le cadmium et augmentée en présence de gallium et d'aluminium (Figure 53)(Braud et al., 2009a).

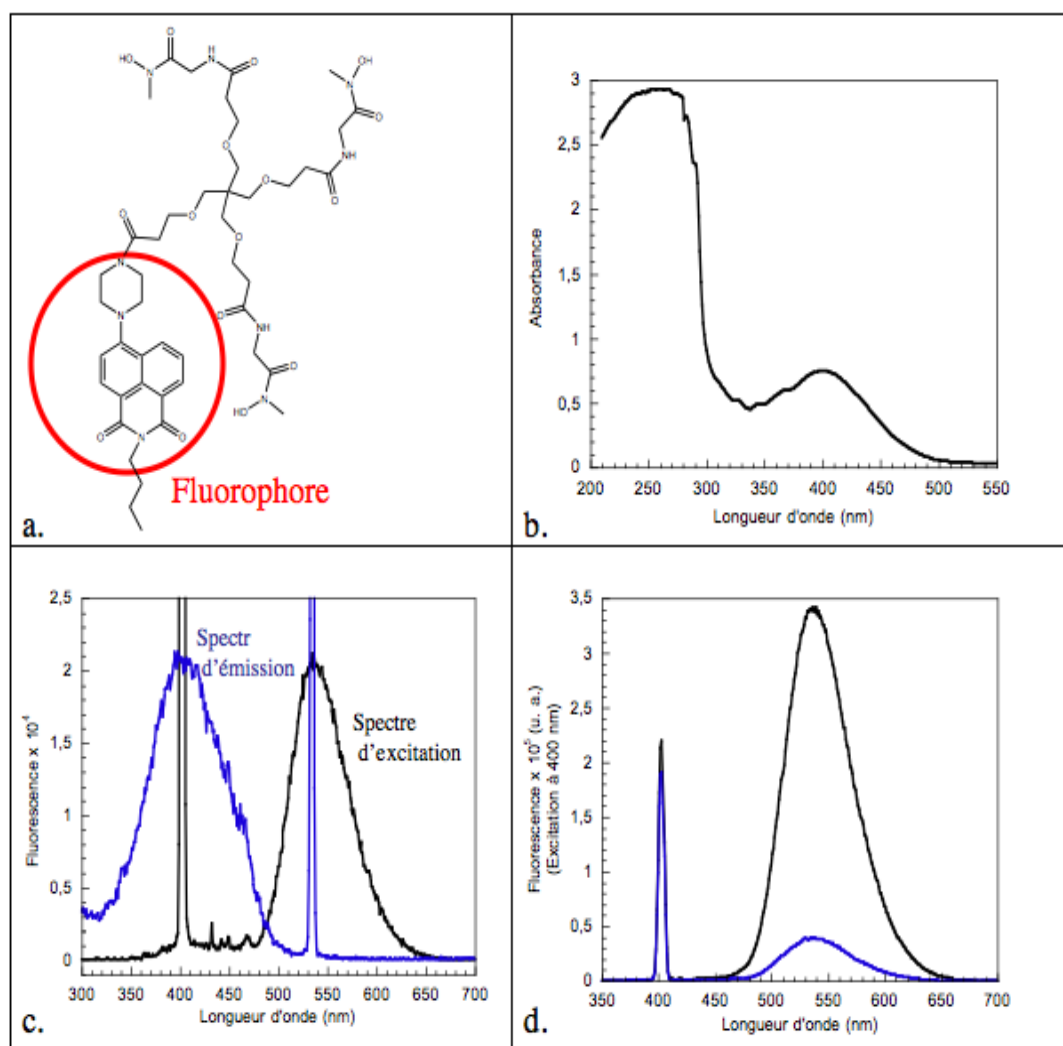


**Figure 53 : Spectre d'émission de fluorescence de complexes Pch-Métaux**

Une extinction de la fluorescence est observé pour l'argent, le cobalt, le cuivre, l'euporium, le nickel, le manganèse, le plomb, le thallium et le terbium. Une augmentation de la fluorescence est observée pour l'aluminium et le gallium (d'après Braud et al., 2009a). 25  $\mu$ M de Pch est incubé sur la nuit avec 12.5  $\mu$ M de métal dans 50 mM Tris-HCl pH 7.0.

## C. Caractéristiques spectrales de RL1194, un analogue fluorescent du ferrichrome

Cette molécule a été synthétisée par l'équipe du Pr Abraham Shanzer (Weizmann Institut, Israël). Cette molécule a un maximum d'absorption à 400 nm et émet de la fluorescence à 535 nm (Figure 54a et c). Tout comme dans le cas de la Pvd, la fluorescence de cette molécule est éteinte en présence de fer (Figure 54d).



**Figure 54 : Caractéristiques spectrales du composé RL1194**

a : Structure du composé RL1194. b : Spectre d'absorption de RL1194. c : Spectres d'émission de fluorescence (bleu foncé) et spectre d'excitation de fluorescence (noir). d : Spectre d'émission de fluorescence du composé RL1194 en absence de fer (courbe en noir) ou en présence d'un équivalent de FeCl<sub>3</sub> (courbe en bleue)(excitation à 400 nm). Les spectres d'absorbance sont effectués à une concentration de 80  $\mu$ M et les spectres de fluorescence à une concentration de 8  $\mu$ M pour la figure c et 160  $\mu$ M pour la figure d.

### **III. Techniques de spectroscopie et de microscopie de fluorescence**

Pour toutes les études effectuées, les bactéries ont été cultivées en milieu succinate (composition en g/L :  $K_2HPO_4$ , 6.0;  $KH_2PO_4$ , 3.0;  $(NH_4)_2SO_4$ , 1.0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2; acide succinique, 4.0 le pH est ajusté à 7.0 par addition de NaOH) durant la nuit à 30 °C avec les antibiotiques nécessaires selon les souches (voir tableau 5). Pour les souches d'*E. coli*, des casaminos acides (6 g/L) ont été ajoutés au milieu succinate et les cellules sont incubées à 37 °C. Pour être réellement dans des conditions de carence en fer, il est nécessaire de faire deux culture successives sur la nuit dans le milieu succinate. L'ensemble des souches utilisées durant cette thèse sont présentées dans le tableau 5.

Pour les expériences effectuées avec l'arsenate ou le CCCP, les cellules sont pré-incubées 15 minutes avec 5 mM d'arsenate ou avec 200  $\mu$ M de CCCP pour inhiber tout transport.

#### **A. Spectroscopie de fluorescence**

Les études de spectroscopie de fluorescence sont effectuées avec un spectrofluorimètre de type PTI (Photon International TimeMaster ; Bioritech). Les résultats obtenus sont ensuite traités avec le logiciel Kaleidagraph.

##### **1. Suivi de la production de Pvd**

Afin de suivre les cinétiques de production de Pvd, les bactéries après une culture sur la nuit sont centrifugées à 8500 rpm pendant 8 min. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du milieu succinate afin d'éliminer les traces de Pvd produite durant la croissance. Les cellules sont finalement resuspendues dans du milieu succinate à une densité optique à 600 nm de 0,01 ou 0,05. Le suivi de la production de Pvd a été effectué durant 2 h dans une cuve en quartz sous agitation à 30 °C. La fluorescence est mesurée à 450 nm (excitation à 400 nm)

Afin de doser la quantité de Pvd produite après une culture de 24 h, 1 ml de culture a été centrifugé et le surnageant récupéré. Ce surnageant est ensuite dilué et la fluorescence est mesurée à 450 nm (excitation 400 nm). La production de Pvd peut également être évaluée en mesurant l'absorbance à 400 nm.

Souche	Plasmide	Phénotypes	Résistance	Commentaire
<i>E. coli</i> TOP10	-	-	-	Invitrogène
<i>E. coli</i> $\Delta$ entB	-	<i>entB::kana</i>	Kana <sup>R</sup>	(Baba et al., 2006)
<i>E. coli</i> XL10 gold	-	-	-	Stratagène
PAO1	-	WT	-	(Stover et al., 2000)
PAO1 $\Delta$ fpvA	-	$\Delta$ fpvA	-	(Shirley and Lamont, 2009)
PAO1pvdFfpvA		$\Delta$ fpvA pvdF-	Kana <sup>R</sup>	(Shirley and Lamont, 2009)
PAO1pvdQ	-	$\Delta$ pvdQ	Genta <sup>R</sup> (20 mg/mL)	(Lamont and Martin, 2003)
PAO1pvdR	-	$\Delta$ pvdR	-	(Yétérian et al., 2010)
PAO1pvdT	-	$\Delta$ pvdT	-	(Yétérian et al., 2010)
PAO1opmQ	-	$\Delta$ opmQ	-	(Yétérian et al., 2010)
PAO1pvdRTopmQ	-	$\Delta$ pvdRTopmQ	-	(Hannauer et al., 2010)
PAO1pvdRTopmQ	pUCP22:: pvdRT- opmQ	PAO1 $\Delta$ pvdRTopmQ + pUCP22:: <i>pvdRT-opmQ</i>	Carbe <sup>R</sup>	(Hannauer et al., 2010)
PAO1pvdD	-	$\Delta$ pvdD	-	(Yétérian et al., 2010)
PAO1pvdD pvdRTopmQ	-	$\Delta$ pvdD $\Delta$ pvdRTopmQ	-	(Yétérian et al., 2010)
ID 17754	PA0470:: lacZ	<i>fiuA</i> -	Tetra <sup>R</sup>	Transposon Mutant Collection
ID 52153	PA0476:: phoA	<i>fiuB</i> -	Tetra <sup>R</sup>	Transposon Mutant Collection
ID 47871	PA0478:: phoA	<i>fiuC</i> -	Tetra <sup>R</sup>	Transposon Mutant Collection
PAO1 $\Delta$ fpvA pvdRTopmQ	-	$\Delta$ fpvA $\Delta$ pvdRT- <i>opmQ</i>	-	(Hannauer et al., 2010)
PAO1 $\Delta$ fpvA pvdRTopmQ	pUCP22:: pvdRT- opmQ	$\Delta$ fpvA $\Delta$ pvdRTopmQ + pUCP22:: <i>pvdRT-opmQ</i>	Carbe <sup>R</sup> ou Genta <sup>R</sup>	(Hannauer et al., 2010)
PAO1 $\Delta$ fpvA $\Delta$ fpvB	-	$\Delta$ fpvA $\Delta$ fpvB	Genta <sup>R</sup>	(Hannauer et al., 2010)
PAO1 $\Delta$ fpvA $\Delta$ fpvB pvdRTopmQ	-	$\Delta$ fpvA $\Delta$ fpvB $\Delta$ pvdRT- <i>opmQ</i>	-	(Hannauer et al., 2010)
PAO1 $\Delta$ fpvA	pUCP18 :: <i>fpvA</i>	$\Delta$ fpvA( <i>fpvA</i> )	Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1 $\Delta$ fpvA	pMH4	$\Delta$ fpvA(F180W)	Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1 $\Delta$ fpvA	pMH5	$\Delta$ fpvA(Y200W)	Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1 $\Delta$ fpvA	pMH7	$\Delta$ fpvA(F212W)	Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1 $\Delta$ fpvA	pMH8	$\Delta$ fpvA(Y219W)	Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1pvdFfpvA	pUCP18 :: <i>fpvA</i>	$\Delta$ fpvA( <i>fpvA</i> )	Kana <sup>R</sup> , Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1pvdFfpvA	pMH4	$\Delta$ fpvA $\Delta$ pvdF(F180W)	Kana <sup>R</sup> , Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1pvdFfpvA	pMH5	$\Delta$ fpvA $\Delta$ pvdF(Y200W)	Kana <sup>R</sup> , Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
PAO1pvdFfpvA	pMH7	$\Delta$ fpvA $\Delta$ pvdF(F212W)	Kana <sup>R</sup> , Carbe <sup>R</sup>	Ce travail

PAO1 <i>pvdFfpvA</i>	pMH8	$\Delta fpvA\Delta pvdF(Y219W)$	Kana <sup>R</sup> , Carbe <sup>R</sup>	Ce travail
K691	pPVR2	<i>fpvA+</i>	Tetra <sup>R</sup> Carbe <sup>R</sup>	(Schalk et al., 1999)
PAD07	-	Pch-/Pvd-	Strepto <sup>R</sup> Tetra <sup>R</sup>	(Takase et al., 2000a)
PAD08	-	<i>TonB-</i>	Tetra <sup>R</sup>	(Takase et al., 2000b)
PAD14	-	Pvd-/Pch-/ <i>TonB-</i>	Tetra <sup>R</sup>	(Takase et al., 2000b)

**Tableau 5 : Souches utilisées pendant cette thèse**

Tetra=Tétracycline, Genta=Gentamycine, Strepto=Streptomycine

## 2. Suivi de la dissociation des complexes sidérophores-Fe *in vivo*

Dans le cas du suivi de la dissociation du complexe Pvd-Fe, on utilise des cellules déficientes dans la production de Pvd afin de s'affranchir de la fluorescence de la Pvd endogène.

Une culture de cellules sur la nuit est centrifugée à 8500 rpm pendant 8 min. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Les cellules sont ensuite reprises dans ce même tampon et diluée à une DO à 600 nm de 1. 1 ml de cellules est finalement transféré dans une cuve en quartz. Après 2 minutes d'incubation, 150 à 300 nM de complexe Pvd-Fe sont ajoutés aux cellules. La cinétique est effectuée pendant 1 heure en mesurant la fluorescence à 450 nm (excitation : 400 nm) pour la Pvd et à 535 nm (excitation : 400 nm) pour le composé RL1194.

## 3. Suivi du transport du fer par la Pvd par FRET

Pour ces expériences, des cellules productrices ou déficientes dans la production de Pvd peuvent être utilisées. Les conditions expérimentales sont semblables à l'expérience de mesure des cinétiques de dissociation du complexe Pvd-Fe. La seule différence réside dans la longueur d'onde d'excitation, 290 nm.

## 4. Suivi du recyclage des sidérophores dans le milieu extracellulaire

Pour ces expériences, les cellules sont préparées comme précédemment (Chapitre 8-II-A-2). 15 ml de cellules à une DO à 600 nm comprise entre 1 à 1,5 sont incubées 2 h à 30 °C en présence de 300 nM de Pvd-Fe. Comme témoin négatif, les cellules sont incubées avec 200  $\mu$ M de CCCP pendant 15 minutes avant d'ajouter le complexe Pvd-Fe. À différents temps, 1 ml du mélange est prélevé, centrifugé et la fluorescence est mesurée dans le surnageant à 450 nm pour la Pvd (excitation : 400 nm) et à 535 nm pour le composé RL1194 (excitation : 400 nm).

## **5. Dosage de la présence de Pvd dans les différents compartiments cellulaires**

### **a. Fractionnement cellulaire**

20 à 30 ml de culture sur la nuit sont centrifugés durant 8 min à 8500 rpm. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Le culot est ensuite repris dans 500 µl de tampon Tris-sucrose (Tris HCl 0,2 M pH 8 ; Sucrose 20%). Du lysozyme à 1 mg/ml est ajouté et le mélange incubé 1 h sur la glace. Après incubation, les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 6700 rpm. Le surnageant obtenu correspond au périplasma. Le culot est lavé deux fois avec 250 µL de tampon Tris-Sucrose. Le culot est resuspendu dans 1ml d'eau glacée et 1 µl de benzonase (Fournisseur Sigma 250 U/µl) est ajouté. Le tout est incubé 1 h à 30 °C. Après incubation, la suspension est transférée dans un microtube à ultracentrifugation et centrifugée durant 40 minutes à 100 000 g et à 4°C. Le surnageant obtenu correspond au cytoplasme.

Dans le cas de l'étude de l'implication de la pompe à efflux dans l'efflux des complexes Pvd-métaux, les cellules après une culture sur la nuit sont centrifugées pendant 8 min à 8500 rpm, lavées deux fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 et resuspendues dans ce même tampon afin d'obtenir une DO à 600 nm de 1. 5 ml de cette suspension est ensuite incubée pendant 45 min avec 2 µM de complexe Pvd-métal. Les complexes sont préparés la veille en incubant 1,4 µl de Pvd à 14,7 mM avec 2 µl de métal à 50 mM. Après 15 minutes d'incubation, du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 est ajouté qsp 100µl. Après l'incubation de 45 min avec les complexes, les cellules sont lavées une fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 et le fractionnement est effectué comme décrit ci-dessus.

### **b. Dosage de la fluorescence présente dans les différentes fractions.**

Le périplasma et le cytoplasme obtenus lors du fractionnement sont dilués ou non dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 puis la fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre à 450 nm (excitation : 400 nm).

## **B. Microscopie de fluorescence**

600 µl d'agarose à 1% sont déposés entre deux lames. Lorsque l'agarose est solidifié, l'une des deux lames est retirée et l'agarose est laissé à sécher. Cette étape de séchage est importante pour s'affranchir de problèmes ultérieurs de mise au point du microscope. En effet, lorsque l'agarose est sec, il forme une fine couche relativement homogène et plane.

Les cellules sont centrifugées, lavées deux fois avec du milieu succinate puis resuspendues dans ce même milieu à une DO à 600 nm comprise entre 0,5 et 0,8.

Dans le cas de l'étude de l'implication de la pompe à efflux dans l'efflux des complexes Pvd-métaux, les cellules (déficientes pour la production de Pvd) sont incubées en présence de 2  $\mu\text{M}$  de complexes Pvd-métaux durant 45 minutes. Les complexes sont préparés comme décrit dans le point 5-a. Puis, les cellules sont lavées deux fois avec le même tampon et resuspendues à une DO à 600 nm entre 0,5 et 0,8.

6  $\mu\text{l}$  de ces suspensions bactériennes sont ensuite déposés sur les lames et recouvert d'une lamelle. Les échantillons sont observés au microscope avec un grossissement de 1500 x. Les images sont acquises sur un microscope Nikon 50i (Objectif : CFI Achroplan 100x ON 1,25 DT 0,18) équipé d'une caméra numérique 12 bits DS-Fi1. Les images sont prises à l'aide du logiciel NIS elements et traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

## **IV. Transport du fer et bioaccumulation de métaux**

### **A. Transport de $^{55}\text{Fe}$**

Des expériences de transport de  $^{55}\text{Fe}$  ont été réalisées avec la Pvd, la Pch, le desferrichrome, RL1194 et l'entérobactine. Pour la préparation des complexes sidérophores- $^{55}\text{Fe}$ , 250  $\mu\text{M}$  de  $^{55}\text{Fe}$  est dilué au 1/10<sup>e</sup> avec du fer non radioactif. 2  $\mu\text{l}$  de cette solution à 250  $\mu\text{M}$  sont incubés avec soit 5  $\mu\text{l}$  de sidérophore à 400  $\mu\text{M}$  pour la Pvd, soit 5  $\mu\text{l}$  de sidérophore à 1 mM dans le cas de desferrichrome, de RL1194 et de l'entérobactine ou 1  $\mu\text{l}$  de sidérophore à 10 mM dans le cas de la Pch. Après 10 minutes d'incubations, le volume est ramené à 50  $\mu\text{l}$  par du tampon Tris HCl 50 mM pH 8.

Les cellules bactériennes sont préparées comme décrit pour les expériences de fluorescence à une DO à 600 nm de 1 dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 8. 1 ml de cette suspension bactérienne est incubée en présence de 10  $\mu\text{l}$  de complexe sidérophore- $^{55}\text{Fe}$ . A différents temps, 100  $\mu\text{l}$  sont prélevés, filtrés sur des filtres (GF/B Whatmann, porosité 1  $\mu\text{m}$ ) et lavés avec 2 ml de tampon Tris HCl 50 mM pH 8. Ce lavage peut également être remplacé par un lavage avec HCl 0,5 N pour les fortes concentrations de complexes sidérophores- $^{55}\text{Fe}$ . Les filtres sont ensuite transférés dans des fioles à scintillation avec 2,5 ml de liquide de scintillation. Après une heure d'incubation, les fioles sont mises à compter sur un scintillateur

de type Packard TriCarb 2100 TR. L'expérience est répétée avec des cellules traitées durant 15 minutes avec 200  $\mu\text{M}$  de CCCP.

Dans le cas de la Pch, l'expérience est effectuée avec une petite variante due à la faible solubilité de ce sirérophore. 3 ml de suspension bactérienne sont incubée en présence de 30  $\mu\text{l}$  de complexe sidérophore- $^{55}\text{Fe}$ . 300  $\mu\text{l}$  du mélange sont prélevés et transférés dans un microtube. L'incorporation de  $^{55}\text{Fe}$  est stoppée par l'ajout de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 froid. Le tout est immédiatement centrifugé et le surnageant retiré. 1 ml de liquide de scintillation est ajouté au culot et le tout est mis à compter après 1 h d'incubation.

## **B. Bioaccumulation des métaux**

L'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) a été utilisé pour identifier et doser les métaux accumulés dans les bactéries. Les complexes Pvd-métaux sont préparés en incubant 20  $\mu\text{M}$  de Pvd et 5  $\mu\text{M}$  de métal pendant au moins 24 h dans 8 ml de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. Les bactéries préparées comme précédemment (Chapitre 6-II-A-2) sont resuspendues dans du tampon Tris HCl 50 mM pH 8 à une DO à 600 nm de 5. 2 ml de cette suspension sont dilués dans les 8 ml contenant 5  $\mu\text{M}$  de Pvd-métaux (DO à 600 nm finale de 1). Après 45 minutes d'incubation à 30 °C, les cellules sont culottées et le surnageant est filtré et acidifié en présence d' $\text{HNO}_3$  à 20 % ( $[\text{HNO}_3]$  finale=5 %). Le culot de cellules est lavé avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 puis resuspendu dans 1 ml d'eau ultra pure. Le tout est ensuite transféré dans des tubes en verre et séché à 65 °C pendant 48 h. Lorsque l'eau est évaporée, le culot est minéralisé avec 1 ml d' $\text{HNO}_3$  50% pendant une nuit à température ambiante. Après minéralisation, le volume est complété à 10 ml avec de l'eau ultra pure ( $[\text{HNO}_3]$  finale=5 %).

En attendant l'analyse par ICP-AES, les échantillons sont conservés à -20 °C. Les données sont ensuite traitées avec Excel.

## **C. Détermination des $\text{MIC}_{50}$ des métaux vis-à-vis de *P. aeruginosa*.**

Les  $\text{MIC}_{50}$  (Minimal Inhibition Concentration), est la concentration minimale inhibant 50% de la croissance bactérienne. Les dilutions de métaux ou de complexes Pvd-métaux sont effectuées dans du milieu succinate puis dilués en cascade au demi, de 500  $\mu\text{M}$  à 0,49  $\mu\text{M}$ , dans des plaques 96 puits. Un témoin positif et un témoin négatif sans métal et sans bactérie est également préparé.



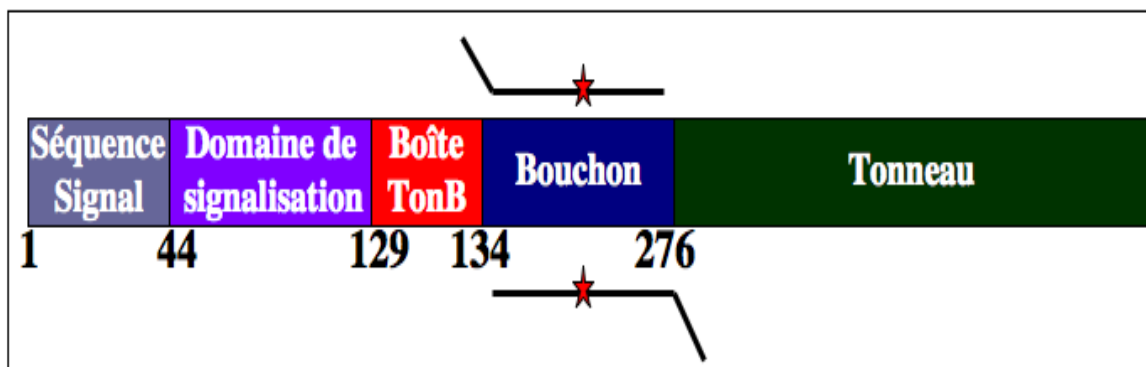
Les bactéries après une culture sur la nuit dans le milieu succinate sont rediluées dans ce même milieu à un DO à 600 nm de 0,001 et ajoutée aux métaux ou aux complexes Pvd-métaux dans les plaques 96 puits. La concentration finale de cellule au temps 0 est de 0,0001. Les plaques sont mises à incuber à 30 °C sur un agitateur de plaque. La croissance bactérienne est suivie en fonction du temps par lecture de la DO à 600 nm à l'aide du lecteur de plaque de la marque TECAN série InfiniteM200. Une lecture au temps 0 est nécessaire due à la précipitation des métaux dans le milieu de culture. Ce blanc sera déduit des lectures effectuées à 18 h, 24 h et 48 h.

## **V. Construction de mutants ponctuels**

### **A. Construction des différents vecteurs**

#### **1. Technique de Mutagenèse dirigée**

Des tyrosines ou des phénylalanines ont été substituées par des tryptophanes dans le bouchon du récepteur FpvA. Le protocole du kit Quik Change XL Site-Directed Mutagenesis de Quiagen a été utilisé et pour la PCR (Polymerase Chain Reaction) la PfuTurbo (Figure 55). Les conditions de PCR sont : une étape de dénaturation pendant 5 min à 95 °C, 18 cycles comprenant une dénaturation pendant 50 s à 95 °C, une hybridation pendant 50 s à 60 °C et une élongation pendant 9 min et 30 s à 68 °C (1min/kb), et enfin une étape d'élongation finale à 68 °C pendant 10 min. Les gènes sont amplifiés à l'aide des oligonucléotides adéquats présentés dans le tableau 6. Le mélange réactionnel est constitué de tampon 5x (tampon de l'enzyme préconisé par Stratagène), de dNTPs (0,2 mM), d'oligonucléotides (125 ng), de PfuTurbo (2,5 U/ $\mu$ L) et d'ADN parental dans un volume final de 50  $\mu$ L. Les PCR sont réalisées sur le plasmide pUCP18 contenant déjà comme insert la séquence du récepteur FpvA.



**Figure 55 : Méthode utilisée pour la construction des mutants**

Les deux oligonucléotides contenant la mutation s'hybrident au même endroit sur le brin d'ADN. L'ensemble du gène ainsi que le plasmide sont amplifiés par PCR. Le plasmide obtenu contient donc le gène avec la mutation et est transformé dans des bactéries Ultracompetentes.

## 2. Technique de PCR classique

Afin d'étudier de manière plus approfondie la liaison du bouchon avec le complexe Pvd-Fe, les inserts présent sur les différents plasmides contenant la mutation sont amplifiés par PCR à partir des plasmides pMH4, pMH5, pMH7 et pMH8 à l'aides des oligonucléotides adéquats présentés dans le tableau 6. Le mélange réactionnel de PCR est constitué de tampon GC 10x, de DMSO (100 %), de dNTPs (0,2 mM), d'oligonucléotides (5  $\mu$ M), d'enzyme IPROOF (2 U/ $\mu$ l, Biorad) et d'ADN matrice (100 ng). La PCR est effectuée de la manière suivante : une étape de dénaturation pendant 5 min à 98 °C, 25 cycles comprenant une dénaturation pendant 10 s à 98 °C, une hybridation pendant 30 s à 65 °C et une élongation pendant 25 s à 72 °C (30 s/kb), et enfin une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 min. Le produit de PCR ainsi obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction NcoI et XhoI puis introduit par ligation dans le vecteur pET20b (+) ouvert avec ces mêmes sites.

## B. Transformation par choc thermique dans *E.coli* et *P. aeruginosa*

Pour les cellules *E.coli* XL-10-Gold Ultracompetent cells (stratagène), la transformation est réalisée en mélangeant 2  $\mu$ l du milieu réactionnel de PCR traité avec DPN1 avec 45  $\mu$ l de cellules préalablement incubées avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol (comme préconisé par le fournisseur Stratagène). Ce mélange est incubé dans la glace pendant 30 min puis un choc thermique est effectué en mettant les cellules à 42 °C pendant 30 s puis à nouveau 2 min dans la glace. 500  $\mu$ l de NZY+ sont ajoutés, le mélange est incubé 1 h à 37 °C. Deux fois 250  $\mu$ l sont

ensuite étalés sur boîte LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et incubés sur la nuit à 37°C.

Pour les cellules *E. coli* classique et *P. aeruginosa*, 100 µl de cellules sont incubés avec 1 µl de plasmide ou 10 µl de produit de ligation pendant 30 min dans la glace. Un choc thermique est ensuite effectué comme précédemment. 900 µl de LB sont finalement ajoutés aux cellules et le tout est incubé pendant 1 h à 37 °C. 100 µl et 900 µl sont étalés sur boîte LB contenant l'antibiotique adéquat et incubés durant la nuit à 37 °C.

### **C. Criblage des colonies issues de la transformation par PCR**

Une colonie de la boîte est prélevée avec un cure-dent que l'on plonge dans le mélange réactionnel de PCR (Mix PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, dNTP à 0,2 mM, 0,02 U/µl de Taq Pol, oligos à 0,5 µM qsp H<sub>2</sub>O) et que l'on repique sur boîte LB contenant l'antibiotique adéquat. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau 7.

La PCR a été réalisée en utilisant la Taq polymérase dans les conditions suivantes : dénaturation initiale pendant 5 min à 95 °C, puis 30 cycles comprenant une dénaturation pendant 30 s à 95 °C, une hybridation pendant 30 s à 63 °C et une élongation de 9 min et 30 s à 72 °C (1min/kb). L'élongation finale se fait à 72 °C pendant 10 min.

Les colonies positives sont ensuite mises en préculture dans du milieu LB durant la nuit à 37°C. A partir de ces cultures, une préparation d'ADN plasmidique est effectuée à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Les plasmides isolés sont analysés par séquençage avec les oligonucléotides adéquats (tableau 7) au service de séquençage de l'IGBMC. Les séquences sont lues grâce au logiciel FourPeaks. Les plasmides obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Oligonucléotides	Séquences
F180c	CAGAACATGGACGACT <u>GGGG</u> CCTCAACAACATCG
F180nc	CGATGTTGTTGAGG <u>CCCC</u> AGTCGTCATGTTCTG
F180nc2	GCGGGTGACCACGGTGATCGACTGGGG
Y200c	ATCACCGTCTCGGCCTGGGACACTCACCGCAACAA
Y200nc	TTGTTGCGGTGAGTGT <u>CCC</u> AGGCCGAGACGGTGAT
Y207c	CTGACCGCAACA <u>ACTGGT</u> TATGCCCCG
Y207nc	GCGGGCATA <u>CCAGTT</u> GTTGCGGGTCAG
Y208c	CGAACAACTAT <u>TGGG</u> CCCCGCGGCTT
Y208nc	AAGCCGCGGG <u>CCCA</u> ATAGTTGTTTCG
F212c	TACTATGCCCCGCGGCTGGTTCGATCAACA <u>ACTTC</u>
F212nc	GAAGTTGTTGATCGA <u>CCAG</u> CCGCGGGCATACTA
F217c	GCTTCTCGATCAACA <u>ACTGGC</u> AGTACGACGGGATTCC
F217nc	GGAATCCCGTCTGACTG <u>CCAGTT</u> GTTGATCGAGAACG
Y219c	CTTCTCGATCAACA <u>ACTTCCAGT</u> GGGACGGGATTCC
Y219nc	GGAATCCCGT <u>CCC</u> ACTGGAAGTTGTTGATCGAGAAG
Y231c	CAACGT <u>CGGCTGGT</u> CCGCGGGCAATA
Y231nc	TATTGCCCGCGG <u>ACCAG</u> CCGACGTTG
Y243c	AGTGACATGGCCATCTGGGACCGGGAGGAAGTA
Y243nc	TACTTCCTCCCGGT <u>CCAGAT</u> GGCCATGTCACT
FpvA1	GAT <u>CCCATGG</u> CCAGGAAGTCGAGTTC
FpvA3	GCATCTCGAGTTCATGGGTAGGTTTCTTGC

**Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée et le clonage du bouchon de FpvA dans pET20b(+)**

La séquence mutée est soulignée ainsi que les sites de restriction pour FpvA1 et FpvA3.

Oligonucléotides	Séquences
FpvA1	GATCCCATGGCCAGGAAGTCGAGTTC
FpvA5	GCACAAGCTTTTATTCATGGGTAGGTTTCTTGCGG
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGG
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

**Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour le séquençage**

Plasmides	Caractéristiques	Résistance	Référence
pUCP18	Plasmide à large spécificité d'hôte et à haut nombre de copies. Possède une origine de réplication pour <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	Ampi/Carbe	(Schweizer et al., 2001)
pET20b(+)	Vecteur d'expression contenant une séquence signal pelB permettant l'adressage au périplasme et une étiquette histidine	Ampi	Novagen
pMir23	pUCP18 contenant fpvA avec 1000 pb en amont et en aval du gène pour une expression sous son propre promoteur	Ampi/Carbe	Nader M., résultats non publié
pMH4	pUCP18-fpvA La phénylalanine en position 180 a été substituée par un tryptophane (F180W)	Ampi/Carbe	Ce travail
pMH5	pUCP18-fpvA La tyrosine en position 200 a été substituée par un tryptophane (Y200W)	Ampi/Carbe	Ce travail
pMH6	pUCP18-fpvA La tyrosine en position 207 a été substituée par un tryptophane (Y207W)	Ampi/Carbe	Ce travail
pMH7	pUCP18-fpvA La phénylalanine en position 212 a été substituée par un tryptophane (F212W)	Ampi/Carbe	Ce travail
pMH8	pUCP18-fpvA La tyrosine en position 219 a été substituée par un tryptophane (Y219W)	Ampi/Carbe	Ce travail
pMH10	pET20b(+)-fpvA (44-276pb) contenant la mutation F180W	Ampi	Ce travail
pMH11	pET20b(+)-fpvA (44-276pb) contenant la mutation Y200W	Ampi	Ce travail
pMH12	pET20b(+)-fpvA (44-276pb) contenant la mutation F212W	Ampi	Ce travail
pMH13	pET20b(+)-fpvA (44-276pb) contenant la mutation Y219W	Ampi	Ce travail

**Tableau 8 : Plasmides utilisés et obtenus lors de cette étude**

Ampi=Ampicilline ; Carbe=Carbenicilline



## **Annexes**





## The *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity<sup>∇</sup>

Armelle Braud, Mélissa Hannauer, Gaëtan L. A. Mislin, and Isabelle J. Schalk\*

*Métaux et Microorganismes: Chimie, Biologie et Applications, FRE3211-LC1, CNRS-Université de Strasbourg, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France*

Received 5 January 2009/Accepted 13 March 2009

**Pyochelin (Pch) is one of the two major siderophores produced and secreted by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to assimilate iron. It chelates iron in the extracellular medium and transports it into the cell via a specific outer membrane transporter, FptA. We used the fluorescent properties of Pch to show that this siderophore chelates, in addition to Fe<sup>3+</sup> albeit with substantially lower affinities, Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Tl<sup>+</sup>, and Zn<sup>2+</sup>. Surprisingly, the Pch complexes with all these metals bound to FptA with affinities in the range of 10 nM to 4.8 μM (the affinity of Pch-Fe is 10 nM) and were able to inhibit, with various efficiencies, Pch-<sup>55</sup>Fe uptake in vivo. We used inductively coupled plasma atomic emission spectrometry to follow metal uptake by *P. aeruginosa*. Energy-dependent metal uptake, in the presence of Pch, was efficient only for Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, and Ni<sup>2+</sup> were also transported, but the uptake rates were 23- to 35-fold lower than that for Fe<sup>3+</sup>. No uptake was seen for all the other metals. Thus, cell surface FptA has broad metal specificity at the binding stage but is much more selective for the metal uptake process. This uptake pathway does not appear to efficiently assimilate any metal other than Fe<sup>3+</sup>.**

Iron is essential for the growth and development of living systems; it functions as a catalyst in some of the most fundamental enzymatic processes, including oxygen metabolism, electron transfer, and DNA and RNA synthesis. However, in aerobic environments, iron is found as highly insoluble ferric hydroxide complexes, and these forms severely limit the bioavailability of iron. The maximum concentration of free Fe<sup>3+</sup> in solution at a pH close to 7 has been estimated to be about 10<sup>-18</sup> M (40). To acquire iron, most microorganisms produce efficient, low-molecular-weight chelating agents, called siderophores, that can deliver iron into cells via active transport systems (5, 44). Siderophores have an extremely high affinity for ferric iron ( $K_a = 10^{43}$  and  $10^{32}$  M<sup>-1</sup> for enterobactin and pyoverdine [Pvd], respectively [2, 32]), but they also form complexes with metals other than Fe<sup>3+</sup>, although with a lower affinity. For example, the formation constants for the complexes of the hydroxamate siderophore desferrioxamine B with Ga<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, and In<sup>3+</sup> are between 10<sup>20</sup> and 10<sup>28</sup> M<sup>-1</sup>, and that with Fe<sup>3+</sup> is 10<sup>30</sup> M<sup>-1</sup> (19); the constants for Pvd with Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> are between 10<sup>17</sup> and 10<sup>22</sup> M<sup>-1</sup>, and that with Fe<sup>3+</sup> is 10<sup>32</sup> M<sup>-1</sup> (8). Siderophores also bind strongly to actinides, including thorium, uranium, neptunium, and plutonium (18, 28, 33, 34, 39).

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium commonly found in soil and water; it is also an opportunistic pathogen frequently encountered in hospitals, causing morbidity and mortality in immunocompromised and cystic fibrosis patients.

The strain *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1) synthesizes two major siderophores, Pvd and pyochelin (Pch) (20). Pch, the focus of this paper, is a poorly water-soluble, low-molecular-weight thiazoline derivative [2(2-*o*-hydroxy-phenyl-2-thiazolin-4-yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid] (14), which binds Fe<sup>3+</sup> with a stoichiometry of 2:1 (Pch to Fe<sup>3+</sup>) (42) and a stability constant of  $2 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> (determined in ethanol) (13). This stability constant is low for a siderophore and may be higher in aqueous media. Pch biosynthesis is modulated by both the amount of iron present in the environment and the amount of iron already acquired by the bacteria. In the presence of iron, the repression occurs via the cytoplasmic Fur protein, which binds to the promoters of *pchR* (23, 29), an AraC-like regulatory protein (25). In the absence of iron, the PchR proteins positively regulate the biosynthesis of Pch (25). The structure of the Pch outer membrane receptor from *P. aeruginosa* PAO1, FptA, loaded with Pch-Fe, has been determined (11). The structure of FptA is typical of this class of transporter ([http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane\\_Proteins\\_xtal.html](http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html)): a transmembrane 22-β-stranded barrel occluded by an N-terminal domain containing a mixed four-stranded β-sheet. The Pch binding pocket is composed principally of hydrophobic and aromatic residues (Phe114, Leu116, Leu117, Met271, Tyr334, Gln395, and Trp702), consistent with the siderophore's hydrophobicity. One Pch molecule complexed with iron was found in the binding site, thus providing the first three-dimensional structure of this siderophore. In this structure, Pch provides a tetradentate coordination of iron, and ethylene glycol, which is not specifically recognized by the protein, provides a bidentate coordination (11). Another 1:1:1 complex between Pch (tetradentate), cepabactin (Cep) (a bidentate siderophore), and iron(III) has been isolated from *Burkholderia cepacia* culture media and characterized (22); it binds FptA via the Pch molecule, with an affinity intermediate

\* Corresponding author. Mailing address: Métaux et Microorganismes: Chimie, Biologie et Applications, FRE 3211, ESBS, Blvd Sébastien Brant, BP 10412, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France. Phone: 33 3 90 24 47 19. Fax: 33 3 90 24 48 29. E-mail: schalk@esbs.u-strasbg.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 27 March 2009.

TABLE 1. *P. aeruginosa* strains used in this study

Strain	Description	Reference
PAO1	Wild type	35
CDC5(pPVR2)	Pvd <sup>-</sup> FpvA <sup>+</sup>	37
PAD07	Pvd <sup>-</sup> Pch <sup>-</sup>	41
PAO6297	Pch <sup>-</sup>	38
PAO6428	$\Delta$ fptA	24
K2388	$\Delta$ fptA Pvd <sup>-</sup>	26

between those for Pch<sub>2</sub>-Fe and Cep<sub>3</sub>-Fe (siderophore-to-Fe<sup>3+</sup> stoichiometries of 2:1 and 3:1, respectively). Pch has three chiral centers at positions C4', C2'', and C4''. Removal of the C4' chiral center did not affect the binding properties or the iron uptake ability. However, after removal of both the C4' and C2'' chiral centers, the molecule still bound to FptA but was unable to transport iron (26).

The relatively low affinity of Pch for Fe<sup>3+</sup> and the possible availability of ligation sites other than oxygen (i.e., sulfur and nitrogen) have led to the notion that the Pch/FptA system may be able to transport metals other than iron into the bacteria. Indeed, Pch chelates vanadium, and the complex formed becomes toxic for *P. aeruginosa* (4). It also chelates Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, and Ni<sup>2+</sup> ions (27, 43), but no data are available about whether these Pch-metal complexes are recognized and transported by FptA. We therefore investigated the behavior of the Pch/FptA uptake pathway of *P. aeruginosa* PAO1 in the presence of 16 different metals. We found that Pch is able to chelate all the metals tested (Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, Tl<sup>+</sup>, and Zn<sup>2+</sup>). All of these Pch-metal complexes except Pch-Hg were able to bind to FptA with affinities in the range of 10 nM to 4.8  $\mu$ M (the affinity of Pch-Fe is 10 nM) and were able to inhibit, with various efficiencies, Pch-<sup>55</sup>Fe uptake *in vivo*. In the presence of Pch, substantial proton motive-dependent uptake was observed only for Fe<sup>3+</sup>, although Ga<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Ni<sup>2+</sup> were also taken up at clearly lower rates. Our findings suggest that the FptA binding site may interact with Pch in complex with diverse metals, but the high specificity of the uptake mechanism in *P. aeruginosa* allows efficient accumulation only of Fe<sup>3+</sup>.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Pch was prepared as described previously (45). Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was purchased from Sigma. The metals studied were in the following forms: AgNO<sub>3</sub> (Sigma), AlCl<sub>3</sub> (Sigma), CdCl<sub>2</sub> · 2.5H<sub>2</sub>O (Proballo), CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Strem), CrCl<sub>3</sub> (Strem), CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Strem), EuCl<sub>3</sub> (Aldrich), FeCl<sub>3</sub> (Prolabo), Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 24H<sub>2</sub>O (Strem), HgCl<sub>2</sub> (Sigma), MnSO<sub>4</sub> (Prolabo), NiCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O (Strem), Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Aldrich), SnCl<sub>2</sub> (Prolabo), TlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Strem), Ti<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka), and ZnCl<sub>2</sub> (Alfa Aesar). All the metal salts were prepared at a concentration of 50 mM in 0.5 N HCl or 0.5 N HNO<sub>3</sub> to ensure solubilization.

**Bacterial strains and growth media.** Wild-type *P. aeruginosa* strain PAO1 (35) and the following four mutants were used (Table 1): PAD07, a strain deficient in Pch and Pvd synthesis (41); PAO6297, a strain deficient only in Pch synthesis (38); PAO6428, an FptA-deficient mutant (24); and CDC5(pPVR2), a strain overproducing FpvA and deficient in Pvd synthesis (3, 37). All the strains were grown overnight in a succinate medium (16) in the presence of 50  $\mu$ g/ml tetracycline and 100  $\mu$ g/ml streptomycin for strain PAD07 and 150  $\mu$ g/ml carbenicillin for strain CDC5(pPVR2).

**Fluorescence analyses of Pch-metal complexes.** Fluorescence experiments were performed with a PTI (Photon Technology International TimeMaster, Bioritech) spectrofluorometer. For all experiments, the samples were excited at

347 nm. To follow metal complexation by Pch, 25  $\mu$ M Pch was incubated overnight at room temperature in the presence of 12.5  $\mu$ M of metal in 1 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer.

**<sup>55</sup>Fe uptake by *P. aeruginosa*.** <sup>55</sup>Fe uptake assays in the presence of Pch and various metals were carried out as reported for the FptA/Pch system (26). The solutions of metal ions (1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) were first preincubated at 5 mM in the presence of 20 equivalents of Pch in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) to allow Pch-metal complexes to form. PAD07 cells were prepared in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1 and incubated at 37°C in the presence or absence of the various preincubated Pch-metal complexes. The transport assays were then started by adding 100 nM Pch-<sup>55</sup>Fe to the cells. Pch-<sup>55</sup>Fe was prepared as described previously with a 10-fold isotopic dilution of iron and a 20-fold excess of Pch relative to <sup>55</sup>Fe (26). Transport assay mixtures were incubated for 45 min and then filtered, and the retained radioactivity was counted. For controls, the experiment was repeated by leaving out successively the metals; the metals and Pch (used to define 100% of <sup>55</sup>Fe transport [see Fig. 3]); and the metals, Pch, and cells.

**Incorporation of metals.** An overnight culture of CDC5(pPVR2), in iron-limited medium, was centrifuged. The supernatant containing Pch produced by CDC5(pPVR2) was filtered through a 0.22- $\mu$ m-pore-size nitrocellulose membrane and the final Pch concentration determined by OD<sub>310</sub> ( $\epsilon$  = 4,200 M<sup>-1</sup> liter<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). The Pch concentration was adjusted to 250  $\mu$ M, and this Pch solution was incubated overnight in the presence of 12.5  $\mu$ M of each metal in a final volume of 8 ml of succinate medium (solutions A).

An overnight culture of PAD07 or K2388, growth in iron-limited medium, was prepared at an OD<sub>600</sub> of 1 in succinate medium. Half of the bacterial suspension was incubated for 15 min at 4°C in the presence of 200  $\mu$ M CCCP (20 mM in ethanol). Pch-metal complexes (solutions A) were added to the bacterial cells to give a final concentration of metal of 5  $\mu$ M, with or without CCCP, in a final volume of 10 ml. The tubes were then incubated for 45 min at 37°C and 200 rpm and centrifuged. The supernatants were collected, filtered through a 0.45- $\mu$ m-pore-size membrane, and acidified to pH 1.0 with 20% HNO<sub>3</sub>. Bacterial pellets were washed once with ultrapure water and dried at 50°C for 48 h in glass tubes (prewashed with 20% HNO<sub>3</sub>). Cells were mineralized by treatment with 68% (vol/vol) HNO<sub>3</sub> for 24 h at room temperature. The volume was brought to 10 ml with ultrapure water, and samples were filtered on a 0.45- $\mu$ m-pore-size membrane if necessary and analyzed with an inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) apparatus (Jobin-Yvon, Ultima) at the following wavelengths (in nm): 328.068 for Ag<sup>+</sup>, 396.152 for Al<sup>3+</sup>, 214.438 for Cd<sup>2+</sup>, 238.892 for Co<sup>2+</sup>, 206.149 for Cr<sup>2+</sup>, 324.754 for Cu<sup>2+</sup>, 259.94 for Fe<sup>3+</sup>, 294.364 for Ga<sup>3+</sup>, 194.163 for Hg<sup>2+</sup>, 257.61 for Mn<sup>2+</sup>, 231.604 for Ni<sup>2+</sup>, 220.353 for Pb<sup>2+</sup>, 189.989 for Sn<sup>2+</sup>, and 213.856 for Zn<sup>2+</sup>. The concentrations of the metals were determined in succinate medium: 0.00  $\mu$ M for Ag<sup>+</sup>, 1.957  $\mu$ M for Al<sup>3+</sup>, 0.006  $\mu$ M for Cd<sup>2+</sup>, 0.008  $\mu$ M for Co<sup>2+</sup>, 0.049  $\mu$ M for Cr<sup>2+</sup>, 0.258  $\mu$ M for Cu<sup>2+</sup>, 0.292  $\mu$ M for Fe<sup>3+</sup>, 0.022  $\mu$ M for Ga<sup>3+</sup>, 0.056  $\mu$ M for Mn<sup>2+</sup>, 0.002  $\mu$ M for Ni<sup>2+</sup>, 0.023  $\mu$ M for Pb<sup>2+</sup>, 0.076  $\mu$ M for Sn<sup>2+</sup>, and 0.084  $\mu$ M for Zn<sup>2+</sup>.

**Ligand binding assays using <sup>55</sup>Fe.** For ligand binding assays using <sup>55</sup>Fe, Pch-metal complexes were prepared by incubating 10 mM Pch overnight in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) in the presence of metals at 1 mM, 5 mM, or 50 mM. The volumes were then adjusted with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The *in vivo* binding affinity constants ( $K_i$ ) of Pch-metal complexes to FptA were determined as follows. PAD07 cells were washed twice with an equal volume of fresh medium and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer at an OD<sub>600</sub> of 0.6. The cells were then incubated for 1 h at 0°C to avoid iron uptake (10) in a final volume of 500  $\mu$ l with 1 nM of Pch-<sup>55</sup>Fe (prepared as described above) and various concentrations of unlabeled metal-loaded Pch (0 to 100  $\mu$ M). The mixtures were centrifuged at 12,000 × *g* for 3 min, and the supernatants containing the unbound siderophore (labeled or not labeled) were removed. The radioactivity in the tubes containing the cell pellet was counted in scintillation cocktail. The  $K_i$  of the siderophores were calculated from the 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s), which were determined in competition experiments according to the equation of Cheng and Prusoff (9):  $K_i = IC_{50}/(1 + L/K_d)$ , where  $L$  is the concentration of radiolabeled ligand and  $K_d$  is its equilibrium dissociation constant determined experimentally. The  $K_d$  of Pch-Fe for FptA is 0.54 ± 0.19 nM, as determined previously (21).

As a control, the amount of trace metal was determined by ICP-AES in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and the results were as follows: 0.017  $\mu$ M for Ag<sup>+</sup>, 0.182  $\mu$ M for Al<sup>3+</sup>, 0.000  $\mu$ M for Cd<sup>2+</sup>, 0.024  $\mu$ M for Co<sup>2+</sup>, 0.028  $\mu$ M for Cr<sup>2+</sup>, 0.126  $\mu$ M for Cu<sup>2+</sup>, 0.104  $\mu$ M for Fe<sup>3+</sup>, 0.068  $\mu$ M for Ga<sup>3+</sup>, 0.012  $\mu$ M for Mn<sup>2+</sup>, 0.116  $\mu$ M for Ni<sup>2+</sup>, 0.018  $\mu$ M for Pb<sup>2+</sup> and 0.038  $\mu$ M for Zn<sup>2+</sup>; and for the stock solution of metal-free Pch at 100  $\mu$ M: 0.007  $\mu$ M for Ag<sup>+</sup>, 1.526  $\mu$ M for Al<sup>3+</sup>, 0.045  $\mu$ M for Cd<sup>2+</sup>, 0.106  $\mu$ M for Co<sup>2+</sup>, 0.136  $\mu$ M for Cr<sup>2+</sup>, 0.155  $\mu$ M for Cu<sup>2+</sup>,

0.140  $\mu\text{M}$  for  $\text{Fe}^{3+}$ , 0.370  $\mu\text{M}$  for  $\text{Ga}^{3+}$ , 0.114  $\mu\text{M}$  for  $\text{Mn}^{2+}$ , 0.003  $\mu\text{M}$  for  $\text{Ni}^{2+}$ , 0.074  $\mu\text{M}$  for  $\text{Pb}^{2+}$ , and 0.407  $\mu\text{M}$  for  $\text{Zn}^{2+}$ .

## RESULTS

**Ability of Pch to interact with metals other than  $\text{Fe}^{3+}$ .** Pch is a fluorescent siderophore with a maximum fluorescence emission at 430 nm in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer (excitation at 347 nm). When loaded with  $\text{Fe}^{3+}$ , this fluorescence is completely quenched (21). The presence of metals causes spectral variations of siderophores or synthetic chelators, and these variations are used to determine the kinetic and thermodynamic parameters of ligand-metal interactions (7, 17, 30, 31). We used these properties to investigate whether Pch is able to chelate other metals more or less efficiently than it does  $\text{Fe}^{3+}$ . Pch at neutral pH chelates  $\text{Fe}^{3+}$  with a 2:1 stoichiometry (Pch to Fe) (12, 42), so a twofold excess of Pch relative to the metal was used. Some metals interact with siderophores with slow kinetics; therefore, Pch was incubated overnight in the presence of each metal. None of the fluorescent spectral changes observed (Fig. 1A and B) were detected in control experiments in which each metal was incubated in the buffer in the absence of siderophore. The fluorescent spectral changes were seen only in the presence of both metal ion and siderophore, indicating that they were due to the formation of a complex between Pch and the metal tested. There was a 1.2-fold increase of fluorescence in the presence of  $\text{Al}^{3+}$  and a 4.0-fold increase in the presence of  $\text{Ga}^{3+}$  (Fig. 1B), with a shift in the maximum emission of fluorescence for Pch-Ga (maximum at 442 nm). In the presence of  $\text{Sn}^{2+}$ , Pch fluorescence was quenched by 20%. For all the other metals ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ , and  $\text{Zn}^{2+}$ ), between 75 and 95% of the fluorescence was quenched (Fig. 1A). The residual fluorescence probably corresponds to residual free Pch. In conclusion, Pch was apparently able to chelate all the metal ions tested.

**Ability of the Pch-metal complexes to inhibit Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake.** Pch-Fe is transported across the *P. aeruginosa* outer membrane by the transporter FptA. This is the only route by which this ferric-siderophore complex can enter these bacteria (FptA mutants are unable to transport Pch-Fe [26]). To determine if FptA at the cell surface can bind Pch in complex with metals other than  $\text{Fe}^{3+}$ , we tested the ability of Pch-metal complexes to inhibit Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake. This indicates whether the binding site of FptA binds the Pch-metal but does not reveal whether there is Pch-metal uptake by the transporter. As a reference, Pvd- and Pch-deficient cells (PAD07) were incubated in the presence of 100 nM Pch- $^{55}\text{Fe}$  for 45 min to evaluate the amount of  $^{55}\text{Fe}$  transported in the absence of any competition (Fig. 2). During this period, the cell concentration was stable; no growth of *P. aeruginosa* occurred when 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer was used. The experiment was repeated using 200- and a 2,000-fold excesses of metal-free Pch relative to Pch- $^{55}\text{Fe}$ , and no  $^{55}\text{Fe}$  uptake inhibition was observed. Finally, the experiment was repeated in the presence of each Pch-metal complex in 10- and 100-fold excesses relative to the concentration of Pch- $^{55}\text{Fe}$ . For each metal, the complex was prepared by incubating the metal overnight in the presence of a 20-fold excess of Pch.

All metals in complex with Pch inhibited Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake

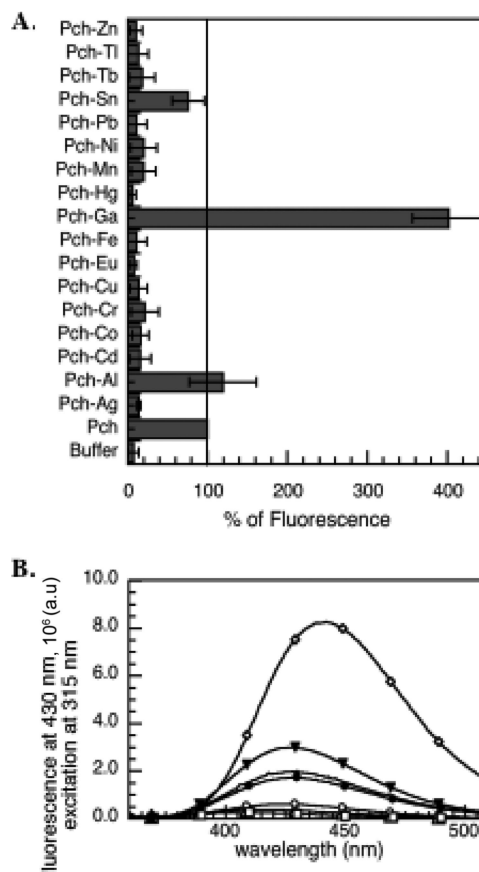


FIG. 1. (A) Variation of Pch fluorescence in the presence of various metal ions. The fluorescence at 430 nm (excitation wavelength, 347 nm) of metal-free Pch was taken as the reference (100%). Error bars indicate standard deviations. (B) Fluorescence spectra of Pch incubated in the presence of  $\text{Ag}^+$  ( $\Delta$ ),  $\text{Al}^{3+}$  ( $\nabla$ ),  $\text{Ga}^{3+}$  ( $\diamond$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\circ$ ),  $\text{Hg}^{2+}$  ( $\blacksquare$ ), and  $\text{Sn}^{2+}$  ( $\bullet$ ). The fluorescence spectrum of metal-free Pch is shown as a black line. For both panels, 25  $\mu\text{M}$  Pch was incubated overnight with 12.5  $\mu\text{M}$  metals in 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), and the fluorescence was then monitored (excitation wavelength, 347 nm). a.u., arbitrary units.

(Fig. 2). The inhibition rates for Pch-Ga (62% and 75% for, respectively, 10 and 100 equivalents of Pch-Ga) were the closest to those observed for nonradioactive Pch-Fe (78% and 94% for 10 and 100 equivalents of Pch-Fe, respectively). Pch-Al and Pch-Co had inhibition rates of between 44% and 62%. For all the other metals tested, the inhibition rate was around 30%. We checked that these observed Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake inhibitions were not due to cell death resulting from metal toxicity; the viable cell counts were evaluated by plating on agar after incubation (45 min) in the presence of Pch-Fe and Pch-metal complexes. None of the 16 metals tested was toxic under the experimental conditions used here (data not shown); the uptake inhibition values observed (Fig. 2) were clearly not due to cell death. In conclusion, Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake was strongly inhibited by Pch-Al, Pch-Co, and Pch-Ga and was inhibited, albeit less strongly, by Pch in complex with all the other metals. Pch-Al, Pch-Co, and Pch-Ga must have affinities for FptA in the same range as that of Pch-Fe, and all the other Pch-metal complexes must have significantly lower affinities.



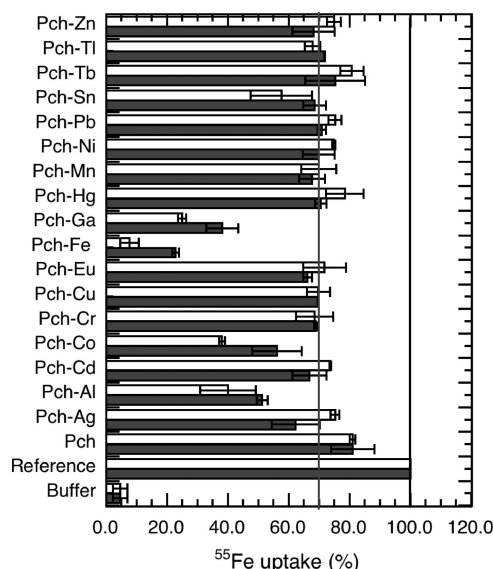


FIG. 2. Ability of Pch-metal complexes to inhibit Pch-<sup>55</sup>Fe uptake. Pvd- and Pch-deficient PAD07 cells at an OD<sub>600</sub> of 1 were incubated for 45 min in the presence of 100 nM Pch-<sup>55</sup>Fe at 37°C. The mixtures were then filtered and radioactivity counted. The amount of <sup>55</sup>Fe transported in this experiment was used as a reference (defined as 100% uptake). This experiment was repeated in the absence of cells (bars labeled "Buffer"). The experiment was also repeated in the presence of cells and an excess of metal-free Pch and in the presence of cells and of each Pch-metal complex (black and white bars correspond to 1 and 10 μM metal, respectively). Pch-metal complexes were prepared by preincubating each metal in the presence of a 20-fold excess of Pch overnight. As a control, for each metal tested, the experiment was repeated in the absence of cells (data not shown). All the data are means and standard deviations from three independent experiments. The black line indicates the 100% of Pch-<sup>55</sup>Fe uptake, and the gray line shows that most of the Pch-metal complexes inhibited 28% of the Pch-<sup>55</sup>Fe uptake.

**Affinities of Pch-metal complexes for FptA.** FptA seems to be able to bind Pch-Al, Pch-Co, and Pch-Ga and probably also Pch in complex with all the other ion metals tested (Fig. 2). We used competition experiments to evaluate the affinities of the Pch-metal complexes for FptA (Fig. 3, Table 2). As described previously, when Pvd- and Pch-deficient PAD07 cells were incubated in the presence of Pch-<sup>55</sup>Fe, a radioactive signal corresponding to the specific binding of Pch-<sup>55</sup>Fe to FptA was observed (21, 26). This signal was absent in a strain lacking FptA, such as PAO6428 (Table 1). In the present work, Pvd- and Pch-deficient cells (PAD07) were incubated at 0°C, to avoid uptake, in the presence of 1 nM Pch-<sup>55</sup>Fe and a series of concentrations of metal-free Pch or Pch-metal prepared at ratios (Pch to metal) of 2:1, 1:2, and 1:10. After incubation, the cells were pelleted and the radioactivity counted. We are aware that this experiment has limitations since it involves four equilibria: (i) formation of Pch-<sup>55</sup>Fe, (ii) formation of the Pch-metal complexes, and (iii and iv) formation of either FptA-Pch-<sup>55</sup>Fe or FptA-Pch-metal complexes at the cell surface. Therefore, the goal here was not to determine accurate affinity constants of the Pch-metal complexes for FptA but to compare the stabilities of the different FptA-Pch-metal complexes with the stability of FptA-Pch-Fe. Both Pch-<sup>55</sup>Fe and the Pch-metal complexes were prepared by preincubating the siderophore

with the metals before addition to the bacteria. To check if the Pch-<sup>55</sup>Fe concentration stayed constant even in the presence of high ion metal concentrations, the competition experiment was carried out first in the presence of PAD07 cells, 1 nM Pch-<sup>55</sup>Fe, and increasing concentrations of siderophore-free ion metals. Cell-bound radioactivity did not decrease with concentration of siderophore-free ion metals lower than 10 μM (data not shown), indicating that all the metals at the concentrations used in the experiment described in Fig. 3 and Table 2 did not compete so as to dissociate Pch-<sup>55</sup>Fe. The Pch-<sup>55</sup>Fe concentration stayed stable under our experimental conditions. The formation of Pch-metal complexes was followed using the fluorescent properties of Pch. As shown in Fig. 1A, when a Pch/metal ratio of 2:1 was used, most but not all of the Pch was in complex with an ion metal. When the 1:2 and 1:10 ratios were used, all Pch was saturated with metals (data not shown). By working with an increasing concentration of metals in relation to siderophore, we assist the formation of Pch-metal, and we should have with the ratio of 2:1 a mixture of Pch and Pch-metal and with the ratio of 1:10 mostly Pch-metal and no more metal-free Pch. However, we know nothing about the stoichiometry of the Pch-metal complexes formed; when the concentration of siderophore was higher in relation to metals, the ion metals were probably chelated by more than one Pch, and when the metal/siderophore ratio was reversed, ion metals were probably chelated with just one siderophore as described previously for Fe<sup>3+</sup> (42).

When Pvd- and Pch-deficient PAD07 cells were incubated in the presence of Pch-<sup>55</sup>Fe and increasing concentrations of metal-free Pch, cell-bound radioactivity decreased, indicating competition between Pch and Pch-<sup>55</sup>Fe for binding to FptA at the cell surface (Fig. 3). The *K<sub>i</sub>* of metal-free Pch was 12.8 ± 2 nM. ICP-AES measurements indicated that the Pch was metal free (see Materials and Methods). ICP-AES is a suitable spectrometric technique to determine trace amounts of elements. It is based on measurement of light emission from excited atoms and ions, in argon plasma, and each element has a specific emission wavelength that can be used to determine its concentration. Concerning the metal loading status of Pch, we cannot exclude the possibility that this Pch preparation may have been contaminated by trace elements from the buffer or the cell suspension, and were this case, the Pch would not be 100% metal free. However, the same buffer and cells were used for all the metals tested, so the concentration of any such trace elements would be the same for all the *K<sub>i</sub>* values determined in Table 2. This displacement of Pch-<sup>55</sup>Fe by metal-free Pch on FptA was used as a reference for all the Pch-metal complexes tested in this experiment.

Cell-bound radioactivity also decreased with increasing concentrations of Pch-metal (Fig. 3), except for Hg<sup>2+</sup> (Pch/metal ratios of 2:1, 1:2, and 1:10) (Fig. 3F and Table 2), Ni<sup>2+</sup> (1:2 and 1:10) (Fig. 3G and Table 2), and Zn<sup>2+</sup> (1:2 and 1:10) (Fig. 3H and Table 2). FptA is not able to bind Pch-Hg and has difficulty binding to Pch-Ni and Pch-Zn. The *K<sub>i</sub>* of Pch preincubated with Fe<sup>3+</sup> was, as for metal-free Pch, in the range of 10 to 13.6 nM depending on the Pch/metal ratio tested (Fig. 3A and Table 2). Surprisingly, Pch-Pb had a *K<sub>i</sub>* for FptA that was similar to that of Pch-Fe. Pch in complex with Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, and Tl<sup>+</sup> had *K<sub>i</sub>* in the range of 6.9 nM (Pch/metal ratio of 2:1) to 117.3 nM

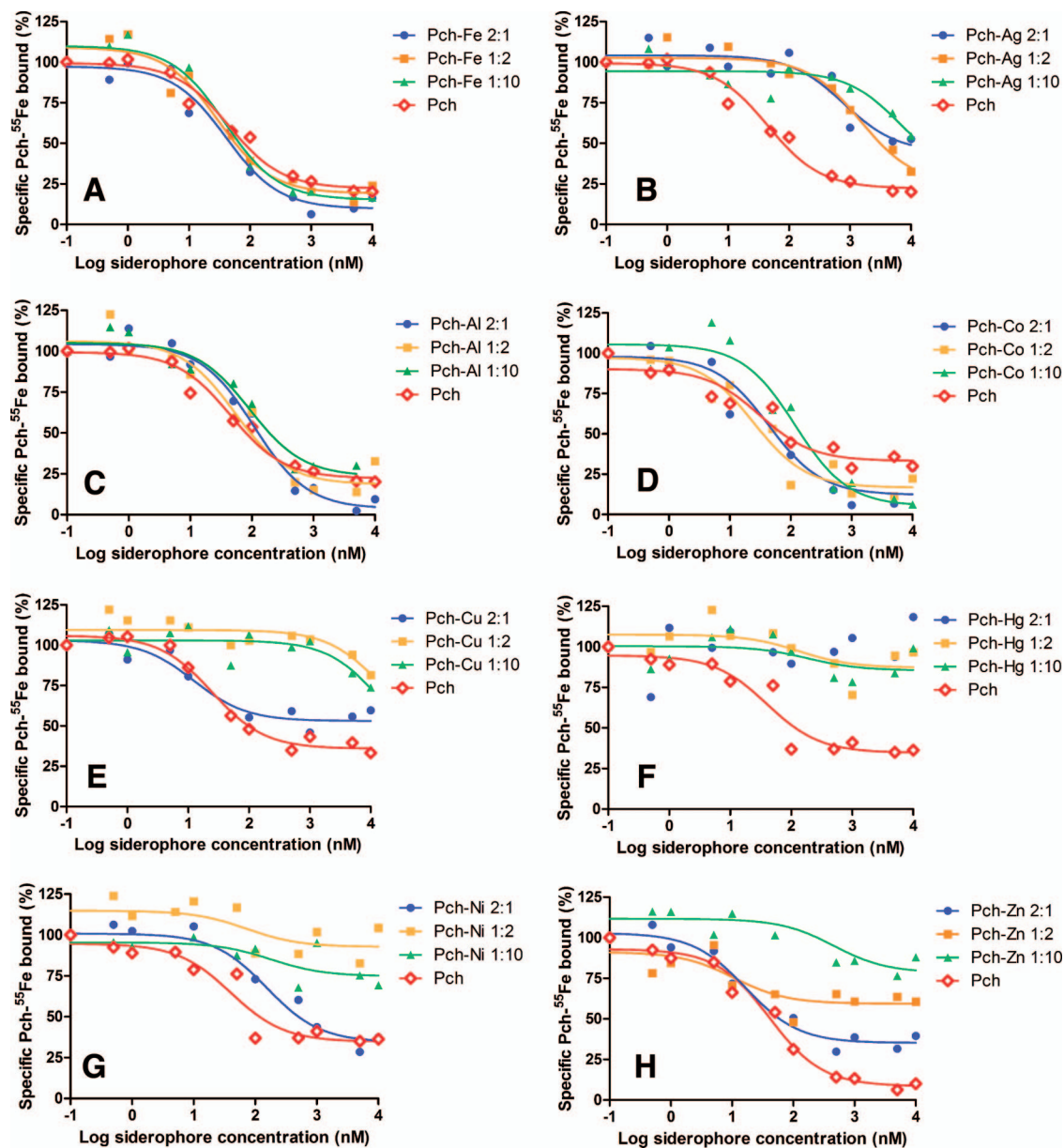


FIG. 3. Competition by unlabeled Pch-metal for the binding of Pch-<sup>55</sup>Fe to FptA in vivo. Experiments were carried out as described in Materials and Methods with 1 nM Pch-<sup>55</sup>Fe, Pch- and Pvd-deficient PAD07 cells at an OD<sub>600</sub> of 0.6, incubation at 0°C, and various concentrations of metal-free Pch or of Pch-metal at Pch/metal ratios of 1:2, 2:1, and 1:10. The values reported are representative of two experiments, which gave similar results. These data were used to calculate the *K<sub>i</sub>* values presented in Table 2.

(Pch/metal ratio of 1:10). According to Fig. 1A, under our experimental conditions, there was formation of Pch-metal complexes with all these metals. Therefore, the displacements observed were not due to the presence of metal-free Pch competing with Pch-<sup>55</sup>Fe for FptA but were due to a competition between Pch-metal complexes and Pch-<sup>55</sup>Fe for the transporter. We may conclude that Pch-Al, Pch-Cd, Pch-Co, Pch-Cr, Pch-Eu, Pch-Ga, Pch-Mn, Pch-Pb, Pch-Sn, Pch-Tb, and Pch-Tl complexes are apparently able to bind to FptA with affinities close to that of metal-free Pch and Pch-Fe. For Pch-Ag and Pch-Cu, the displacement curves were shifted to higher concentrations of Pch-metal (Fig. 3B and E; Table 2),

and this was so for all three Pch/metal ratios used. *K<sub>i</sub>* in the ranges of 266.1 to 2,198.3 nM and 4.1 to 4,834.3 nM were determined for Pch-Ag and Pch-Cu, respectively. These decreases of the affinities when the concentrations of ion metals increase in relation to siderophore may reflect a difference in the affinities of FptA for Pch-metal in different stoichiometric forms. As mentioned above, when the concentration of siderophore was higher in relation to metals, the ion metals were probably chelated by more than one Pch, and when the metal/siderophore ratio was reversed, ion metals perhaps were chelated with just one siderophore as described previously for Fe<sup>3+</sup> (42). In the cases of Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, but also in the cases

TABLE 2. Inhibition constants<sup>a</sup>

Metal	$K_i$ (nM)							
	Metal-free Pch		Pch-metal complex with a Pch/metal ratio of:					
	Mean	95% Confidence interval	2:1		1:2		1:10	
Mean			95% Confidence interval	Mean	95% Confidence interval	Mean	95% Confidence interval	
Ag <sup>+</sup>	15.0	8.6–26.1	266.1	64.5–1,097.0	495.0	186.3–1,315.0	2,198.3	48.6–9.9 × 10 <sup>4</sup>
Al <sup>3+</sup>	15.0	8.6–26.1	36.1	20.8–62.7	17.7	6.4–48.7	30.9	12.6–76.2
Cd <sup>2+</sup>	10.2	3.3–3.17	6.9	1.8–26.2	27.3	5.4–137.5	26.3	7.7–89.4
Co <sup>2+</sup>	10.2	3.3–3.17	14.6	4.7–45.6	8.2	3.0–22.0	39.3	16.0–96.7
Cr <sup>2+</sup>	8.2	4.8–14.0	8.0	1.1–59.3	31.0	13.6–70.7	117.3	21.4–641.7
Cu <sup>2+</sup>	8.2	4.8–14.0	4.1	1.3–13.1	4,568.7	5.2–4.0 × 10 <sup>6</sup>	4,834.3	7.2–3.3 × 10 <sup>6</sup>
Eu <sup>3+</sup>	13.4	4.3–41.5	16.3	6.2–43.0	35.1	6.5–190.6	42.6	6.3–286.6
Fe <sup>3+</sup>	15.0	8.6–26.1	13.6	6.9–26.9	10.0	4.5–22.5	13.0	7.6–22.4
Ga <sup>3+</sup>	13.4	4.3–41.5	32.4	16.4–63.9	33.2	11.9–92.3	11.6	2.9–47.3
Hg <sup>2+</sup>	13.4	4.3–41.5	NB <sup>b</sup>		NB		NB	
Mn <sup>2+</sup>	13.4	4.3–41.5	51.1	9.9–264.3	12.9	6.8–24.7	42.2	14.5–123.0
Ni <sup>2+</sup>	13.4	4.3–41.5	51.4	19.3–136.5	NB		NB	
Pb <sup>2+</sup>	13.6	7.9–23.3	5.4	2.1–13.9	12.4	1.6–94.6	11.6	4.1–15.8
Sn <sup>2+</sup>	13.6	7.9–23.3	8.5	4.6–15.8	35.7	7.6–167.3	29.6	8.1–108.1
Tb <sup>3+</sup>	13.6	7.9–23.3	16.0	4.9–52.9	27.4	12.2–61.5	73.5	11.6–464.7
Tl <sup>+</sup>	13.6	7.9–23.3	8.8	5.1–15.0	28.5	8.4–97.4	31.9	13.4–76.0
Zn <sup>2+</sup>	13.6	7.9–23.3	5.6	2.7–11.6	NB		NB	

<sup>a</sup>  $K_i$  values were determined from competition experiments against Pch-<sup>55</sup>Fe. PAD07 cells at an OD<sub>600</sub> of 0.6 were incubated with 1 nM Pch-<sup>55</sup>Fe and various concentrations of metal-free Pch, of siderophore-free metal ions, or of Pch-metal complexes at Pch/metal ratios: 1:2, 2:1, and 1:10. The experiments were carried out at 0°C to avoid iron uptake. The values are representative of two experiments, which gave similar results.

<sup>b</sup> NB, no binding.

of Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, we may have a good recognition of the metal when chelated by two Pchs, a bad recognition for Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, and no recognition for Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, when the metal was chelated by just one siderophore. Indeed, 2:1 and 1:1 Pch-metal complexes will be different in size and in the conformation of the siderophore, and therefore recognition by the FptA transporter must be affected. The data presented here do not allow us to answer this question. Further studies of the Pch chelation properties will be necessary.

In conclusion, the displacement experiments summarized in Table 2 and Fig. 3 showed that FptA is able to bind Pch in complex with all the metals tested except Hg<sup>2+</sup> and perhaps Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. The  $K_i$  determined were very close to the one found for Pch-Fe, except for Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup>, where an important decrease was observed.

**Metal transported into *P. aeruginosa* cells in the presence of Pch.** Thus, Pch can chelate metals other than Fe<sup>3+</sup>, and these siderophore-metal complexes can bind to FptA at the cell surface. It has been suggested that Pch may transport metals other than Fe<sup>3+</sup> into *P. aeruginosa* cells (15, 43). We therefore investigated which of the ion metals that Pch can chelate are transported by the Pch/FptA uptake pathway. To avoid confusion due to metal uptake by the Pvd pathway, the Pch- and Pvd-deficient strain PAD07 was used for this experiment. This experiment required large amounts of Pch, so not all the metals were tested. Bacteria were incubated in the presence of each Pch-metal complex tested. After incubation, the cells were harvested and the amount of metal inside the bacteria and/or bound at the cell surface was determined by ICP-AES. To discriminate between metal transported in an energy-dependent manner and metal diffusing through porins, the experiment was repeated in the presence of the protonophore CCCP. CCCP inhibits the proton motive force of the inner membrane

and therefore abolishes energy-dependent uptake by bacteria (1, 10, 36). In the presence of CCCP, FptA is still able to bind Pch-Fe but is unable to transport it into the periplasm of *P. aeruginosa* (10, 36).

The uptake observed in the presence of CCCP (Fig. 4A) corresponds to diffusion of the siderophore-free metals across the outer membrane via porins or bound at the cell surfaces. The uptake observed in the absence of CCCP corresponds to the sum of diffusion of free metals through porins, metal bound at the cell surfaces, and energy-dependent uptake of siderophore-metal complexes. A difference between values in the presence and absence of CCCP was observed only for Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and Ga<sup>3+</sup>. Therefore, only these metals, when chelated by Pch, could be transported by a proton motive force-dependent process. However, the uptakes of Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and Ga<sup>3+</sup> were very much lower than that of Fe<sup>3+</sup>: 23-fold lower for Ni<sup>2+</sup>, 26-fold lower for Co<sup>2+</sup>, and 35-fold lower for Ga<sup>3+</sup>. The 0.43 μmol of Fe<sup>3+</sup>/g of cells found in the presence of CCCP probably corresponds to iron already present inside the cells before the beginning of the experiment (imported during the previous growth of the cells). To investigate the involvement of FptA in this energy-dependent uptake of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Ga<sup>3+</sup>, the experiment was repeated in parallel with PAD07 and an FptA mutant, K2388 (Fig. 4B). The same differences between the values in the presence and absence of CCCP for PAD07 and between those for K2388 and PAD07 in the absence of CCCP were observed, confirming that these three metals were transported by the Pch/FptA pathway.

Concerning Pch-Ni, the competition experiments (Fig. 3G) showed a  $K_i$  of 51 nM when the complex was prepared, like in the uptake assay (Fig. 4), by mixing 2 equivalents of Pch with 1 equivalent of Ni<sup>2+</sup> and no binding when 2 or 10 equivalents of Ni<sup>2+</sup> were incubated with 1 of Pch. These data may appear

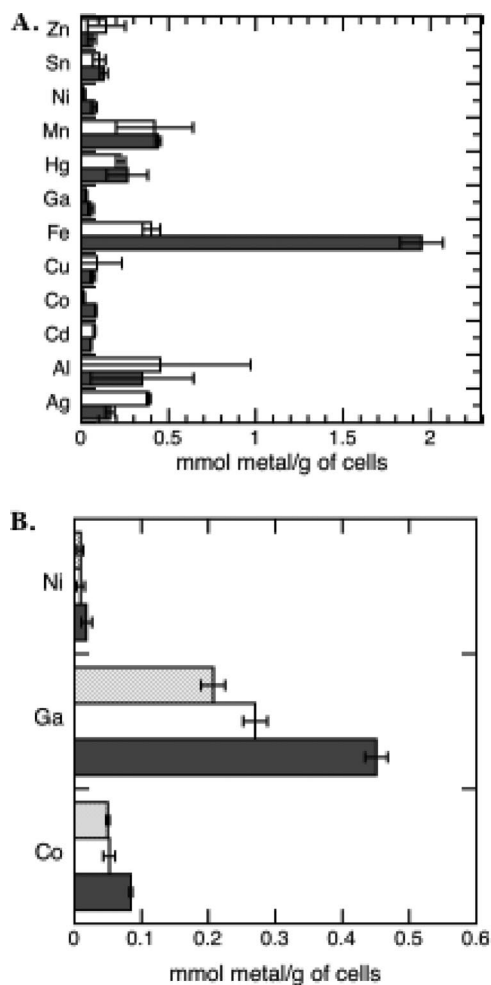


FIG. 4. Proton motive force-dependent metal incorporated into *P. aeruginosa* cells by the Pch uptake pathway. (A) Pvd- and Pch-deficient PAD07 cells at an  $OD_{600}$  of 1 were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  with  $5\ \mu\text{M}$  of each Pch-metal complex in the presence (white bars) or absence (black bars) of  $200\ \mu\text{M}$  CCCP. After 45 min of incubation, the cells were harvested and washed and the metal content determined by ICP-AES. Pch-metal complexes were prepared by incubating each metal in the presence of a 20-fold excess of Pch overnight. The data are means and standard deviations from three independent experiments. (B) The experiment was repeated in parallel with PAD07 cells in the presence (white bars) or absence (black bars) of CCCP and with K2388 cells ( $\Delta fptA$  and Pvd<sup>-</sup>) (grey bars) for  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ .

to be in contradiction with the observed energy-dependent uptake of  $\text{Ni}^{2+}$ . The only explanation is that when two Pchs chelate  $\text{Ni}^{2+}$ , the complex is able to bind to FptA and to be transported. However,  $\text{Ni}^{2+}$  in complex only with one Pch is unable to be recognized by FptA.

**Toxicity of the metals for *P. aeruginosa* and role of the Pch pathway in the toxicity.** We tested for any correlation between the toxicity of a metal and its apparent ability to be transported into *P. aeruginosa* by the Pch pathway. CDC5(pPVR2) (a strain unable to produce Pvd) and PAD07 (a strain unable to produce both Pvd and Pch) were grown in the presence of  $100\ \mu\text{M}$  of each metal (Fig. 5) in an iron-free medium. Since the formation of the Pch-metal complexes is an important step in the process of uptake of a metal by the Pch pathway, we incubated

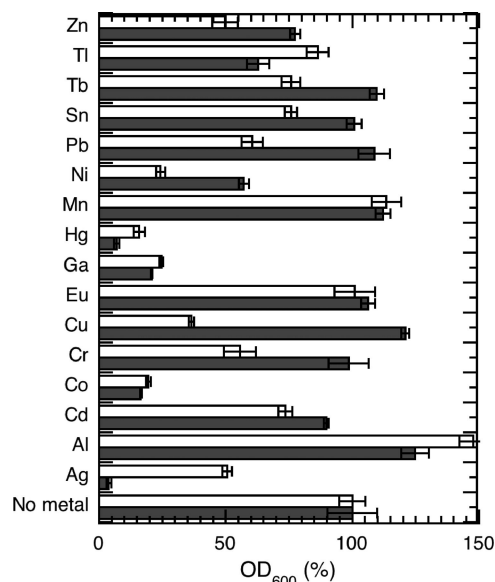


FIG. 5. Role of the Pch pathway in *P. aeruginosa* metal toxicity. *P. aeruginosa* CDC5(pPVR2) (a strain unable to produce Pvd) (black bars) and PAD07 (a strain unable to produce both Pvd and Pch) (white bars) were grown overnight in the presence or absence of each metal ion ( $100\ \mu\text{M}$ ). After 20 h of culture, the  $OD_{600}$  was determined. The culture in the absence of metal was used as the reference (100%). The data are means and standard deviations from triplicate experiments.

the cells just in the presence of the metals and not in the presence of the preformed Pch-metal complexes.  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ , and  $\text{Ga}^{3+}$  were the most toxic for CDC5(pPVR2), and  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{2+}$  inhibited growth but to a lesser extent. For the metals that can be transported by the Pch uptake pathway ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , and  $\text{Co}^{2+}$  in Fig. 4), the observed toxicity was not modulated by the presence or the absence of Pch. The toxicity of these metals must be due to diffusion of siderophore-free metals through porins. Surprisingly, CDC5(pPVR2), the strain able to produce Pch, was more sensitive to  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^{+}$ , and  $\text{Hg}^{2+}$  than PAD07. This indicates that these four metals may be toxic because of an incorporation into the bacteria by the Pch pathway. Since no uptake of these metals was detected by ICP-AES (Fig. 4), the uptake rates must be low and could not be measured by our approach. Clearly further investigation is necessary to confirm this hypothesis. Finally, strain PAD07 was apparently more sensitive than CDC5(pPVR2) to  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ , and  $\text{Tb}^{3+}$ . The absence of Pch in the extracellular medium thus appeared to increase the sensitivity to these metal ions. This may be an indirect consequence; Pch chelating the metal in the extracellular medium may decrease its diffusion through the porins.

## DISCUSSION

Pch has an affinity for  $\text{Fe}^{3+}$  of  $2 \times 10^5\ \text{M}^{-1}$  (determined in ethanol) (14) and ligation sites other than oxygen, and these features led to suggestions that it may be able to transport ions of metals other than iron into *P. aeruginosa*. The ability of Pch to chelate  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  in addition to  $\text{Fe}^{3+}$  was also shown previously (43) and strengthened this idea. We



confirmed that Pch can chelate these four metals, and in addition, we show that it also chelates  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  (Fig. 1). However, the conformations, sizes, and stabilities of the resulting Pch-metal complexes must be diverse and depend on the atomic weight and the coordination of the 16 metals tested. Similar work with Pvd has shown that this chromopeptide siderophore is also able to chelate all the metals tested (6).

FptA at the cell surface binds Pch in a complex with any of the ion metals we tested except  $\text{Hg}^{2+}$ . Most of the metals ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^+$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , and  $\text{Tl}^+$ ) have an affinity very close to the one determined for Pch-Fe and metal-free Pch (Table 2). Only  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$  had lower affinities. In the cases of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , a binding with a  $K_i$  equivalent to that of Pch-Fe was observed only when the complexes were prepared by mixing two equivalents of Pch with one of metal. No correlation was observed between all the  $K_i$  determined (Table 2) and the abilities of the different Pch-metal complexes to inhibit the Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake (Fig. 2). Pch-Ga, Pch-Al, Pch-Co, and Pch-Cr were the most efficient in inhibiting Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake. All the others had uptake inhibition values of around 25 or 30%. This lack of metal specificity of the FptA binding site was surprising because outer membrane siderophore transporters are characterized by very high siderophore selectivity. Concerning the siderophore selectivity of FptA, we have shown previously that Pch chelates  $\text{Fe}^{3+}$  with a stoichiometry of 2:1 (Pch to  $\text{Fe}^{3+}$ ) and that it also complexes with iron in conjunction with another bidentate ligand such as cepabactin or ethylene glycol (26, 42). Determination of the structure of FptA loaded with Pch-Fe and docking experiments showed that it is only the Pch molecule part of these complexes that binds to the transporter (11, 26). The second dentate can be a molecule completely different from Pch and not have a large effect on the interaction with FptA. Moreover, in vivo binding assays and docking experiments using the X-ray structure of FptA showed that the binding properties and the iron uptake abilities were affected by removal of the C4' and C2' chiral centers of Pch; the molecule still bound to FptA but was unable to transport iron (26). The overall binding mode of this iron-complexed analogue was inverted, demonstrating how siderophore selective FptA is. The high siderophore specificity of FptA does not appear to be consistent with the low metal specificity. The explanation perhaps is in the structure of FptA-Pch-Fe (12). Indeed, none of the residues of the siderophore binding sites interact with the metal. The transporter interacts only with the Pch, which forms a sort of shell around the metal. Apparently only the exterior of this shell, and not the metal sheltered within, is important for binding with the outer membrane transporter.

ICP-AES experiments (Fig. 4) showed that only  $\text{Fe}^{3+}$  is transported efficiently by the Pch/FptA system;  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  were also transported, but with much lower efficiencies (26-fold, 35-fold, and 23-fold lower, respectively). Two of the ion metals transported by this pathway are those which, in complex with Pch, were able to efficiently inhibit Pch- $^{55}\text{Fe}$  uptake. However, the sensitivity of ICP-AES is limited, and we cannot exclude the possibility that other ion metals able to bind to FptA at the cell surface when chelated by the siderophore were also imported by an energy-dependent process but with uptake rates too low to be detected. Previously, Visca et al.

have shown that  $\text{Co}^{2+}$  at 10  $\mu\text{M}$ , like  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Mo(VI)}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  at 100  $\mu\text{M}$ , repressed Pch synthesis and reduced expression of FptA (43). These observations are consistent with the uptake of Pch-Ni and Pch-Co that we observed (Fig. 4) and suggest that  $\text{Mo(VI)}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  are transported as well into the bacteria by the Pch pathway. A regulation of the biosynthesis of Pch and expression of FptA by the metals involves the fact that they are able to enter the cytoplasm and interact with PchR.

These various findings show that the metal specificity of the binding step at the level of FptA is broader than the metal specificity of the uptake process for the Pch/FptA pathway. Similar data were obtained with the Pvd uptake pathway in *P. aeruginosa*: there was a large metal specificity for the binding stage for FpvA, but only  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  were transported and with uptake rates between 7- and 42-fold lower than that of  $\text{Fe}^{3+}$  (6). This may be a common property of all siderophore outer membrane transporters. They can be "polluted" at the cell surface by binding of their siderophore in complex with metals other than  $\text{Fe}^{3+}$  because the recognition involves the siderophore itself and not the chelated metal. Nevertheless, an unknown mechanism allows the transporter to import only siderophore loaded with  $\text{Fe}^{3+}$  into the periplasm. The other siderophore-metal complexes are translocated through the channel formed in the protein during the uptake process with a substantially lower efficiency or not at all. The reasons for this rigorous metal selectivity will probably remain unclear until we know the mechanisms both of channel formation in outer membrane siderophore transporters and of translocation of ferric-siderophore across these channels. During this uptake process, the nature of the metal chelated by the siderophore is clearly important; it is unknown whether this is due to its size, its coordination, or its interaction with the transporter during the translocation process.

In conclusion, our findings reported here clearly show that the FptA/Pch system is not involved in the uptake of large amounts of metals other than  $\text{Fe}^{3+}$ . The system is highly specific for iron but is also able to transport  $\text{Ga}^{3+}$ , a metal very similar in size and coordination to  $\text{Fe}^{3+}$ , and three other biologically relevant metals that can be used as cofactors by enzymes of the bacteria [ $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  (43; this study) and  $\text{Mo(VI)}$  (43)]. Further investigation will be necessary to find out the fate of these Pch-metal complexes transported into the bacteria; the biologically relevant metals may be released from the siderophore and used as cofactors by enzymes, or the undesirable siderophore-metal complexes may be excreted again in the extracellular medium by efflux pumps.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by the Centre National de la Recherche Scientifique and by a grant from the ANR (Agence Nationale de Recherche, ANR-05-JCJC-0181-01).

We thank Cornelia Reimann for strains PAO6297 and PAO6428.

#### REFERENCES

- Adams, H., G. Zeder-Lutz, J. Greenwald, I. J. Schalk, H. Célia, and F. Pattus. 2006. Interaction of TonB with outer membrane receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:5752–5761.
- Albrecht-Gary, A. M., S. Blanc, N. Rochel, A. Z. Ocaktan, and M. A. Abdallah. 1994. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdinin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **33**:6391–6402.



3. Ankenbauer, R., L. F. Hanne, and C. D. Cox. 1986. Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdinin production. *J. Bacteriol.* **167**:7–11.
4. Bayse, C., D. De Vos, Y. Naudet, A. Vandermonde, U. Ochsner, J. M. Meyer, H. Budzikiewicz, M. Schafer, R. Fuchs, and P. Cornelis. 2000. Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**:2425–2434.
5. Boukhalfa, H., and A. L. Crumbliss. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**:325–339.
6. Braud, A., F. Hoegy, K. Jezequel, T. Lebeau, and I. J. Schalk. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.*, in press.
7. Carrano, C. J., H. Drechsel, D. Kaiser, G. Jung, B. Matzanke, G. Winkelmann, N. Rochel, and A. M. Albrecht-Gary. 1996. Coordination chemistry of the carboxylate type siderophore rhizoferrin: the iron(III) complex and its metal analogs. *Inorg. Chem.* **35**:6429–6436.
8. Chen, Y., E. Jurkewitch, E. Bar-Ness, and Y. Hadar. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **58**:390–396.
9. Cheng, Y. C., and W. H. Prusoff. 1973. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**:3099–3108.
10. Clément, E., P. J. Mesini, F. Pattus, M. A. Abdallah, and I. J. Schalk. 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.
11. Cobessi, D., H. Celia, and F. Pattus. 2005. Crystal structure at high resolution of ferric-pyochelin and its membrane receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **352**:893–904.
12. Cobessi, D., H. Celia, and F. Pattus. 2004. Crystallization and X-ray diffraction analyses of the outer membrane pyochelin receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. D* **60**:1919–1921.
13. Cox, C. D., and R. Graham. 1979. Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **137**:357–364.
14. Cox, C. D., K. L. Rinehart, Jr., M. L. Moore, and J. C. Cook, Jr. 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4256–4260.
15. Cuppels, D. A., A. Stipanovic, A. Stoessi, and J. B. Sothers. 1987. The constitution and properties of a pyochelin-zinc complex. *Can. J. Microbiol.* **65**:2126–2130.
16. Demange, P., S. Wendenbaum, C. Linget, C. Mertz, M. T. Cung, A. Dell, and M. A. Abdallah. 1990. Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals* **3**:155–170.
17. Dhungana, S., C. Ratledge, and A. L. Crumbliss. 2004. Iron chelation properties of an extracellular siderophore exochelin MS. *Inorg. Chem.* **43**:6274–6283.
18. Durbin, P. W., N. Jeung, S. J. Rodgers, P. N. Turowski, F. L. Weitl, D. L. White, and K. N. Raymond. 1989. Removal of <sup>238</sup>Pu(IV) from mice by poly-catecholate, -hydroxamate or -hydroxypyridonate ligands. *Radiat. Prot. Dosim.* **26**:351–358.
19. Evers, A., R. Hancock, A. Martell, and R. Motekaitis. 1989. Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III) and other highly charged metal ions. *Inorg. Chem.* **28**:2189–2195.
20. Greenwald, J., F. Hoegy, M. Nader, L. Journet, G. L. A. Mislin, P. L. Graumann, and I. J. Schalk. 2007. Real-time FRET visualization of ferric-pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J. Biol. Chem.* **282**:2987–2995.
21. Hoegy, F., H. Celia, G. L. Mislin, M. Vincent, J. Gallay, and I. J. Schalk. 2005. Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**:20222–20230.
22. Klumpp, C., A. Burger, G. L. Mislin, and M. A. Abdallah. 2005. From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:1721–1724.
23. Leoni, L., A. Ciervo, N. Orsi, and P. Visca. 1996. Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: effect of Fur and PvdS on promoter activity. *J. Bacteriol.* **178**:2299–2313.
24. Michel, L., A. Bachelard, and C. Reimmann. 2007. Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**:1508–1518.
25. Michel, L., N. Gonzalez, S. Jagdeep, T. Nguyen-Ngoc, and C. Reimmann. 2005. PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol. Microbiol.* **58**:495–509.
26. Mislin, G. L. A., F. Hoegy, D. Cobessi, K. Poole, D. Rognan, and I. J. Schalk. 2006. Binding properties of pyochelin and structurally related molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **357**:1437–1448.
27. Namirani, S., D. J. Richardson, D. A. Russell, and J. R. Sodeau. 1997. Excited state properties of the siderophore pyochelin and its complex with zinc ions. *Photochem. Photobiol.* **65**:777–782.
28. Neu, M. P., J. H. Matonic, C. E. Ruggiero, and B. L. Scott. 2000. Structural characterization of a plutonium(IV) siderophore complex: single-crystal structure of Pu-desferrioxamine E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**:1442–1444.
29. Ochsner, U. A., and M. L. Vasil. 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4409–4414.
30. Palanche, T., S. Blanc, C. Hennard, M. A. Abdallah, and A. M. Albrecht-Gary. 2004. Bacterial iron transport: coordination properties of azotobactin, the highly fluorescent siderophore of *Azotobacter vinelandii*. *Inorg. Chem.* **43**:1137–1152.
31. Palanche, T., F. Marmolle, M. A. Abdallah, A. Shanzer, and A. M. Albrecht-Gary. 1999. Fluorescent siderophore-based chemosensors: iron(III) quantitative determinations. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**:188–198.
32. Raymond, K. N., E. A. Dertz, and S. S. Kim. 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:3584–3588.
33. Raymond, K. N., G. E. Freeman, and M. J. Kappel. 1984. Actinide-specific complexing agents: their structural and solution chemistry. *Inorg. Chim. Acta* **94**:193–204.
34. Renshaw, J. C., V. Halliday, G. D. Robson, A. P. Trinci, M. G. Wiebe, F. R. Livens, D. Collison, and R. J. Taylor. 2003. Development and application of an assay for uranyl complexation by fungal metabolites, including siderophores. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3600–3606.
35. Royle, P. L., H. Matsumoto, and B. W. Holloway. 1981. Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* **145**:145–155.
36. Schalk, I. J., C. Hennard, C. Dugave, K. Poole, M. A. Abdallah, and F. Pattus. 2001. Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol. Microbiol.* **39**:351–360.
37. Schalk, I. J., P. Kyslik, D. Prome, A. van Dorselaer, K. Poole, M. A. Abdallah, and F. Pattus. 1999. Copurification of the FpvA ferric pyoverdinin receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **38**:9357–9365.
38. Serino, L., C. Reimmann, H. Baur, M. Beyeler, P. Visca, and D. Haas. 1995. Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* **249**:217–228.
39. Smith, W. L., and K. N. Raymond. 1981. Specific sequestering agents for the actinides. 6. Synthetic and structural chemistry of tetrakis(N-alkylalkanehydroxamato)thorium(IV) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **103**:3341–3349.
40. Spiro, T. G. 1977. Chemistry and biochemistry of iron. Grune and Stratton, New York, NY.
41. Takase, H., H. Nitani, K. Hoshino, and T. Otani. 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* **68**:1834–1839.
42. Tseng, C. F., A. Burger, G. L. A. Mislin, I. J. Schalk, S. S.-F. Yu, S. I. Chan, and M. A. Abdallah. 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.
43. Visca, P., G. Colotti, L. Serino, D. Verzili, N. Orsi, and E. Chiancone. 1992. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2886–2893.
44. Winkelmann, G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:691–696.
45. Zamri, A., and M. A. Abdallah. 2000. An improved stereocontrolled synthesis of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Tetrahedron* **56**:249–256.



## Minireview

# New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance

Isabelle J. Schalk,\* MéliSSa Hannauer and Armelle Braud

UMR7242, University of Strasbourg-CNRS, ESBS, Blvd Sébastien Brant, F-67413 Illkirch, Strasbourg, France.

### Summary

**Siderophores are chelators with extremely strong affinity for ferric iron and are best known for their capacity to feed microorganisms with this metal. Despite their preference for iron, they can also chelate numerous other metals with variable affinities. There is also increasing evidence that metals other than iron can activate the production of siderophores by bacteria, thereby implicating siderophores in the homeostasis of metals other than iron and especially heavy metal tolerance. This article considers this new concept that siderophores play a role in protecting bacteria against metal toxicity and discusses the possible contribution of these chelators to the transport of biological relevant metals in addition to iron.**

### Introduction

Ions of the metals sodium, magnesium and potassium participate in the basic metabolism of cells and are therefore absolutely essential for life. They are present in high quantities in bacterial cells with concentrations in the mM range (Heldal *et al.*, 1985). The metals iron, zinc, nickel, copper, manganese, cobalt and molybdenum are also involved in cellular processes and are present in mM or  $\mu$ M concentrations (Heldal *et al.*, 1985). Most of the other metals, including lead, mercury, aluminum and silver, have absolutely no biological function and are therefore termed abiotic elements. Bacteria have mechanisms to protect themselves from these metals (Nies, 1999; 2003).

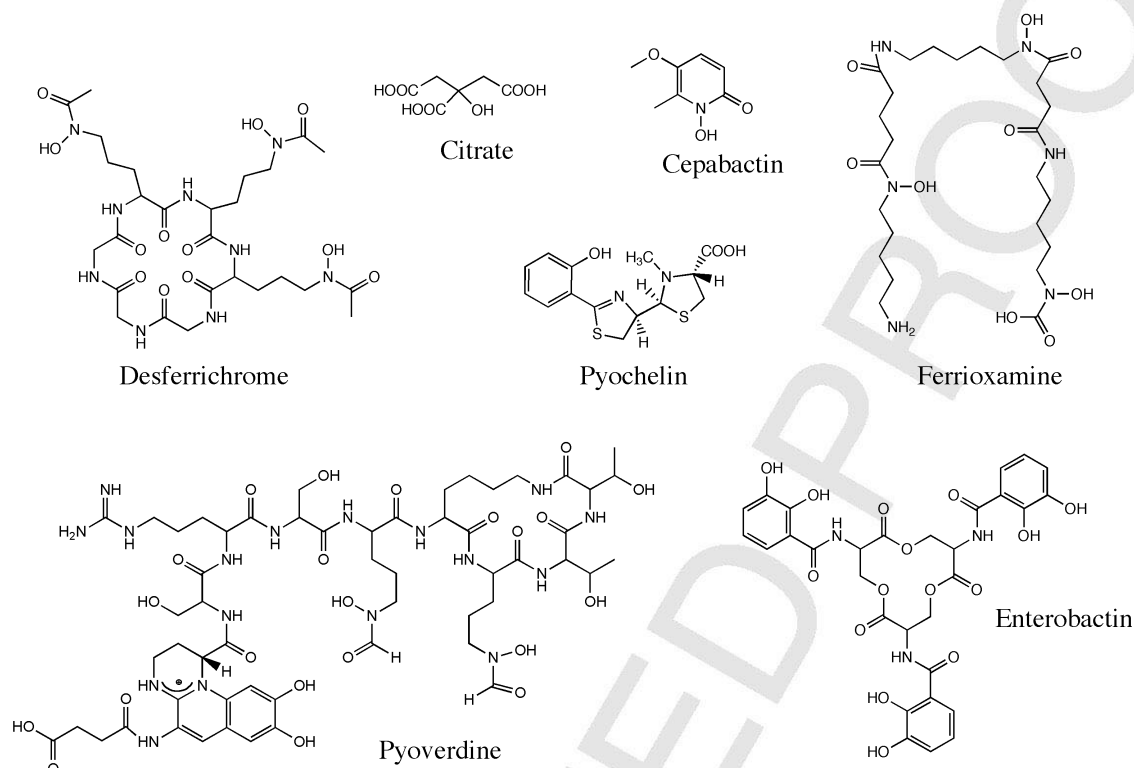
Metals involved in cellular processes are often cofactors of enzymes. A systematic analysis of 1371 enzymes

showed that 47% contain a metal ion (Andreini *et al.*, 2008). Among metals found in enzymes, magnesium is by far the most frequent, followed by zinc, iron and manganese (Waldron and Robinson, 2009). In conditions of limited availability of an essential metal, various enzymes necessary for bacterial metabolism are inactive compromising cell survival. On the opposite, the presence of an excess of metal, even of a necessary metal, can be toxic due to interactions with non-specific targets. In bacterial cells, metalloproteins acquire the appropriate metal by controlling and limiting the number of metals in the cytoplasm. Consequently, as proposed by Waldron and Robinson: 'metals are not in competition for a limited pool of proteins, but rather the proteins compete for a limited pool of metals' (Robinson, 2007; Waldron and Robinson, 2009). Metal occupancy of metalloproteins thus is a function of the relative rather than the absolute affinities of the different proteins for metals. In addition, high concentrations of some metals, such as iron, copper, cobalt and chromium, cause oxidative stress (production of reactive oxygen species, including free radicals and peroxides), which can lead to damage of cellular DNA (Valko *et al.*, 2005). To avoid such a process, the intracellular concentration of every metal is tightly regulated and bacteria require precise homeostatic mechanisms to balance uptake and storage of the different essential metals and to avoid any uptake of abiotic elements. It is generally accepted that siderophores play key roles in iron homeostasis in microorganisms, but there is increasing evidence implicating these chelators in the homeostasis of other metals.

### Siderophores and iron

Siderophores are low-molecular-weight chelating agents (200–2000 Da) produced by bacteria, fungi and plants to facilitate uptake of iron (Chu *et al.*, 2010; Hider and Kong, 2010). This metal is essential for the growth and development of almost all living organisms. It acts as a catalyst in some of the most fundamental enzymatic processes, including oxygen metabolism, electron transfer, and DNA and RNA synthesis. In most aerobic microbial habitats, iron is found in insoluble oxide hydrate complexes. During infections, iron is similarly not freely accessible for the

Received 13 May, 2011; accepted 21 June, 2011. \*For correspondence. E-mail isabelle.schalk@unistra.fr; Tel. (+33) 3 68 85 47 19; Fax (+33) 3 68 85 48 29.



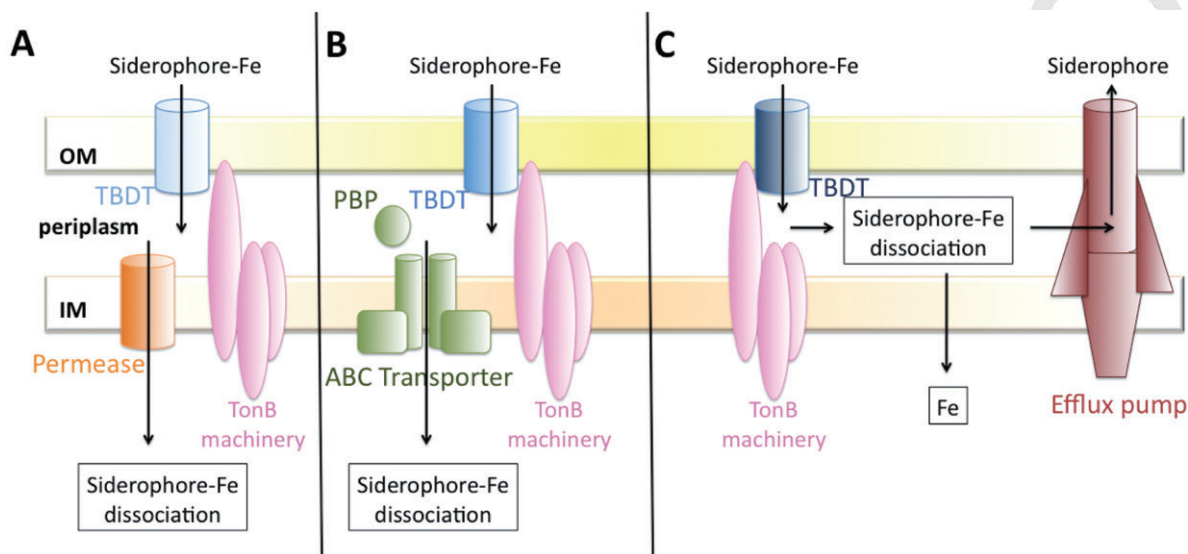
**Fig. 1.** Examples of siderophore structures. Desferrichrome is produced by *Aspergillus ustilago* and is a hydroxamate siderophore like ferrioxamine (Leong and Winkelmann, 1998; Braun, 2003). Enterobactin is a catecholate siderophore produced by *E. coli* (Raymond *et al.*, 2003). Pyoverdine is produced by *P. aeruginosa* PAO1 and is a mixed siderophore, which carries both hydroxamate and catecholate groups. Citrate is considered to be a siderophore (Yue *et al.*, 2003). Cepabactin is a 1-hydroxy-2-pyridinone bidentate siderophore produced by *Burkholderia cepacia* (Klumpp *et al.*, 2005). Pyochelin is a 2-(2-*o*-hydroxyphenyl-2-thiazolin-4-yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid produced by *P. aeruginosa* and *B. cepacia*, which chelates iron via oxygen and nitrogen electron donor atoms (Cox *et al.*, 1981; Youard *et al.*, 2007; Hoegy *et al.*, 2009).

pathogen, as it is tightly sequestered by proteins or haems in the host. Therefore, the free iron concentrations are always extremely low in the environment of microorganisms ( $10^{-7}$  to  $10^{-24}$  M) (Raymond *et al.*, 2003). The range of siderophore concentrations found in soil is wide, from tens of micromoles to a few millimoles per litre (Hersman *et al.*, 1995). The siderophores play an important role in extracellular solubilization of iron from minerals so as to make it available to microorganism(s). The scenario during infection is often similar; siderophores are produced by bacteria to extract iron from organic substances and are considered to be virulence factors (Lamont *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2004).

Siderophores have a variety of chemical structures and form a family of at least 500 different compounds (Chu *et al.*, 2010; Hider and Kong, 2010) (Fig. 1). They possess up to six oxygen or nitrogen electron donor atoms, which can bind metal cations. Some bacterial siderophores are polycarboxylates, but most bacterial siderophores in soil are catecholates, and most fungi produce hydroxamate siderophores. Mixed siderophores, such as azotobactin and yersiniabactin, are produced by *Azotobacter vinelan-*

*dii* and *Yersinia pestis* respectively (Knosp *et al.*, 1984; Haag *et al.*, 1993), and pseudobactin and pyoverdine, which carry both hydroxamate and catecholate groups, are widespread among the pseudomonades (Abdallah and Pattus, 2000; Boukhalfa and Crumbliss, 2002). All siderophores are chelating agents with an extremely high affinity for  $\text{Fe}^{3+}$  with stability constants in general around  $10^{30} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 2003). Once iron is chelated, siderophores deliver the iron to bacteria via energy-coupled transport involving TBDTs (TonB-Dependent Transporters) and the TonB complex, an inner membrane complex composed of TonB, ExbB and ExbD (Fig. 2) (Schalk, 2008; Noinaj *et al.*, 2010). Afterwards, ferrisiderophore fate in the periplasm is dependent on the siderophore pathway and bacteria (Fig. 2). For example, ferrisiderophores are transported across the inner membrane by either ABC transporters (ferrichrome or ferrienterobactin transport in *Escherichia coli*) or permeases (ferrichrome or ferripyochelin pathways in *P. aeruginosa*) (Koster and Braun, 1989; Chenault and Earhart, 1991; Cuiv *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2007; Hannauer *et al.*, 2010). Iron is most of the time released in





**Fig. 2.** Different mechanisms and strategies (A, B and C) for the ferrisiderophore pathways in Gram-negative bacteria. Uptake across the outer membrane always involves a specific TonB-dependent transporter (TBDT). A bacterium able to use several siderophores to sequester iron expresses a TBDT specific for each siderophore. The energy required for this first uptake process is provided by the proton-motive force (pmf) of the inner membrane by means of an inner membrane complex comprising TonB, ExbB and ExbD (Postle and Kadner, 2003; Wiener, 2005; Gumbart *et al.*, 2007). This TonB–ExbB–ExbD complex interacts with the N-terminal region of the TBDT (Schalk *et al.*, 2009). Uptake of ferrisiderophore across the inner membrane involves either specific ABC transporters (A, ferrichrome and ferrienterobactin pathways in *E. coli*; Koster and Braun, 1989; Staudenmaier *et al.*, 1989; Chenault and Earhart, 1991; Koster, 1991; Köster, 1997; Braun and Herrmann, 2007) or specific permeases (B, ferripyochelin or ferrichrome pathways in *P. aeruginosa*; Cuiv *et al.*, 2004; 2007). Iron may be released from the siderophore either in the cytoplasm (A and B, ferrichrome and ferrienterobactin pathways in *E. coli*) or periplasm (C, ferripyoverdine pathway in *P. aeruginosa*) depending on the ferrisiderophore pathway. The mechanism of ferrisiderophore dissociation in the cytoplasm has been investigated for the ferrichrome and ferrienterobactin pathways in *E. coli*. Iron is released from ferrichrome in the cytoplasm in a process probably involving iron reduction (Matzanke *et al.*, 2004) followed by acetylation of the siderophore and its recycling into the growth media (Hartman and Braun, 1980). For the ferrienterobactin pathway, a cytoplasmic esterase hydrolyses the siderophore (Brickman and McIntosh, 1992). Iron release from the siderophore in the periplasm has only been described for the ferripyoverdine pathway in *P. aeruginosa* and involves no chemical modification of the siderophore, but the iron is reduced and the siderophore recycled into the extracellular medium by the efflux pump PvdRT–OpmQ (Schalk *et al.*, 2002; Greenwald *et al.*, 2007; Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010). OM, outer membrane; IM, inner membrane.

the cytoplasm by mechanisms involve either enzymatic degradation or chemical modification of the siderophore and/or iron reduction (Hartman and Braun, 1980; Brickman and McIntosh, 1992; Matzanke *et al.*, 2004). However, iron can also be released from the siderophore in the periplasm. For pyoverdine pathway in *P. aeruginosa*, iron is released from the siderophore by a mechanism involving no chemical modification of the siderophore but apparently iron reduction (Schalk *et al.*, 2002; Greenwald *et al.*, 2007; Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010).

### Siderophores and their ability to chelate metals other than iron

Stable complexes are also formed between siderophores and metal cations other than iron (Hernlem *et al.*, 1996; Neubauer *et al.*, 2000). For example, the formation constants for the hydroxamate siderophore desferrioxamine B with  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{In}^{3+}$  are between  $10^{20}$  and  $10^{28} \text{ M}^{-1}$ , whereas that with  $\text{Fe}^{3+}$  is  $10^{30} \text{ M}^{-1}$  (Evers *et al.*, 1989;

Hernlem *et al.*, 1996). Screening with 16 different metals ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) revealed that pyoverdine and pyochelin (Fig. 1), the two major siderophores produced by *Pseudomonas aeruginosa*, are able to chelate all these metals (Braud *et al.*, 2009a,b). However, competition experiments between iron and other metals for pyoverdine showed a clear preference for iron (Braud *et al.*, 2009b). Formation constants for pyoverdine with  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  are between  $10^{17}$  and  $10^{22} \text{ M}^{-1}$ , whereas that with  $\text{Fe}^{3+}$  is  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Chen *et al.*, 1994). Vanadium is a metal that under physiological conditions can exist in two oxidation states, V(IV) (vanadyl ion) and V(V) (vanadate ion). It was demonstrated that both ions can form complexes with pyochelin and putrebactin, but only vanadyl ion was found in complex with pyoverdine and enterobactin, and vanadate ion with desferrioxamine B (Lutoretto and Grdinic, 1986; Karpishin *et al.*, 1993; Baysse *et al.*, 2000; Pakchung *et al.*, 2011). Interactions between pyoverdine released by *Pseudomonas fluorescens* (CCUG 32456) isolated from the granitic rock aqui-

## 4 I. J. Schalk, M. Hannauer and A. Braud

fers and curium(III) have also been described (Moll *et al.*, 2008). The complexation of curium(III) with this siderophore is stronger than the complexation with EDTA, hydroxide or carbonate. Desferrioxamine has the ability to coordinate plutonium(V), a much larger and structurally diverse metal centre than iron (Neu *et al.*, 2000). All these data show that the influence of siderophores secreted by microorganisms on the migration processes of any toxic metal in our environment must be taken into account in strategies for the risk assessment of potential waste disposal sites.

#### Siderophore production is regulated by the iron concentration, but other metals seem also have a role

It is well known that siderophore biosynthesis by bacteria is regulated by both the amount of iron present in the environment and the amount of iron already acquired by the bacteria. For example, pyoverdine and pyochelin production in *P. aeruginosa* is repressed by the cytoplasmic Fur protein in the presence of iron (Lee and Helmann, 2007). In the absence of iron, the upregulation of the expression of genes related to pyoverdine synthesis and uptake involves a transmembrane signalling cascade. The system is induced by the binding of the siderophore to the TBDT FpvA at the cell surface and involves at the level of the inner membrane and cytoplasm the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor/anti-sigma factor pairs, Fpvl/FpvR and PvdS/FpvR (Wilson and Lamont, 2000; Wilson *et al.*, 2001; Lamont *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002; Visca *et al.*, 2002; Beare *et al.*, 2003; Redly and Poole, 2003; 2005). Equivalent sigma/anti-sigma factors have been described for ferrichrome, ferrioxamine and mycobactin uptake by *P. aeruginosa*, and citrate uptake by *P. aeruginosa* and *E. coli* (Braun *et al.*, 2003; Llamas *et al.*, 2006; 2008; Mettrick and Lamont, 2009). The biosynthesis of pyochelin is positively regulated by a different mechanism involving an AraC-like regulatory protein (the PchR proteins) (Michel *et al.*, 2005) as also observed for the alcaligin siderophore in *Bordetella alcaligin* (Brickman *et al.*, 2001). In this case, the pyochelin–Fe complex, after its uptake across the outer and inner membranes, interacts with the AraC-like regulator in the bacterial cytoplasm (Michel *et al.*, 2007).

Metals other than iron are also able to stimulate or inhibit siderophore production in a number of bacteria, even in the presence of high iron concentrations. For instance, the presence of molybdenum in the environment of *Azotobacter vinelandii* regulates the production of azotochelin, a catechol siderophore able to chelate this metal. At concentrations up to 100  $\mu\text{M}$  of molybdenum, azotochelin production is activated, whereas at higher metal concentrations the synthesis of the siderophore is

completely repressed (Duhme *et al.*, 1998). High concentrations of aluminum increase the production of schizokinen and *N*-deoxyschizokinen (two hydroxamate siderophores) in iron-limited cultures but not iron-replete cultures of *Bacillus megaterium* (Hu and Boyer, 1996). In iron-limited succinate medium, pyoverdine production is induced by 10  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  (Braud *et al.*, 2009b). Still under iron-limited conditions, exposure to 10 mM  $\text{Cu}^{2+}$  upregulates genes involved in the synthesis of pyoverdine and downregulates those involved in the synthesis of pyochelin (Teitzel *et al.*, 2006). Interestingly, even in the presence of iron (100  $\mu\text{M}$ ), pyoverdine production is increased by 10 and 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  (290 and 380% respectively) and to a lesser extent by 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{2+}$  (134%) (Braud *et al.*, 2010). No activation of pyochelin production was observed, but a repression for 10  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$  and 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{+6}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in iron-limited medium (Visca *et al.*, 1992). When culture media were supplemented with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$  decreased pyochelin production (Braud *et al.*, 2010). In all these experiments, metals were added at the beginning of the cultures. Unfortunately, most of these studies have been carried out with only a single or in some cases two metal concentrations and not for a large range of concentrations. Probably, as for iron, siderophore production can be both activated and inhibited by many of these metals, depending on their concentrations. Therefore, it would be useful to test large ranges of concentrations of each metal to establish their exact roles in regulation of siderophore production in more detail.

It is still unclear how metals other than iron stimulate siderophore production. One possible explanation is that the free siderophore concentration in the medium is reduced in the presence of other metals as a result of complex formation. Such a decrease in the siderophore concentration may be sufficient to activate secretion of additional siderophore into the medium. However, pyoverdine production after an overnight culture was about 120  $\mu\text{M}$  (in succinate medium), a concentration much higher than the 10  $\mu\text{M}$  of metal added to the culture (Braud *et al.*, 2009b), indicating clearly that the amount of siderophore was not limiting, at least in this experimental system. The same study revealed that all metals increasing pyoverdine production ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ ) were able either to inhibit pyoverdine– $^{55}\text{Fe}$  uptake or to be incorporated into *P. aeruginosa* via the pyoverdine pathway (Braud *et al.*, 2009b). Presumably, therefore, these pyoverdine–metal complexes are able to interact with FpvA, at the cell surface. Thus, the stimulation of pyoverdine production by metals other than iron may involve the FpvR/PvdS signalling cascade being activated by the pyoverdine–metal complex binding to FpvA at the cell surface. This mechanism does not need any uptake of

the metal to activate the production of the siderophore. Regulation of pyochelin biosynthesis involves a cytoplasmic interaction between PchR and pyocheline–Fe. Such an interaction requires uptake of the siderophore–metal complex into the cytoplasm, which is dangerous for the cell if the metal is toxic. This presumably explains why no metals have been found to activate the biosynthesis of this siderophore, and indeed, they all inhibit its synthesis in iron-limited and iron-supplemented media. Stimulation of siderophore production by metals other than iron as observed for pyoverdine in *P. aeruginosa*, azotochelin in *A. vinelandii* and schizokinen in *B. megaterium* raises the question of the purpose of such a process.

#### Another role for siderophores: protecting bacteria against metal toxicities

The observation that toxic metals induce production of some siderophores suggests that these chelators may play a role in bacterial heavy metal tolerance. Toxic metals enter the periplasm of Gram-negative bacteria mostly by diffusion across the porins (Lutkenhaus, 1977; Pugsley and Schnaitman, 1978; Li *et al.*, 1997). Thus, the binding of metals to siderophores in the extracellular medium reduces the free metal concentration, probably affecting diffusion (the molecular mass of the resulting siderophore–metal complex is too great for diffusion via porins) and therefore their toxicity. Growth assays showed that *P. aeruginosa* strains capable of producing pyoverdine and pyochelin appeared to be more resistant to metal toxicity than a siderophore non-producing strain (Braud *et al.*, 2010). The presence of the siderophores decreases metal accumulation in bacteria as monitored by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES): pyochelin reduces the uptake of Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (uptake inhibition greater than 80% for Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>); and pyoverdine decreases the uptake of Al<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Tb<sup>3+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (uptake inhibition around 80% for Al<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> and 40% for the other metals) (Braud *et al.*, 2010). Pyoverdine was more effective than pyochelin in inhibiting the diffusion of Eu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup> and Tb<sup>3+</sup> (all non-biological metals), whereas pyochelin was more effective against Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (biological metals). These studies with *P. aeruginosa* clearly show that siderophores are able to sequester metals in the extracellular medium and probably prevent their diffusion across the bacterial membranes. The transcriptional profile of *P. aeruginosa* exposed to Cu<sup>2+</sup> is consistent with siderophores having this function in metal resistance (Teitzel *et al.*, 2006). Indeed, the genes involved in the synthesis of pyoverdine are upregulated and *fpvA*, involved in pyoverdine–Fe uptake, is downregulated. So Cu<sup>2+</sup> induces the production of pyoverdine and not of the transporter of pyoverdine–

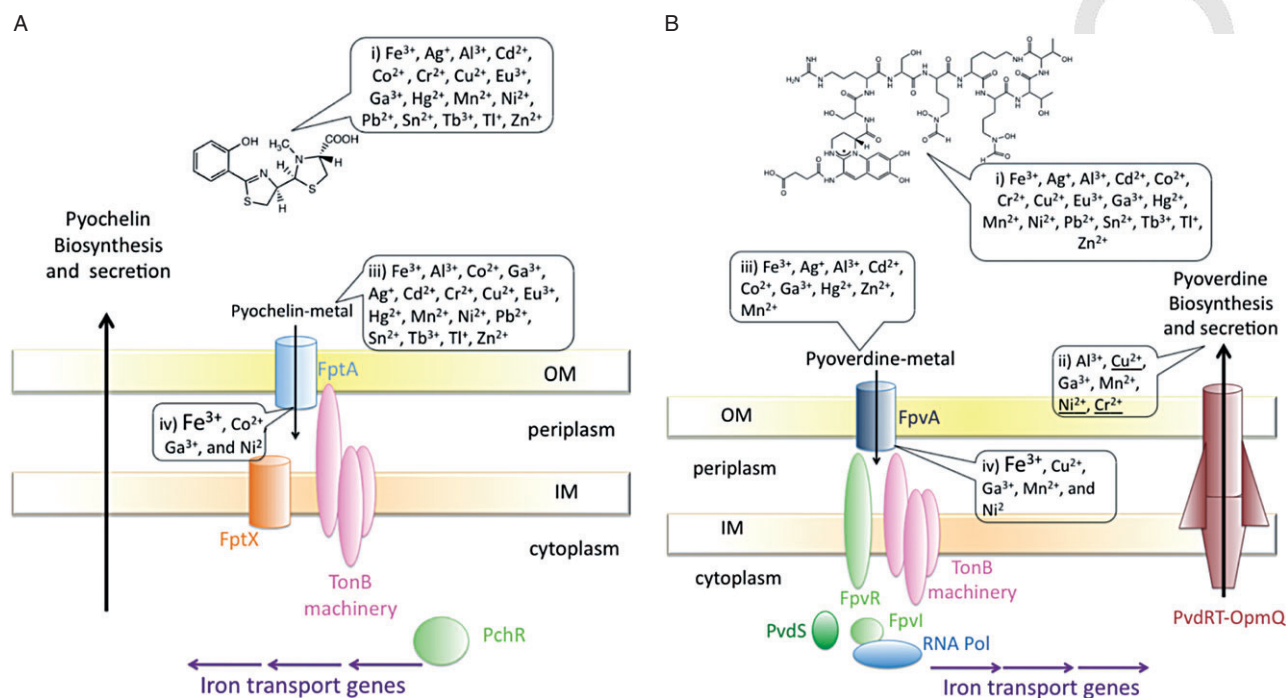
Fe, such that the metal will be sequestered in the extracellular medium but not transported. Such a mechanism must involve a different mechanism and sensitivity to the presence of metals for the two sigma factor/anti sigma factor pairs, FpvR/Fpvl and FpvR/PvdS. Sequestration of toxic metals by siderophores in the extracellular medium has also been proposed for *Streptomyces tendae* F4, a Cd-resistant bacterium, which can simultaneously produce a variety of hydroxamate siderophores (desferrioxamine B, desferrioxamine E and coelichelin) that bind Cd<sup>2+</sup>. The production of these siderophores is upregulated by Cd<sup>2+</sup>, both in the presence and absence of iron. Furthermore, the production of the siderophores reduces uptake of Cd<sup>2+</sup> by *Streptomyces tendae* F4 while supplying it with iron (Dimkpa *et al.*, 2009). Gillis *et al.* have shown that alcaligin E, a siderophore produced by *Alcaligenes eutrophus* strain CH34, markedly stimulates the growth of the bacteria in the presence of Cd<sup>2+</sup> (Gillis *et al.*, 1998). *Bacillus megaterium*, a Gram-positive bacteria, produces two hydroxamate siderophores under conditions of iron limitation, schizokinen and *N*-deoxyschizokinen. At high concentration of aluminum and low concentrations of iron, siderophore production slowed the passive transport of aluminum in *B. megaterium* (Hu and Boyer, 1996).

All these data suggest a role of siderophores in bacterial metal resistance and such a function must involve an induction of siderophore production by toxic metals. However, do all siderophores have a role in metal resistance? For *P. aeruginosa*, pyoverdine is more involved than pyochelin in the protection against toxic metals. Indeed, pyoverdine is more efficient than pyochelin in heavy metals sequestration outside the bacteria (Braud *et al.*, 2010). In addition, toxic metals (at least at the concentrations studied) activate only the production of pyoverdine and not pyochelin (Braud *et al.*, 2010). At last, the molecular mechanism involved in the activation of pyoverdine production starts from the cell surface with FpvA, while in the pyocheline pathway it occurs in the cytoplasm and involves pyochelin–metal uptake and its interaction with the cytoplasmic PchR regulator. Such a regulation mechanism with cytoplasmic uptake of siderophore–metal complexes is unfavourable to a strategy of metal resistance involving siderophores.

#### Are siderophores able to import metals other than iron by TBDTs?

Specific TBDTs for the translocation of metals across the outer membrane have been well described for iron in complex with siderophores (Fig. 3), for vitamin B12, which contains a cobalt ion in a corrin ring, and more recently for nickel (Shultis *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2007). For vitamin B12 and nickel, the mechanism and the proteins





**Fig. 3.** Metal specificities of the pyochelin and pyoverdine pathways (Braud *et al.*, 2009a; Braud *et al.*, 2009b; Braud *et al.*, 2010). Pyochelin (A) and pyoverdine (B) are the two major siderophores produced by *P. aeruginosa* for iron import. FptA and FpvA are the ferripyochelin and ferripyoverdine TBDTs. (i) Metals that bind the siderophore; (ii) metals that lead to upregulation of the siderophore iron-limited conditions (underlined are the metals leading to upregulation in iron-supplemented conditions); (iii) metal-siderophore complexes that bound the TBDT; and (iv) metal-siderophore complexes that were transported. OM, outer membrane; IM, inner membrane. For (B), FpvR is the anti-sigma factor and Fpvl and PvdS the sigma factors involved in pyoverdine biosynthesis regulation. PvdRT-OpmQ is the efflux pump involved in pyoverdine secretion and recycling.

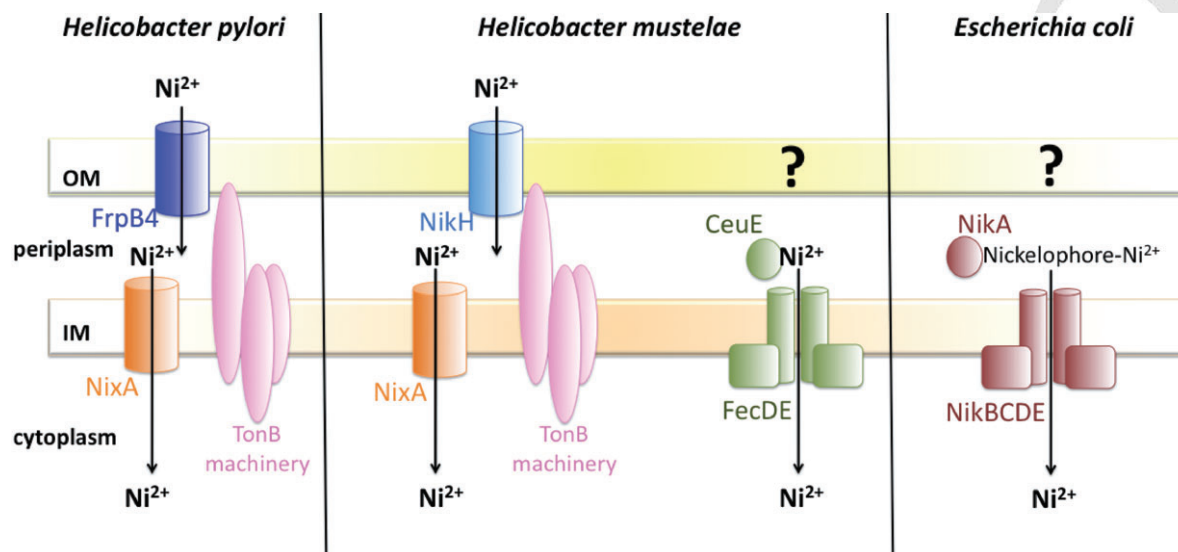
involved are very similar to those described for the ferri-siderophore pathways (Fig. 3).

Vitamin B12 is a rare compound (Croft *et al.*, 2005) and is essential for many organisms. In *E. coli*, it is imported by the specific TBDT BtuB (Shultis *et al.*, 2006), which has the conserved structure shared by all ferrisiderophore TBDTs (Shultis *et al.*, 2006). Then, a specific periplasmic binding protein BtuF (Cadieux *et al.*, 2002) binds vitamin B12 in the periplasm and an ABC transporter (BtuCD; Locher *et al.*, 2002) is responsible for its uptake across the inner membrane.

Nickel uptake has been the best described in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter mustelae* and *E. coli* (Fig. 4). This metal is essential for gastric *Helicobacter* species, since it functions as a cofactor for the urease and hydrogenase enzymes, responsible for acid resistance, nitrogen metabolism, and energy production (Olson and Maier, 2002; Stingl and De Reuse, 2005). The literature contains evidence that nickel is transported across the outer membrane by a TBDT, FrpB4, in *Helicobacter pylori*, but no nickelophore or corresponding metalophore has been identified (Fig. 4) (Schauer *et al.*, 2007). Consistent with these data, transcriptome analyses and protein-DNA interaction assays demonstrated that the *exbB/exbD/tonB* operon coding for the energy transducing machinery in

*H. pylori* is regulated by both the iron and nickel responsive regulators Fur and NikR (Ernst *et al.*, 2006). Although control of this operon by Fur was expected, the additional regulation by NikR suggested a possible overlap between the iron and nickel transport mechanisms across the outer membrane. Nickel transport across the inner membrane in *H. pylori* is mediated by NixA, an eight-transmembrane-domain protein that belongs to a family of prokaryotic and fungal nickel/cobalt secondary transporters (Mobley *et al.*, 1995). Data from mutational studies suggest that *H. mustelae* contains two separate acquisition pathways for  $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 4) (Stoof *et al.*, 2010). The first one is very similar to what has been described in *H. pylori*.  $\text{Ni}^{2+}$  is transported over the outer membrane by the TBDT NikH, energized by a TonB protein, and subsequently transported across the inner membrane by a permease NixA (Stoof *et al.*, 2010). It is still unclear how NikH recognizes  $\text{Ni}^{2+}$ , if a nickelophore is involved. For the second pathway, only a  $\text{Ni}^{2+}$  ABC transporter, FecDECEuE, has been identified (Stoof *et al.*, 2010). Whether the FecDECEuE system requires a TBDT or porin is unknown. However, some overlap between these two pathways may exist, in view of the absence of any effect of the *nixA* mutation on urease activity or cellular  $\text{Ni}^{2+}$  content, which contrast with the decrease  $\text{Ni}^{2+}$  content of the *tonB* and *nikH* mutants (Stoof





**Fig. 4.** Different mechanisms and strategies for  $\text{Ni}^{2+}$  uptake in Gram-negative bacteria. In *H. pylori*,  $\text{Ni}^{2+}$  uptake pathway involves a TBDT FrpB4 and a permease NixA for the transports across the outer and inner membranes respectively (Mobley *et al.*, 1995; Schauer *et al.*, 2007). In *H. mustelae*, two separate acquisition pathways are present (Stoof *et al.*, 2010). The first one involves as for *H. pylori* a TBDT NikH and a permease NixA. For the second, only the inner membrane ABC transporter FecDE-CeuE has been identified and nothing is known about the mechanism involved in the uptake of the metal across the outer. In *E. coli*, only an ABC transporter NikABCDE has been identified and no TBDT (Mulrooney and Hausinger, 2003). Interestingly, the periplasmic binding protein Nika is able to bind  $\text{Ni}^{2+}$  in complex with EDTA, suggesting the involvement of a nickelophore in this pathway (Cherrier *et al.*, 2005).

*et al.*, 2010). The increased  $\text{Co}^{2+}$  resistance observed for *fecD* mutants suggests that FecD is also involved in  $\text{Co}^{2+}$  acquisition, and this was confirmed by the decreased cellular  $\text{Co}^{2+}$  levels in this mutant (Stoof *et al.*, 2010).  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  acquisition pathways often overlap (Rodionov *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). This is likely due to the similarities between these two transition metals. These observations are in agreement with the finding that  $\text{Co}^{2+}$ -cofactored NikRs ( $\text{Ni}^{2+}$ -dependent transcriptional regulator) from *H. pylori* and *E. coli* are able to bind target DNA *in vitro* although with less affinity than  $\text{Ni}^{2+}$ -cofactored NikR (Zambelli *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Dian *et al.*, 2011). *Escherichia coli* uses the NikABCDE transporter for nickel uptake across the cytoplasmic membrane and no specific TBDT was identified (Fig. 4) (Mulrooney and Hausinger, 2003). NikABCDE comprises five proteins: Nika is a periplasmic nickel-binding protein, NikB and NikC are integral inner membrane proteins; and NikD and NikE are membrane-associated proteins with intrinsic ATPase activity. The transport across the outer membrane may involve diffusion via porins, but because siderophores are able to chelate this metal, it is plausible that a TBDT operates in situations of nickel limitation. Indeed, a metal-EDTA complex has been observed in the binding site of the *E. coli* Nika (Cherrier *et al.*, 2005). This strongly suggests that nickel transport into *E. coli* requires the binding of this metal ion to a metallophore and an uptake mechanism across the outer membrane, which requires a TBDT. In conclusion, the existence of TBDTs involved in

$\text{Ni}^{2+}$  acquisition has been described in *H. pylori* and *H. mustelae*, but the only evidence that these transporters work with nickelophores is the ability of *E. coli* periplasmic protein Nika to bind metal-EDTA.

A screening study with 16 metals ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) showed that a siderophore-deficient strain of *P. aeruginosa* imported  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in complex with the siderophore pyochelin, but with uptake rates 23- to 35-fold lower than for pyocheline-Fe (Braud *et al.*, 2009a). Equivalent data have been obtained for the pyoverdine pathway:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in complex with pyoverdine accumulated into the cells but with lower uptake rates compared with pyoverdine-Fe (7- to 42-fold lower). In both assays, metal uptakes were dependent on the presence of the siderophore and were TonB-dependent, suggesting that they occurred via the siderophores and their corresponding TBDT. None of the other metals tested was accumulated through either the pyoverdine or pyochelin pathways (Braud *et al.*, 2009b). Note that all the metals transported are biological metals except  $\text{Ga}^{3+}$ .  $\text{Ga}^{3+}$  has no known biological function, but has the same coordination as iron and is often used as a tool to investigate iron uptake pathways (Folschweiller *et al.*, 2002; Greenwald *et al.*, 2007). No accumulation of toxic metals suggests that the import of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  could have a biological significance.

The work on the uptake of nickel and vitamin B12 and the metal specificities of the pyochelin and pyoverdine

pathways in *P. aeruginosa* clearly indicate that TonB-dependent transport is not only reserved to iron uptake. Other biological metals in complex with a metallophore may also use this route to enter Gram-negative bacteria. However, this raises the issue of whether specific metallophores exist for all the biological metals able to be transported by TonB-dependent pathways. There is currently no data indicating the existence of specific metallophores for nickel, zinc, copper or manganese. However, there are data showing that siderophores can chelate metals other than iron with different affinities and therefore they may have the potential to transport other metals present in their environment.

### Conclusion

The data currently available indicate that siderophores are produced by bacteria not solely to scavenge for iron. They may have wider and more complex functions than previously thought. Their presence is apparently highly beneficial for bacteria in an environment contaminated with toxic metals and bacteria able to produce siderophores are more resistant to heavy metals than those not producing siderophores. With their high affinity for iron and other metals and their substantial production and secretion into the extracellular medium, siderophores clearly provide an extracellular protection for bacteria by sequestering heavy metals outside the bacteria and avoiding their diffusion through porins into the bacteria. However, it is possible that siderophore production in response to heavy metal exposure could also have detrimental effects. If the siderophore uptake receptor does not distinguish between the metal–siderophore and the ferri–siderophore complexes, siderophores may provide a secondary mechanism for the uptake of toxic metals. Therefore, the ferrisiderophore pathways must have high metal specificity to transport or accumulate only the appropriate metal(s). Is the right metal only iron, or are other biological metals like nickel, copper or manganese, included? Work with the pyoverdine and pyochelin pathways in *P. aeruginosa* suggests that other metals can enter the bacteria by this route. Nevertheless, further studies are necessary to answer this question more rigorously.

### References

Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2000) Siderophores and iron-transport in microorganisms. *J Chin Chem Soc* **47**: 1–20.  
 Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **33**: 6391–6402.

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., and Thornton, J.M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* **13**: 1205–1218.  
 Baysse, C., De Vos, D., Naudet, Y., Vandermonde, A., Ochsner, U., Meyer, J.M., *et al.* (2000) Vanadium interferes with siderophore-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146** (Pt 10): 2425–2434.  
 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. *Mol Microbiol* **47**: 195–207.  
 Boukhalfa, H., and Crumbliss, A.L. (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**: 325–339.  
 Braud, A., Hannauer, M., Milsin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2009a) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol* **191**: 5317–5325.  
 Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I.J. (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol* **11**: 1079–1091.  
 Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2010) The siderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: Another biological function of these two siderophores. *Environ Microbiol Report* **2**: 419–425.  
 Braun, V. (2003) Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* **8**: 1409–1421.  
 Braun, V., and Herrmann, C. (2007) Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 6913–6918.  
 Braun, V., Mahren, S., and Ogierman, M. (2003) Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**: 173–180.  
 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. *J Biol Chem* **267**: 12350–12355.  
 Brickman, T.J., Kang, H.Y., and Armstrong, S.K. (2001) Transcriptional activation of *Bordetella alcaligin* siderophore genes requires the AlcR regulator with alcaligin as inducer. *J Bacteriol* **183**: 483–489.  
 Cadieux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Koster, W., Mohanty, A.K., Wiener, M.C., and Kadner, R.J. (2002) Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 706–717.  
 Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E., and Hadar, Y. (1994) Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Sci Soc Am J* **58**: 390–396.  
 Chenault, S.S., and Earhart, C.F. (1991) Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol* **5**: 1405–1413.  
 Cherrier, M.V., Martin, L., Cavazza, C., Jacquamet, L., Lemaire, D., Gaillard, J., and Fontecilla-Camps, J.C. (2005) Crystallographic and spectroscopic evidence for

- high affinity binding of FeEDTA(H<sub>2</sub>O)- to the periplasmic nickel transporter NikA. *J Am Chem Soc* **127**: 10075–10082.
- Chu, B.C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., Peacock, R.S., *et al.* (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* **23**: 601–611.
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Jr, Moore, M.L., and Cook, J.C., Jr (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4256–4260.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., and Smith, A.G. (2005) Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**: 90–93.
- 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. *J Bacteriol* **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. *J Bacteriol* **189**: 284–287.
- Dale, S.E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., and Heinrichs, D.E. (2004) Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect Immun* **72**: 29–37.
- Dian, C., Vitale, S., Leonard, G.A., Bahlawane, C., Fauquant, C., Leduc, D., *et al.* (2011) The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol* **79**: 1260–1275.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Buchel, G., and Kothe, E. (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* **107**: ●●●.
- Duhme, R.C., Hider, M.J., Naldrett, M.J., and Pau, R.N. (1998) The stability of the molybdenum-azotochelin complex and its effect on siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Inorg Chem* **3**: 520–526.
- Ernst, F.D., Stoof, J., Horrevoets, W.M., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and van Vliet, A.H. (2006) NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun* **74**: 6821–6828.
- Evers, A., Hancock, R., Martell, A., and Motekaitis, R. (1989) Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of Fe (III), Ga(III), In(III), Al(III) and other highly charged metal ions. *Inorg Chem* **28**: 2189–2195.
- 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.
- Gilis, A., Corbisier, P., Baeyens, W., Taghavi, S., Mergeay, M., and van der Lelie, D. (1998) Effect of the siderophore alcaligin E on the bioavailability of Cd to *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Ind Microbiol Biotechnol* **20**: 61–68.
- 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.
- Gumbart, J., Wiener, M.C., and Tajkhorshid, E. (2007) Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophys J* **93**: 496–504.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G., and Zahner, H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J Gen Microbiol* **139**: 2159–2165.
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G.L., Shanzer, A., and Schalk, I.J. (2010) The ferrichrome uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* involves an iron release mechanism with acylation of the siderophore and a recycling of the modified desferrichrome. *J Bacteriol* **192**: 1212–1220.
- Hartman, A., and Braun, V. (1980) Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *J Bacteriol* **143**: 246–255.
- Heldal, M., Norland, S., and Tumyr, O. (1985) X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1251–1257.
- Hernlem, B.J., Vane, L.M., and Sayles, G.D. (1996) Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganic Chimica Acta* **244**: 179–184.
- Hersman, L., Lloyd, T., and Sposito, G. (1995) Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica Cosmochimica Acta* **59**: 3327–3330.
- Hider, R.C., and Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**: 637–657.
- Hoegy, F., Lee, X., Noël, S., Mislin, G.L., Rognan, D., Reimann, C., and Schalk, I.J. (2009) Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent *Pseudomonads*. *J Biol Chem* **284**: 14949–14957.
- Hu, X., and Boyer, G.L. (1996) Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4044–4048.
- Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 20440–20445.
- Karpishin, T.B., Dewey, T.M., and Raymond, K.N. (1993) The vanadium(IV) enterobactin complex: structural, spectroscopic, and electrochemical characterization. *J Am Chem Soc* **115**: 1842–1851.
- Klumpp, C., Burger, A., Mislin, G.L., and Abdallah, M.A. (2005) From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin. *Bioorg Med Chem Lett* **15**: 1721–1724.
- Knosp, O., von Tigerstrom, M., and Page, W.J. (1984) Siderophore-mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **159**: 341–347.



- 1 Koster, W. (1991) Iron(III) hydroxamate transport across the  
2 cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biol Met* **4**:  
3 23–32.
- 4 Köster, W. (1997) Transport of iron(III) hydroxamates across  
5 the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. In *Biorganic*  
6 *Chemistry, Transition Metals in Biology and Their Coordi-*  
7 *nation Chemistry*. Trautwein, A.X. (ed.). ••, ••: Wiley-VCH,  
8 pp. 56–68.
- 9 Koster, W., and Braun, V. (1989) Iron-hydroxamate transport  
10 into *Escherichia coli* K12: localization of FhuD in the peri-  
11 plasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Mol Gen*  
12 *Genet* **217**: 233–239.
- 13 Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil,  
14 M.L. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates  
15 virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*.  
16 *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7072–7077.
- 17 Lee, J.W., and Helmann, J.D. (2007) Functional specializa-  
18 tion within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*  
19 **20**: 485–499.
- 20 Leong, S.A., and Winkelmann, G. (1998) Molecular biology of  
21 iron transport in fungi. *Met Ions Biol Syst* **35**: 147–186.
- 22 Li, X.Z., Nikaido, H., and Williams, K.E. (1997) Silver-  
23 resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of  
24 Ag<sup>+</sup> and are deficient in porins. *J Bacteriol* **179**: 6127–  
25 6132.
- 26 Llamas, M.A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C.R.,  
27 Vandenbroucke-Grauls, C., and Bitter, W. (2006) The het-  
28 erologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome  
29 activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*.  
30 *J Bacteriol* **188**: 1882–1891.
- 31 Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-  
32 Grauls, C.M., Ratledge, C., and Bitter, W. (2008) Charac-  
33 terization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-  
34 surface signalling systems. *Mol Microbiol* **67**: 458–472.
- 35 Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002) The *E. coli*  
36 BtuCD structure: a framework for ABC transporter archi-  
37 tecture and mechanism. *Science* **296**: 1793–1800.
- 38 Lutkenhaus, J.F. (1977) Role of a major outer membrane  
39 protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **131**: 631–637.
- 40 Lutoretto, S., and Grdinic, V. (1986) Spectrophotometric deter-  
41 mination of vanadium(V) with desferrioxamine B. *Analyst*  
42 **111**: 1163–1165.
- 43 Matzanke, B.F., Anemuller, S., Schunemann, V., Trautwein,  
44 A.X., and Hantke, K. (2004) FhuF, part of a siderophore-  
45 reductase system. *Biochemistry* **43**: 1386–1392.
- 46 Mettrick, K.A., and Lamont, I.L. (2009) Different roles for  
47 anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of  
48 *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **74**: 1257–1271.
- 49 Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., and  
50 Reimann, C. (2005) PchR-box recognition by the AraC-  
51 type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires  
52 the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**:  
53 495–509.
- 54 Michel, L., Bachelard, A., and Reimann, C. (2007) Ferripy-  
55 ochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated  
56 signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**:  
57 1508–1518.
- 58 Mobley, H.L., Garner, R.M., and Bauerfeind, P. (1995) *Helicobacter pylori*  
59 nickel-transport gene nixA: synthesis of  
60 catalytically active urease in *Escherichia coli* independent  
61 of growth conditions. *Mol Microbiol* **16**: 97–109.
- Moll, H., Johnsson, A., Schafer, M., Pedersen, K., Budzik-  
iewicz, H., and Bernhard, G. (2008) Curium(III) complex-  
ation with pyoverdins secreted by a groundwater strain of  
*Pseudomonas fluorescens*. *Biometals* **21**: 219–228.
- Mulrooney, S.B., and Hausinger, R.P. (2003) Nickel uptake  
and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **27**:  
239–261.
- Neu, M.P., Matonic, J.H., Ruggiero, C.E., and Scott, B.L.  
(2000) Structural characterization of a Plutonium(IV)  
siderophore complex: single-crystal structure of  
Pu-Desferrioxamine E. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**:  
1442–1444.
- Neubauer, U., Nowack, B., Furrer, G., and Schulin, R. (2000)  
Heavy metal sorption on clay minerals affected by the  
siderophore desferrioxamine B. *Environ Sci Technol* **34**:  
2749–2755.
- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl*  
*Microbiol Biotechnol* **51**: 730–750.
- Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in  
prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313–339.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K.  
(2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure,  
and function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43–60.
- Olson, J.W., and Maier, R.J. (2002) Molecular hydrogen as  
an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* **298**:  
1788–1790.
- Pakchung, A.A., Soe, C.Z., Lifa, T., and Codd, R. (2011)  
Complexes formed in solution between Vanadium(IV)/(V)  
and the cyclic dihydroxamic acid putrebactin or linear sub-  
erodihydroxamic acid. *Inorg Chem* (in press).
- Postle, K., and Kadner, R.J. (2003) Touch and go: tying TonB  
to transport. *Mol Microbiol* **49**: 869–882.
- Pugsley, A.P., and Schnaitman, C.A. (1978) Outer membrane  
proteins of *Escherichia coli*. VII. Evidence that  
bacteriophage-directed protein 2 functions as a pore.  
*J Bacteriol* **133**: 1181–1189.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A., and Kim, S.S. (2003) Enterobac-  
tin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl*  
*Acad Sci USA* **100**: 3584–3588.
- Redly, G.A., and Poole, K. (2003) Pyoverdine-mediated regu-  
lation of FpvA synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*:  
involvement of a probable extracytoplasmic-function sigma  
factor, Fpvl. *J Bacteriol* **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 Fpvl and FpvR and identification of mutations in  
each compromising this interaction. *J Bacteriol* **187**: 5648–  
5657.
- Robinson, N.J. (2007) A more discerning zinc exporter. *Nat*  
*Chem Biol* **3**: 692–693.
- Rodionov, D.A., Hebbeln, P., Gelfand, M.S., and Eitinger, T.  
(2006) Comparative and functional genomic analysis of  
prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence  
for a novel group of ATP-binding cassette transporters.  
*J Bacteriol* **188**: 317–327.
- Schalk, I.J. (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-  
negative bacteria: specificities and characteristics of the  
pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* **102**: 1159–1169.
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., and Pattus, F. (2002) Recycling  
of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin

- 1 uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **41**: 1663–1671.
- 2 Schalk, I.J., Lamont, I.L., and Cobessi, D. (2009) Structure-
- 3 function relationships in the bifunctional ferrisiderophore
- 4 FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*
- 5 **22**: 671–678.
- 6 Schauer, K., Gouget, B., Carriere, M., Labigne, A., and de
- 7 Reuse, H. (2007) Novel nickel transport mechanism across
- 8 the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/
- 9 ExbD machinery. *Mol Microbiol* **63**: 1054–1068.
- 10 Shen, J., Meldrum, A., and Poole, K. (2002) FpvA receptor
- 11 involvement in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas*
- 12 *aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 3268–3275.
- 13 Shultis, D.D., Purdy, M.D., Banchs, C.N., and Wiener, M.C.
- 14 (2006) Outer membrane active transport: structure of the
- 15 BtuB:TonB complex. *Science* **312**: 1396–1399.
- 16 Staudenmaier, H., Van Hove, B., Yaraghi, Z., and Braun, V.
- 17 (1989) Nucleotide sequences of the *fecBCDE*
- 18 genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-
- 19 binding-protein-dependent transport mechanism for
- 20 iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 2626–
- 21 2633.
- 22 Stingl, K., and De Reuse, H. (2005) Staying alive overdosed:
- 23 how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int J*
- 24 *Med Microbiol* **295**: 307–315.
- 25 Stooft, J., Kuipers, E.J., Klaver, G., and van Vliet, A.H. (2010)
- 26 An ABC transporter and a TonB ortholog contribute to *Heli-*
- 27 *cobacter mustelae* nickel and cobalt acquisition. *Infect*
- 28 *Immun* **78**: 4261–4267.
- 29 Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., White-
- 30 ley, M., and Parsek, M.R. (2006) Survival and growth in the
- 31 presence of elevated copper: transcriptional profiling of
- 32 copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*
- 33 **188**: 7242–7256.
- 34 Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T. (2005) Metals, toxicity
- 35 and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**: 1161–1208.
- 36 Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N., and
- 37 Chiancone, E. (1992) Metal regulation of siderophore syn-
- 38 thesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects
- 39 of siderophore–metal complexes. *Appl Environ Microbiol*
- 40 **58**: 2886–2893.
- 41
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2002) Iron
- 42 transport and regulation, cell signalling and genomics:
- 43 lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol*
- 44 *Microbiol* **45**: 1177–1190.
- 45 Waldron, K.J., and Robinson, N.J. (2009) How do bacterial
- 46 cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat*
- 47 *Rev Microbiol* **7**: 25–35.
- 48 Wang, S.C., Dias, A.V., and Zamble, D.B. (2009) The metallo-
- 49 specific response of proteins: a perspective based on the
- 50 *Escherichia coli* transcriptional regulator NikR. *Dalton*
- 51 *Trans* **••**: 2459–2466.
- 52 Wiener, M.C. (2005) TonB-dependent outer membrane trans-
- 53 port: going for Baroque? *Curr Opin Struct Biol* **15**: 394–
- 54 400.
- 55 Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2000) Characterization of an
- 56 ECF sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*.
- 57 *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 578–583.
- 58 Wilson, M.J., McMorran, B.J., and Lamont, I.L. (2001) Analy-
- 59 sis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-
- 60 function sigma factor protein from *Pseudomonas*
- 61 *aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 2151–2155.
- 62 Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., and Schalk, I.J.
- 63 (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling
- 64 by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Report* **2**:
- 65 412–418.
- 66 Youard, Z.A., Mislin, G.L., Majcherczyk, P.A., Schalk, I.J., and
- 67 Reimann, C. (2007) *Pseudomonas fluorescens* CHA0
- 68 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the
- 69 *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *J Biol*
- 70 *Chem* **282**: 35546–35553.
- 71 Yue, W.W., Grizot, S., and Buchanan, S.K. (2003) Structural
- 72 evidence for iron-free citrate and ferric citrate binding to the
- 73 TonB-dependent outer membrane transporter FecA. *J Mol*
- 74 *Biol* **332**: 353–368.
- 75 Zambelli, B., Danielli, A., Romagnoli, S., Neyroz, P., Ciurli, S.,
- 76 and Scarlato, V. (2008) High-affinity Ni<sup>2+</sup> binding selectively
- 77 promotes binding of *Helicobacter pylori* NikR to its target
- 78 urease promoter. *J Mol Biol* **383**: 1129–1143.
- 79 Zhang, Y., Rodionov, D.A., Gelfand, M.S., and Gladyshev,
- 80 V.N. (2009) Comparative genomic analyses of nickel,
- 81 cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* **10**: 78.
- 82



## Références bibliographiques :

- Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2000) Siderophores and Iron-transport in Microorganisms. *J Chin Chem Soc*, **47**, 1-20.
- Ackerley, D.F., Caradoc-Davies, T.T. and Lamont, I.L. (2003) Substrate specificity of the nonribosomal peptide synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **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*. *J Bacteriol*, **188**, 5752-5761.
- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A. and Nakae, T. (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.R., 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.
- Albrecht-Gary, A.M. and Crumbliss, A.L. (1998) Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met Ions Biol Syst*, **35**, 239-327.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 215-237.
- Ankenbauer, R.G., Toyokuni, T., Staley, A., Rinehart, K.L., Jr. and Cox, C.D. (1988) Synthesis and biological activity of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **170**, 5344-5351.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, **2**, 2006 0008.
- Bagg, A. and Neilands, J.B. (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **26**, 5471-5477.
- Barton, H.A., Johnson, Z., Cox, C.D., Vasil, A.I. and Vasil, M.L. (1996) Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol*, **21**, 1001-1017.
- 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 Lett*, **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. *Mol Microbiol*, **47**, 195-207.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1462.
- 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*. *J Bacteriol*, **187**, 6701-6707.
- Bokhove, M., Jimenez, P.N., Quax, W.J., Dijkstra, B.W. (2010) The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 686-91.
- Boukhalfa, H. and Crumbliss, A.L. (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, **15**, 325-339.

- Boulanger, P., le Maire, M., Bonhivers, M., Dubois, S., Desmadril, M. and Letellier, L. (1996) Purification and structural and functional characterization of FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochemistry*, **35**, 14216-14224.
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Mislin, L.A.G., Schalk, I.J. and Albrecht-Gary A-M. Pyochelin a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical Characterization of the Iron(III), Copper(II) and Zinc complexes. In preparation.
- Braud, A., Geoffroy, V., Hoegy, F., Mislin, G.L. and Schalk, I. (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol Reports*, **2**, 426-432.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L. and Schalk, I.J. (2009a) The *Pseudomonas Aeruginosa* Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *J Bacteriol*, **191**, 3517-3525.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T. and Schalk, I.J. (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ Microbiol*, **5**, 1079-1091.
- Braun, M., Endriss, F., Killmann, H. and Braun, V. (2003) In vivo reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **185**, 5508-5518.
- Braun, V. and Mahren, S. (2005) Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the *Escherichia coli* Fec type. *FEMS Microbiol Rev*, **29**, 673-684.
- Braun, V. (2003) Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci*, **8**, s1409-21
- 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.
- 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. *J Biol Chem*, **267**, 12350-12355.
- Brillet, K., Reimann, C., Mislin, L.A.G., Noël, S., Rognan, D., Schalk, J.I., Cobessi, D. (2011) Pyochelin enantiomers and their membrane siderophore transporters in fluorescent *Pseudomonas*: structural bases of a unique enantiospecific recognition. In preparation.
- 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.
- Briskot, G., Taraz, K. and Budzikiewicz, H. (1986) [Pyoverdin-type siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*]. *Z Naturforsch C*, **41**, 497-506.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, **45**, 198-207.
- 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*. *Nat Struct Biol*, **6**, 56-63.
- 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.
- Bullen, J.J. (1981) The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis*, **3**, 1127-1138.
- Cai, J., Salmon, K. and DuBow, M.S. (1998) A chromosomal ars operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology*, **144** ( Pt 10), 2705-2713.
- Caille, O., Rossier, C. and Perron, K. (2007) A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **189**, 4561-4568.
- Carmel, G. and Coulton, J.W. (1991) Internal deletions in the FhuA receptor of *Escherichia coli* K-12 define domains of ligand interactions. *J Bacteriol*, **173**, 4394-4403.
- Carter, D.M., Miousse, I.R., Gagnon, J.N., Martinez, E., Clements, A., Lee, J., Hancock, M.A., Gagnon, H., Pawelek, P.D. and Coulton, J.W. (2006) Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J Biol Chem*, **281**, 35413-35424.



- Carrano, Carl J., and Kenneth, N. Raymond (1979). Ferric Ion Sequestering Agents. 2. Kinetics and Mechanism of Iron Removal From Transferrin by Enterobactin and Synthetic Triccatechols. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5401–5404.
- Chakraborty, R., Storey, E., van der Helm, D. (2007) Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of Escherichia coli. *Biometals*, **20**, 263-74
- Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. (1994) Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **58**, 390-396.
- Clarke, T.E., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L.W. and Vogel, H.J. (2002a) X-ray crystallographic structures of the Escherichia coli periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J Biol Chem*, **277**, 13966-13972.
- Clarke, T.E., Rohrbach, M.R., Tari, L.W., Vogel, H.J. and Koster, W. (2002b) Ferric hydroxamate binding protein FhuD from Escherichia coli: mutants in conserved and non-conserved regions. *Biometals*, **15**, 121-131.
- Clement, E., Mesini, P.J., Pattus, F. 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., Celia, H., Folschweiller, N., Schalk, I.J., Abdallah, M.A. and Pattus, F. (2005a) The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpvA from Pseudomonas aeruginosa at 3.6 angstroms resolution. *J Mol Biol*, **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. *J Mol Biol*, **352**, 893-904.
- Cooksey, D.A. (1994) Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **14**, 381-386.
- Cornelis, P., Hohnadel, D. and Meyer, J.M. (1989) Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among Pseudomonas aeruginosa strains. *Infect Immun*, **57**, 3491-3497.
- Cornelis, P. and Matthijs, S. (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol*, **4**, 787-798.
- Coulton, J.W., Mason, P. and Allatt, D.D. (1987) fhuC and fhuD genes for iron (III)-ferrichrome transport into Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, **169**, 3844-3849.
- Cox, C.D. (1980) Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, **142**, 581-587.
- Cox, C.D. and Graham, R. (1979) Isolation of an iron-binding compound from Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, **137**, 357-364.
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Jr., Moore, M.L. and Cook, J.C., Jr. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 4256-4260.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev*, **53**, 517-530.
- 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. *J Bacteriol*, **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. *J Bacteriol*, **189**, 284-287.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T., Dell, A., and Abdallah, M.A. (1990) Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of Pseudomonas aeruginosa ATCC15692. *Biol Metals*, 155-170.
- Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Thomas, X., Djediat, C., Rebuffat, S. (2006) Parasitism of iron-siderophore receptors of Escherichia coli by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *Biometals*, **19**, 181-91
- Davidson, A.L. and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **73**, 241-268.

- Dean, C.R., Neshat, S. and Poole, K. (1996) PfeR, an enterobactin-responsive activator of ferric enterobactin receptor gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **178**, 5361-5369.
- Dean, C.R. and Poole, K. (1993) Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (pfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **175**, 317-324.
- Dougherty, M.J. and Downs, D.M. (2006) A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*. *Microbiology*, **152**, 2345-2353.
- 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. *J Biol Chem*, **280**, 30574-30580.
- Enz, S., Mahren, S., Stroehler, U.H. and Braun, V. (2000) Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol*, **182**, 637-646.
- Escobar, L., Perez-Martin, J. and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol*, **181**, 6223-6229.
- Evers, A., Hancock, R., Martell, A. and Motekaitis, R. (1989) Metal ion recognition in ligands with negatively charged oxygen donor groups. Complexation of Fe(III), Ga(III), In(III), Al(III) and other highly charged metal ions. *Inorg. Chem*, **28**, 2189-2195.
- Expert, D., Enard, C. and Masclaux, C. (1996) The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, **4**, 232-237.
- Faraldo-Gomez, J.D. and Sansom, M.S. (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 105-116.
- 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.
- Fecker, L. and Braun, V. (1983) Cloning and expression of the fhu genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **156**, 1301-1314.
- 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*, **282**, 2215-2220.
- Fleming, T.P., Nahlik, M.S., Neilands, J.B., McIntosh, M.A. (1985) Physical and genetic characterization of cloned enterobactin genomic sequences from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **34**, 47-54.
- 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., 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**, 14591-601.
- Fujita, M., Tanaka, K., Takahashi, H., Amemura, A. (1994) Transcription of the principal sigma-factor genes, rpoD and rpoS, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol Microbiol*, **13**, 1071-7.
- 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.
- Gaille, C., Kast, P. and Haas, D. (2002) Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *J Biol Chem*, **277**, 21768-21775.
- Gaille, C., Reimann, C. and Haas, D. (2003) Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **278**, 16893-16898.

- Ge, L., Seah, S.Y. (2006) Heterologous expression, purification, and characterization of an l-ornithine N(5)-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **188**, 7205-10.
- Gehring, A.M., Bradley, K.A. and Walsh, C.T. (1997) Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, **36**, 8495-8503.
- 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*, **150**, 1671-1680.
- Ghysels, B., Ochsner, U., Mollman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P. and Matthijs, S. (2005) The *Pseudomonas aeruginosa* pirA gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiol Lett*, **246**, 167-174.
- 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. *J Biol Chem*, **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. *Mol Microbiol*, **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. *J Bacteriol*, **20**, 6548-6558.
- Gumbart, J., Wiener, M.C., Tajkhorshid, E. (2007) Mechanics of force propagation in TonB-dependent outer membrane transport. *Biophys J*, **93**, 496-504.
- Hantke, K. (1978) Major outer membrane proteins of *E. coli* K12 serve as receptors for the phages T2 (protein Ia) and 434 (protein Ib). *Mol Gen Genet*, **164**, 131-135.
- Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 172-177.
- Hantke, K. and Braun, V. (1978) Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **135**, 190-197.
- Harnett, N.M. and Gyles, C.L. (1984) Resistance to drugs and heavy metals, colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, **48**, 930-935.
- Hartman, A. and Braun, V. (1980) Iron transport in *Escherichia coli*: uptake and modification of ferrichrome. *J Bacteriol*, **143**, 246-255.
- Hassan, M.T., van der Lelie, D., Springael, D., Romling, U., Ahmed, N. and Mergeay, M. (1999) Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, **238**, 417-425.
- Heinrichs, D.E. and Poole, K. (1993) Cloning and sequence analysis of a gene (*pchR*) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **175**, 5882-5889.
- Heinrichs, D.E. and Poole, K. (1996) PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (*fptA*) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *J Bacteriol*, **178**, 2586-2592.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol*, **46**, 47-110.
- Hernlem, B.J., Vane, L.M. and Sayles, G.D. (1996) Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chimica Acta*, **244**, 179-184.
- Hoch, J.A. Two-component and phosphorelay signal transduction. (2000) *Curr Opin Microbiol*, **3**: 165-70.
- 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*. *J Biol Chem*, **280**, 20222-20230.

- Hoegy, F., Lee, X., Noel, S., Rognan, D., Mislin, G.L., Reimmann, C. and Schalk, I.J. (2009) Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent Pseudomonads. *J Biol Chem*, **234**, 14949-14957.
- Hohlneicher, U., Schafer, M., Fuchs, R. and Budzikiewicz, H. (2001) Ferribactins as the biosynthetic precursors of the Pseudomonas siderophores pyoverdins. *Z Naturforsch C*, **56**, 308-310.
- Huang, B., Ru, K., Yuan, Z., Whitchurch, C.B. and Mattick, J.S. (2004) tonB3 is required for normal twitching motility and extracellular assembly of type IV pili. *J Bacteriol*, **186**, 4387-4389.
- 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. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 1190-1197.
- Hughes, K.T. and Mathee, K. (1998) The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, **52**, 231-286.
- Imbert, M. and Blondeau, R. (1998) On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol*, **37**, 64-66.
- Imperi, F., Tiburzi, F. and Visca, P. (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **148**, 20440-20445.
- Jacques, P., Ongena, M., Bernard, F., Fuchs, R., Budzikiewicz, H. and Thonart, P. (2003) Fluorescent Pseudomonas mainly produce the dihydro form of pyoverdine at low specific growth rate. *Lett Appl Microbiol*, **36**, 259-262.
- Kampfenkel, K. and Braun, V. (1992) Membrane topology of the Escherichia coli ExbD protein. *J Bacteriol*, **174**, 5485-5487.
- Kampfenkel, K. and Braun, V. (1993) Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **268**, 6050-6057.
- Koster, W. (1991) Iron(III) hydroxamate transport across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *Biol Met*, **4**, 23-32.
- Koster, W. and Braun, V. (1990) Iron (III) hydroxamate transport into Escherichia coli. Substrate binding to the periplasmic FhuD protein. *J Biol Chem*, **265**, 21407-21410.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7072-7077.
- Lamont, I.L., Konings, A.F. and Reid, D.W. (2009) Iron acquisition by Pseudomonas aeruginosa in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Biometals*, **22**, 53-60.
- Lamont, I.L. and Martin, L.W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, **149**, 833-842.
- 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 Microbiol Lett*, **190**, 141-146.
- Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V. and Visca, P. (2000) Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa. *J Bacteriol*, **182**, 1481-1491.
- Letain, T.E., Postle, K. (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **24**, 271-83.
- Letoffe, S., Deniau, C., Wolff, N., Dassa, E., Delepelaire, P., Lacroisey, A. and Wandersman, C. (2001) Haemophore-mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol*, **41**, 439-450.
- 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.
- Llamas, M.A., Mooij, M.J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Ratledge, C., Bitter, W. (2008) Characterization of five novel Pseudomonas aeruginosa cell-surface signalling systems. *Mol Microbiol*, **67**, 458-72.
- 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. *J Bacteriol*, **188**, 1882-1891.

- 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.
- Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D.C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massis, L.M., Ferreira, L.C., Newton, S.M. and Klebba, P.E. (2007) Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *J Biol Chem*, **282**, 397-406.
- Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J.M. and Poole, K. (2009) Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter. *Microbiology*, **155**, 305-315.
- 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.
- Matzanke, B.F., Muller, G.I., Raymond, K.N. (1984) Hydroxamate siderophore mediated iron uptake in *E. coli*: stereospecific recognition of ferric rhodotorulic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, **121**, 922-30.
- McMorran, B.J., Kumara, H.M., Sullivan, K., Lamont, I.L. (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **147**, 1517-24.
- 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. *J Bacteriol*, **177**, 252-258.
- Mettrick, K.A., Lamont, I.L. (2009) Different roles for anti-sigma factors in siderophore signalling pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, **74**, 1257-1271.
- Meyer, J.M. (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, **174**, 135-142.
- 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. *Biomaterials*, **21**, 259-271.
- Michel, L., Bachelard, A. and Reimann, C. (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **153**, 1508-1518.
- 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. *Mol Microbiol*, **58**, 495-509.
- 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*. *J Mol Biol*, **357**, 1437-1448.
- Missiakas, D. and Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol*, **28**, 1059-1066.
- Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernandez, D.U., Schafer, M., Ravel, J. and 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., 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.
- Nader, M., Journet, L., Meksem, A., Guillon, L., Schalk, I.J. (2011) Mechanism of Ferripyoverdine Uptake by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Transporter FpvA: No Diffusion Channel Formed at Any Time during Ferrisiderophore Uptake. *Biochemistry*, **50**, 2530-40
- Nakahara, H., Ishikawa, T., Sarai, Y. and Kondo, I. (1977) Distribution of resistances to metals and antibiotics of staphylococcal strains in Japan. *Zentralbl Bakteriol Orig A*, **237**, 470-476.
- Neubauer U., Nowack B., Furrer G. and Schulin R. (2000) Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environmental science & technology*, **34**, 2749-2755.
- Nies, D.H. (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*, **27**, 17-28.

- Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**, 730-750.
- Nies, D.H. and Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol*, **14**, 186-199.
- Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K. and Silver, S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3544-3548.
- Ochsner, U.A., Vasil, A.I. and Vasil, M.L. (1995) Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J Bacteriol*, **177**, 7194-7201.
- Ochsner, U.A. and Vasil, M.L. (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4409-4414.
- 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.
- Okamura, M.Y., Isaacson, R.A. and Feher, G. (1975) Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3491-3495.
- Ozenberger, B.A., Nahlik, M.S. and McIntosh, M.A. (1987) Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **169**, 3638-3646.
- Patel, P.C., Goulhen, F., Boothman, C., Gault, A.G., Charnock, J.M., Kalia, K. and Lloyd, J.R. (2007) Arsenate detoxification in a *Pseudomonad* hypertolerant to arsenic. *Arch Microbiol*, **187**, 171-183.
- Patzer, S.I. and Hantke, K. (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **28**, 1199-1210.
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Saier, M.H., Jr. (1998) Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol*, **277**, 573-92.
- 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*, **312**, 1399-1402.
- Perez, A., Canle, D., Latasa, C., Poza, M., Beceiro, A., Tomas Mdel, M., Fernandez, A., Mallo, S., Perez, S., Molina, F., Villanueva, R., Lasa, I. and Bou, G. (2007) Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 3247-3253.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.L. and Kohler, T. (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **279**, 8761-8768.
- Pitt, T.L. (1986) Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis. *J R Soc Med*, **79 Suppl 12**, 13-18.
- Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. and Vasil, M.L. (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol*, **47**, 903-915.
- 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. *Mol Microbiol*, **10**, 529-544.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C. and Neshat, S. (1993b) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol*, **175**, 7363-7372.
- 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.
- Posey, J.E. and Gherardini, F.C. (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, **288**, 1651-1653.

- Posey, J.E., Hardham, J.M., Norris, S.J. and Gherardini, F.C. (1999) Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10887-10892.
- Postle, K. and Kadner, R.J. (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol*, **49**, 869-882.
- Pugsley, A.P., Reeves, P. (1976) Characterization of group B colicin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12: colicin resistance and the role of enterochelin. *J Bacteriol*, **127**, 218-28.
- Pugsley, A.P. and Reeves, P. (1977) Uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli*: energy dependent stage of uptake. *J Bacteriol*, **130**, 26-36.
- Quadri, L.E., Keating, T.A., Patel, H.M. and Walsh, C.T. (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4, 2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PchE, and PchF. *Biochemistry*, **38**, 14941-14954.
- Ratledge, C. and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 881-941.
- Ravel, J. and Cornelis, P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol*, **11**, 195-200.
- Raymond, K.N. and Carrano, C.J. (1979) Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.*, **12**, 183-190.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A. and Kim, S.S. (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **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. *J Bacteriol*, **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. *J Bacteriol*, **187**, 5648-5657.
- Reichert, J., Sakaitani, M. and Walsh, C.T. (1992) Characterization of EntF as a serine-activating enzyme. *Protein Sci*, **1**, 549-556.
- 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.
- Reimann, C., Patel, H.M., Walsh, C.T. and Haas, D. (2004) PchC thioesterase optimizes nonribosomal biosynthesis of the peptide siderophore pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **186**, 6367-6373.
- Rosen, B.P. (1999) The role of efflux in bacterial resistance to soft metals and metalloids. *Essays Biochem*, **34**, 1-15.
- Ruangviriyachai, C., Fernandez, D.U., Fuchs, R., Meyer, J.M. and Budzikiewicz, H. (2001) A new pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* R'. *Z Naturforsch C*, **56**, 933-938.
- Sauter, A., Howard, S.P. and Braun, V. (2003) In vivo evidence for TonB dimerization. *J Bacteriol*, **185**, 5747-5754.
- Schafer, G., Purschke, W.G., Gleissner, M. and Schmidt, C.L. (1996) Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 16-20.
- 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.
- 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., 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., Lamont, I.L. and Cobessi, D. (2009) Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomaterials*, **22**, 671-678.

- Schons, V., Atkinson, R.A., Dugave, C., Graff, R., Mislin, G.L., Rochet, L., Hennard, C., Kieffer, B., Abdallah, M.A. and Schalk, I.J. (2005) The structure-activity relationship of ferric pyoverdine bound to its outer membrane transporter: implications for the mechanism of iron uptake. *Biochemistry*, **44**, 14069-14079.
- Schweizer, H.P., Hoang, T.T., Propst, K.L., Ornelas, H.R. and Karkhoff-Schweizer, R.R. (2001) Vector design and development of host systems for *Pseudomonas*. *Genet Eng*, **23**, 69-81.
- Seeger, M.A. and van Veen, H.W. (2009) Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*, **1794**, 725-737.
- Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C. and Walsh, C.T. (1999) Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol*, **6**, 385-400.
- Shirley, M. and Lamont, I.L. (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **191**, 5634-5640.
- 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. *Infect Immun*, **74**, 1673-1682.
- Sriyosachati, S., Cox, C. D. (1986) Siderophore-mediated iron acquisition from transferrin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **52**, 885-91.
- 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., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959-964.
- Stryer, L. and Haugland, R.P. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 719-726.
- Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. and Otani, T. (2000a) Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, **68**, 1834-1839.
- Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. and Otani, T. (2000b) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* tonB gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun*, **68**, 4498-4504.
- 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.
- Usher, K.C., Ozkan, E., Gardner, K.H. and Deisenhofer, J. (2001) The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from *Escherichia coli*, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10676-10681.
- Vandenende, C.S., Vlasschaert, M. and Seah, S.Y. (2004) Functional characterization of an aminotransferase required for pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, **186**, 5596-5602.
- Vasil, M.L. (2007) How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. *Biometals*, **20**, 587-601.
- Visca, P., Colotti, G., Serino, L., Verzili, D., Orsi, N. and Chiancone, E. (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 2886-2893.
- Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol*, **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*. *Mol Microbiol*, **45**, 1177-1190.
- 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. *J Bacteriol*, **188**, 3317-3323.



- Wandersman, C. and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, **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.
- 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. *J Bacteriol*, **188**, 1935-1942.
- 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.
- 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. *J Mol Biol*, **368**, 398-406.
- Xu, Y., Sim, S.H., Nam, K.H., Jin, X.L., Kim, H.M., Hwang, K.Y., Lee, K. and Ha, N.C. (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*, **38**, 1447-1459.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L. and Schalk, I. (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Reports*, **2**, 412-418.
- Youard, Z.A., Mislin, G.L., Majcherczyk, P.A., Schalk, I.J. and Reimmann, C. (2007) *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *J Biol Chem*, **282**, 35546-35553.
- 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. *J Mol Biol*, **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., Lee, K. and Ha, N.C. (2009) Crystal structure of the periplasmic component of a tripartite macrolide-specific efflux pump. *J Mol Biol*, **387**, 1286-1297.
- Zhao, Q. and Poole, K. (2000) A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes. *FEMS Microbiol Lett*, **184**, 127-132.
- Zhao, Q. and Poole, K. (2002) Mutational analysis of the TonB1 energy coupler of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **184**, 1503-1513.
- 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.



## Résumé

Le fer est un élément essentiel à la croissance de la plupart des organismes vivants. Malgré sa forte abondance au niveau de la croûte terrestre, le fer présente une faible biodisponibilité à pH physiologique. Afin de contourner ce problème, de nombreux micro-organismes produisent et sécrètent des sidérophores, de petites molécules ayant une forte affinité pour le fer. *Pseudomonas aeruginosa* produit en condition de carence en fer, deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline. Ces deux voies d'acquisition du fer impliquent de nombreuses protéines intervenant dans la biosynthèse des sidérophores, dans leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, dans l'acquisition du fer par les sidérophores et dans la régulation de l'ensemble de ces deux systèmes.

Durant cette thèse, nous avons étudié l'implication de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ dans la sécrétion de la Pvd néo-synthétisée. De précédentes études avaient déjà montré que cette pompe à efflux de type ATP intervenait dans le recyclage de la Pvd vers le milieu extracellulaire après dissociation du complexe Pvd-Fe dans le périplasma bactérien. Par des approches de biologie moléculaire et cellulaire (microscopie à fluorescence et fractionnement cellulaire) et en utilisant les propriétés de fluorescence de la Pvd, nous avons pu montrer que cette pompe était aussi impliquée dans la sécrétion de la Pvd nouvellement synthétisée. Tout en utilisant toujours la même approche, nous avons également pu mettre en évidence que cette pompe contrôle la sélectivité vis-à-vis du fer de la voie Pvd. En effet, la Pvd dans le milieu extracellulaire peut chélater de nombreux métaux autre que le fer. Nous avons montré par ICP-AES, que ces différents complexes Pvd-métaux peuvent être transportés à travers la membrane externe par le récepteur FpvA. Mais, tous les complexes Pvd-métaux autre que le complexe Pvd-Fe sont immédiatement réexcrétés par PvdRT-OpmQ. En absence de PvdRRT-OpmQ, tous les complexes Pvd-métaux incubés en présence de *P. aeruginosa* s'accumulent dans le périplasma de la bactérie.

Nous avons également essayé de comprendre les mécanismes impliqués dans le transport du complexe Pvd-Fe à travers la membrane externe par FpvA, après formation du complexe ferrisidérophore dans le milieu extracellulaire. FpvA est composé de deux domaines : un tonneau beta composé de 22 brins et un domaine globulaire qui obture le pore du tonneau. Nous avons essayé de comprendre comment se forme un canal dans ce type de structure pour permettre le passage de Pvd-Fe. Pour cette étude, nous avons utilisé les propriétés de fluorescence de la Pvd ainsi que sa capacité à faire du FRET avec les tryptophanes des protéines. FpvA possède 17 Trps dans sa séquence, mais ils sont tous localisés dans le domaine en tonneau beta. Dans cette étude, nous avons inséré, par mutagenèse dirigée, des tryptophanes dans le bouchon du récepteur afin de suivre les interactions entre ce domaine et Pvd-Fe durant le transport.

Enfin, nous avons étudié l'acquisition du fer par le desferrichrome chez *P. aeruginosa*. Très peu de choses étaient connues au sujet de cette voie chez cette bactérie. Seul, le récepteur présent au niveau de la membrane externe avait été identifié par des études protéomiques. En utilisant des mutants ponctuels issus de la collection de Washington, nous avons pu clairement identifier les transporteurs de la membrane externe et interne impliqués dans cette voie, ainsi qu'une enzyme intervenant dans la dissociation du complexe ferrichrome-fer dans le cytoplasme. Un analogue fluorescent du ferrichrome a aussi été utilisé afin d'effectuer toute les cinétiques de dissociation avec les outils de fluorescence couramment utilisés au laboratoire.