

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**UMR7242 – Biotechnologie et signalisation cellulaire**

**THÈSE** présentée par :

**Anne BONNEAU**

soutenue le : 23 Septembre 2020

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science du Vivant

**Mécanismes moléculaires impliqués dans  
l'import du fer par la pyoverdine chez  
*Pseudomonas aeruginosa***

**THÈSE dirigée par :**

**Mme SCHALK Isabelle**

Docteure, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr PICARD Martin**

**Mr ARNOUX Pascal**

Docteur, Université de Paris-Diderot

Docteur, Université d'Aix-Marseille

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme SEEMANN Myriam**

**Mme BLEVES Sophie**

Docteure, Université de Strasbourg

Professeure, Université d'Aix-Marseille



## Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du Jury, le Dr Martin Picard, le Dr Pascal Arnoux, le Pr Sophie Bleves et le Dr Myriam Seemann pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier le Dr. Jean-Luc Galzi, directeur de l'unité Biotechnologie et Signalisation Cellulaire (BSC) de m'avoir accueillie au sein de l'unité.

Je remercie le Dr Isabelle Schalk d'avoir accepté de m'accueillir dans l'équipe MMBCA « Métaux et Microorganisme : Biologie, Chimie et Application » et d'avoir accepté de m'encadrer tout au long de cette thèse. Merci pour le temps que tu m'as accordé ainsi que pour tes conseils.

Je remercie le Dr Gaëtan Mislin pour m'avoir également acceptée dans l'équipe MMBCA et pour savoir répondre à toutes les questions « chimie » concernant nos travaux de microbiologistes.

Je remercie de tout mon cœur le Dr Béatrice Roche qui a été à mes côtés durant mon Master ainsi que pour ma première année de thèse et qui a continué à m'épauler après avoir quitté l'équipe. Tu m'as appris tellement de choses. Tu as toujours eu confiance en moi et je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour ma thèse ainsi que pour le temps que tu as sacrifié durant ton post-doctorat pour moi. Équipe de Winneuse !

Je remercie les membres de l'équipe MMBCA. Merci à Seb, Gwen et Sarah, mes petites commères, d'avoir égayé mes journées. Vous êtes de belles personnes et je vous souhaite que du bon pour la suite. Je garderai de magnifiques souvenirs de nos 2 ans et demi ensemble. Vous allez vraiment me manquer ! Merci à Quentin pour toutes les pauses café bien agréables que nous avons partagé ensemble. Merci à Basma d'avoir apporté le soleil dans notre bureau pour un trop court temps à mon goût. Merci à Anne F pour les conseils que tu as pu me donner et ton aide pour certaines manip. Merci aux autres membres de l'équipe, Pierre, Coraline, Aline, Vincent, Véronique, Françoise et Elora ; ainsi qu'aux différents stagiaires qui sont passés chez nous : Petit Seb, Josh, Agathe et Marion.

Je remercie ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien indéniab le durant ces 3 années.

Enfin, je dédie cette thèse à toi, Kévin. Je pense que ce manuscrit n'existerait pas si tu n'avais pas été là. Merci de tout cœur de m'avoir supporté et de m'avoir aidé lors des (trop) nombreuses fois où j'ai voulu tout arrêter. J'ai été trop souvent démunie et perdue mais tu as été là et je ne l'oublierai jamais.



"Because in the end, you won't remember the time you spent working in the office or mowing your lawn. Climb that goddamn mountain."

-Jack Kerouac, *The Dharma Bums*

# Table des matières

Introduction.....	-1-
Partie I : Synthèse bibliographique.....	- 2 -
Chapitre I : .....	- 4 -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	- 4 -
I) Généralités chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	- 5 -
a. Généralités .....	- 5 -
b. Définition du biofilm .....	- 7 -
c. Infection à <i>P. aeruginosa</i> : exemple de la mucoviscidose .....	- 8 -
II) Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 9 -
a. Facteurs d'adhérence et de mobilité.....	- 9 -
b. Facteurs de colonisation .....	- 9 -
c. Les systèmes de sécrétion .....	- 10 -
d. Les facteurs de virulence lors de l'infection chronique .....	- 12 -
III) <i>P. aeruginosa</i> et résistance aux antibiotiques.....	- 13 -
Chapitre II.....	- 16 -
Acquisition du fer chez les bactéries à Gram négatif.....	- 16 -
I) Le fer .....	- 17 -
a. Importance du fer dans la vie cellulaire .....	- 17 -
b. Paradoxe de la biodisponibilité du fer.....	- 17 -
II) Acquisition du fer par les sidérophores .....	- 18 -
a. Les sidérophores .....	- 18 -
b. Synthèse des sidérophores .....	- 19 -
III) Import des complexes sidérophores-fer au travers des membranes bactériennes.....	- 20 -
a. Import du fer par les sidérophores.....	- 20 -
b. Transporteurs TonB dépendant (TBDTs).....	- 21 -
c. Le complexe TonB-ExbB-ExbD .....	- 22 -
d. Transporteurs ABC.....	- 24 -
e. Transport à travers les perméases.....	- 25 -
IV) Mécanismes de dissociation des complexes sidérophores-Fer .....	- 25 -
Chapitre III.....	- 30 -
Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores endogènes chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 30 -
I) La voie pyoverdine .....	- 32 -
a. Structure de la pyoverdine.....	- 32 -
b. Synthèse et sécrétion de la PvdI .....	- 35 -
1. Biosynthèse du précurseur de la PvdI.....	- 35 -
2. Synthèse des acides aminés atypiques .....	- 36 -
3. Transport et maturation dans le périplasme.....	- 37 -
4. Sécrétion dans le milieu extracellulaire .....	- 37 -
c. Import du fer par la PvdI au travers de la membrane externe .....	- 39 -
1. Implication des transporteurs FpvA et FpvB .....	- 39 -
2. Le site de liaison de PvdI-Fe sur FpvA.....	- 41 -
d. Mécanisme de dissociation du fer de la PvdI chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 42 -
1. Rôle de FpvC .....	- 44 -
2. Rôle de FpvF .....	- 45 -
3. Transport à travers la membrane interne par FpvDE.....	- 45 -
4. Rôles de FpvGHJK.....	- 46 -
e. Import des autres métaux par la PvdI.....	- 47 -
II) La voie pyochéline.....	- 48 -
a. Structure de la pyochéline .....	- 48 -
b. Synthèse de la pyochéline.....	- 48 -
c. Import du fer par la pyochéline .....	- 49 -

Chapitre IV .....	- 52 -
Autres mécanismes d'acquisition du fer chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 52 -
I) Acquisition du fer par les sidérophores exogènes .....	- 53 -
a. Voie Entérobactine .....	- 54 -
b. Voie des Hydroxamates.....	- 55 -
c. Voie Vibriobactine.....	- 56 -
d. Citrate .....	- 56 -
II) Voies d'acquisition du fer n'impliquant pas les sidérophores .....	- 57 -
a. Acquisition du fer par la molécule d'hème .....	- 57 -
b. Le système Feo .....	- 58 -
c. Les phénazines.....	- 58 -
III) Import du fer en conditions d'infections (cas de la mucoviscidose).....	- 59 -
Chapitre V .....	- 62 -
Régulation de l'homéostasie du fer chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 62 -
I) Régulation par la protéine Fur .....	- 63 -
II) Boucles d'auto-inductions .....	- 64 -
a. Facteur sigma/anti sigma.....	- 64 -
b. Régulateurs types AraC.....	- 67 -
c. Régulation par les systèmes à deux composantes .....	- 69 -
d. Autres types de régulateurs impliqués dans l'homéostasie du fer.....	- 69 -
III) Régulation par les petits ARN .....	- 69 -
a. prrF1 et prrF2.....	- 70 -
b. PrrH .....	- 70 -
IV) Interconnexion entre régulation de l'homéostasie du fer et d'autres systèmes :	
exemple de la PvdI .....	- 71 -
a. Voie PvdI et facteurs sigma extra-cytoplasmique.....	- 71 -
b. Relation de la voie PvdI avec le quorum sensing .....	- 72 -
V) Adaptation phénotypique de <i>P. aeruginosa</i> en présence d'exo-sidérophores .....	- 74 -
VI) Stockage du fer dans la cellule .....	- 75 -
Objectifs de la thèse .....	- 76 -
Partie II : .....	- 78 -
Résultats.....	- 78 -
Chapitre VI : .....	- 80 -
Réseau d'interactions des protéines impliquées dans la dissociation de PvdI-Fe .	80
-	
I) Introduction .....	- 81 -
II) Résultats : .....	- 81 -
III) Résultats complémentaires (non publiés).....	- 82 -
a. Multimérisation de FpvG.....	- 82 -
b. Interactions des protéines FpvD et FpvE.....	- 82 -
IV) Conclusions et perspectives .....	- 83 -
Chapitre VII : .....	- 86 -
Étude du mécanisme de dissociation du complexe PvdI-Fe .....	- 86 -
I) Introduction .....	- 87 -
II) Résultats.....	- 87 -
a. Étude structurale par microscopie électronique du complexe FpvG-FpvH.....	- 87 -
b. Implication du complexe FpvG-FpvH dans la dissociation du fer de la PvdI .....	- 90 -
c. De l'hème est associé au complexe FpvG-FpvH.....	- 92 -
d. Implication de 4 résidus d'histidine conservés de FpvG dans la dissociation de fer de la PvdI - 94 -	
1. Parallèle avec d'autres voies d'import du fer par des sidérophores.....	- 94 -
2. Implication des 4 résidus histidine.....	- 97 -
e. Fixation de l'hème sur FpvG, FpvH et FpvG <sub>mut</sub> .....	- 99 -

f.	Interaction du mutant FpvG <sub>mut</sub> avec FpvH, FpvC et FpvJ .....	- 101 -
<b>III)</b>	<b>Discussion et perspectives</b> .....	<b>- 102 -</b>
<b>Chapitre VIII :</b> .....		<b>- 108 -</b>
<b>Sécrétion de la PvdI</b> .....		<b>- 108 -</b>
<b>I)</b>	<b>Protéines interagissant avec FpvG</b> .....	<b>- 109 -</b>
a.	Recherche de potentiels partenaires de la réductase FpvG.....	- 109 -
b.	Le H2-T6SS.....	- 111 -
<b>II)</b>	<b>Le système H2-T6SS et sa possible implication dans la sécrétion de PvdI</b> .....	<b>- 113 -</b>
a.	Génération des mutants .....	- 113 -
b.	Effet de la mutation clpV2 sur la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée.....	- 114 -
c.	Effet de la mutation clpV2 sur l'accumulation de fluorescence dans le périplasme de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 117 -
d.	Effet de la mutation clpV2 sur le recyclage de la PvdI.....	- 118 -
e.	Tests de sécrétion de Pvd dans des cellules cibles. ....	- 120 -
1.	Test d'infection avec les cellules épithéliales A549.....	- 120 -
2.	<i>P. aeruginosa</i> incubée avec des cellules d' <i>E. coli</i> .....	- 121 -
<b>III)</b>	<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>- 123 -</b>
<b>Partie III :</b> .....		<b>- 126 -</b>
<b>Conclusion générale</b> .....		<b>- 126 -</b>
<b>Partie IV :</b> .....		<b>- 132 -</b>
<b>Matériels et Méthodes</b> .....		<b>- 132 -</b>
<b>I)</b>	<b>Milieux de culture et conditions de culture</b> .....	<b>- 133 -</b>
a.	Milieux pour culture bactérienne.....	- 133 -
1.	Composition des milieux de culture et antibiotiques utilisés .....	- 133 -
2.	Carencer en fer des souches de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 133 -
b.	Milieu pour cellules eucaryotes.....	- 133 -
c.	Suivi de la croissance cellulaire.....	- 134 -
<b>II)</b>	<b>Suivi et mesures de fluorescence</b> .....	<b>- 134 -</b>
a.	Sécrétion de PvdI dans le surnageant cellulaire.....	- 134 -
b.	Mesure de la fluorescence liée à la PvdI dans le cytoplasme et périplasme de cellules de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 134 -
c.	Suivi du recyclage de la PvdI dans le surnageant cellulaire.....	- 135 -
d.	Suivi de la dissociation de PvdI-Fe in vitro .....	- 135 -
e.	Suivi de la dissociation de PvdI-Fe in vivo.....	- 135 -
f.	Test d'infection des cellules eucaryotes .....	- 136 -
<b>III)</b>	<b>Microscopie de fluorescence</b> .....	<b>- 136 -</b>
a.	Fluorescence des cellules de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 136 -
b.	Test d'infection avec des cellules d' <i>E. coli</i> -mCherry.....	- 137 -
<b>IV)</b>	<b>Test de double hybride bactérien</b> .....	<b>- 137 -</b>
a.	Interactions entre protéines membranaires (protocole « milieu solide ») .....	- 137 -
b.	Interactions entre protéines périplasmiques (protocole « milieu liquide »).....	- 137 -
c.	Dosage de la $\beta$ -galactosidase .....	- 138 -
d.	Criblage de la banque d'ADN génomique de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 par double hybride bactérien.....	- 138 -
<b>V)</b>	<b>Expression, solubilisation, purification et étude structurale des protéines</b> .....	<b>- 139 -</b>
a.	Test de production des protéines .....	- 139 -
b.	Test de solubilisation .....	- 140 -
c.	Purifications des protéines FpvG-FpvH.....	- 140 -
d.	Microscopie électronique sur le complexe FpvG-FpvH .....	- 141 -
<b>VI)</b>	<b>Fractionnement cellulaire des cellules d'<i>E. coli</i></b> .....	<b>- 142 -</b>
a.	Préparation des fractions périplasmiques d' <i>E. coli</i> .....	- 142 -
b.	Préparation des membranes internes d' <i>E. coli</i> .....	- 142 -
<b>VII)</b>	<b>Tests d'interactions protéiques (approche biochimique)</b> .....	<b>- 142 -</b>
a.	Cross-linking (FpvG).....	- 142 -
b.	Co-immunoprécipitation.....	- 143 -
<b>VIII)</b>	<b>Révélation de la molécule d'hème sur le complexe FpvG-FpvH</b> .....	<b>- 143 -</b>



a.	Marquage au TMBZ.....	- 143 -
b.	Co-immunoprécipitation avec les billes d'hémimine-agarose.....	- 143 -
<b>IX)</b>	<b>Biologie moléculaire</b> .....	<b>- 144 -</b>
a.	Préparation d'ADN.....	- 144 -
b.	Clonage dans les vecteurs d'expression ou de double hybride .....	- 144 -
c.	Préparation d'ADN et clonage dans les vecteurs suicide pEXG2 pour déléter des gènes dans le chromosome .....	- 145 -
d.	Délétion de gènes chez <i>P. aeruginosa</i> par conjugaison .....	- 145 -
<b>X)</b>	<b>Traitement des données</b> .....	<b>- 146 -</b>
	<b>Annexes du Matériels et Méthodes</b> .....	<b>- 147 -</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>- 152 -</b>

## Liste des Figures

<b>Partie I : Synthèse bibliographique (Chapitres I à V).....</b>	<b>- 2 -</b>
Figure n°1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 et différents pigments produits par les <i>Pseudomonas</i> .....	- 5 -
Figure n°2 : Représentation circulaire du génome de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 6 -
Figure n°3 : Schéma simplifié de la formation d'un biofilm .....	- 8 -
Figure n°4 : Représentation schématique et simplifiée des 5 systèmes de sécrétion présents chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 11 -
Figure n°5 : Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries.....	- 14 -
Figure n°6 : Réaction de Fenton.....	-18 -
Figure n°7 : Exemples de structures des sidérophores .....	-19 -
Figure n°8 : Schéma général de l'acquisition du fer par les sidérophores chez une bactérie à Gram négatif .....	-20 -
Figure n°9 : Structure du complexe ExbB/ExbD. ....	-23 -
Figure n°10 : Représentation schématique du transport des sidérophores via la membrane interne par les transporteurs ABC.....	- 25 -
Figure n° 11 : Structure du chromophore de type dihydroquinoline présent chez toutes les Pvds .....	- 32 -
Figure n°12 : Les quatre différentes Pvds produites par <i>P. aeruginosa</i> .....	- 34 -
Figure n° 13 : Structure de la PvdI produite par <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	- 34 -
Figure n°14 : Organisation génomique du locus Pvd chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	- 35 -
Figure n° 15 : Biosynthèse de la PvdI dans le cytoplasme et enzymes impliqués.....	- 36 -
Figure n° 16 : Biosynthèse, maturation et sécrétion de la PvdI chez <i>P. aeruginosa</i> ....	- 39 -
Figure n°17 : Structure de l'apo-FpvA .....	- 41 -
Figure n°18 : Chargement de PvdI-Fe ou apo-PvdI sur FpvA .....	- 42 -
Figure n°19 : Propriétés spectrales de la PvdI.....	- 43 -
Figure n°20 : Organisation génomique des gènes fpvGHJKCEDF chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	- 44 -
Figure n° 21 : Structure de FpvC dans la voie d'import du fer de la PvdI chez <i>P. aeruginosa</i> . ....	- 45 -
Figure n°22 : Résumé de la voie d'import du fer par la PvdI chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 47 -
Figure n°23 : Biosynthèse de la pyochéline chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 49 -
Figure n°24 : Voie d'import du fer par la Pch chez <i>P. aeruginosa</i> et structure du transporteur FptA chargé en Pch.....	- 50 -
Figure n°25 : Structures des différents sidérophores exogènes pouvant être utilisés par <i>P. aeruginosa</i> .....	- 53 -
Figure n°26 : Utilisation de l'entérobactine par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	- 54 -
Figure n°27 : Utilisation du Ferrichrome et de la ferrioxamine par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	- 56 -

Figure n° 28 : Voie d'acquisition du fer par l'hème chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 58 -
Figure n°29 : Voie d'acquisition du fer par le système FeoABC et le « système » phénazine.....	- 59 -
Figure n°30 : Régulation des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer par le répresseur Fur.....	- 64 -
Figure n°31 : Régulation de l'homéostasie du fer par les facteurs sigma.....	- 65 -
Figure n°32 : Régulation de la transcription des gènes de la voie PvdI via FpvI, PvdS et Fur.....	- 67 -
Figure n°33 : Régulation de la transcription des gènes de la voie Pch chez <i>P. aeruginosa</i> par le répresseur Fur et le régulateur transcriptionnel PchR.....	- 68 -
Figure n°34 : Régulation par les petits ARN PrrF1, PrrF2 et PrrH `.....	- 71 -
Figure n°35 : Facteurs sigma impliqués dans la régulation des gènes d'import de la PvdI.....	- 72 -
Figure n°36 : Mécanisme de régulation par le quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i> et facteurs de virulence associés.....	- 73 -
<b>Partie II : Résultats (Chapitres VI à VIII).....</b>	<b>- 78 -</b>
Figure n°37 : Cross-linking sur FpvG.....	- 82 -
Figure n°38 : Interaction des protéines FpvD et FpvE en double hybride bactérien ...	- 83 -
Figure n°39 : Topologies des structures prédites pour FpvG et FpvH.....	- 88 -
Figure n°40 : Caractérisation structurale du complexe membranaire FpvG <sup>His6</sup> -FpvH <sup>Strep</sup> par microscopie électronique à coloration négative.....	- 89 -
Figure n°41 : Dissociation <i>in vitro</i> du complexe ferri-PvdI.....	- 91 -
Figure n°42 : Structure de l'hème b et de l'hème c.....	- 93 -
Figure n°43 : Spectre d'absorption du complexe FpvG <sup>His6</sup> -FpvH <sup>Strep</sup> /Test TMBZ.....	- 94 -
Figure n°44 : Comparaison de la structure primaire et secondaire de FpvG avec de potentiels réductases impliquées dans des dissociations de fer d'autres sidérophores que la PvdI chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 96 -
Figure n°45 : Séquence en acide aminé de FpvG/Croissance des mutants générés ..	- 98 -
Figure n°46 : Dissociation <i>in vivo</i> du complexe PvdI-Fe.....	- 99 -
Figure n°47 : Pull down avec billes d'hèmes.....	- 101 -
Figure n°48 : Interaction protéique du mutant FpvG <sub>mut</sub> .....	- 102 -
Figure n°49 : Hypothèse sur le mécanisme de réduction du complexe PvdI-Fe.....	- 106 -
Figure n°50 : Essais de validation des interactions protéiques détectées par le criblage en double hybride bactérien.....	- 111 -
Figure n°51: Représentation du système de sécrétion de type VI.....	- 112 -
Figure n°52 : Croissance et production de la PvdI des souches PAO1ΔfpvAΔfpvB, PAO1ΔfpvAΔfpvBΔclpV2, PAO1ΔfpvAΔfpvBΔpvdRTopmQ et PAO1ΔfpvAΔfpvBΔpvdRTopmQΔclpV2.....	- 115 -
Figure n°53 : Sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée.....	-116 -
Figure n°54 : Accumulation de PvdI dans le périplasme bactérien.....	- 117 -
Figure n°55 : Recyclage de la PvdI ayant transporté du fer dans les cellules bactériennes.....	- 119 -

Figure n°56 : Fluorescence associée aux cellules A549 après infection par des mutants de <i>P. aeruginosa</i> .....	- 121 -
Figure n°57 : <i>P. aeruginosa</i> PAO1 incubé en présence d' <i>E. coli</i> -mCherry.....	- 122 -
<b>Partie III : Conclusion générale .....</b>	<b>- 126 -</b>
Figure n°58 : Représentation du complexe identifié entre les protéines FpvGHJFC	- 128 -
Figure n°59 : Modèle simplifié d'import et de dissociation du complexe PvdI-Fe proposé. .....	- 130 -
<b>Partie IV : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>- 132 -</b>
Figure n°60 : Construction de la banque d'ADN génomique .....	- 139 -
Figure n°61 : Construction du vecteur suicide pour déleter un gène chez <i>P. aeruginosa</i> .....	- 146 -

# Liste des Tableaux

<b>Partie I : Synthèse bibliographique (Chapitres I à V)</b> .....	<b>- 2 -</b>
Tableau n°1 : Différents types d'infections provoquées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ....	- 7 -
Tableau n°2 : Exemples d'effecteurs et du type de système de sécrétion associé. ....	- 12 -
Tableau n°3 : Mécanismes et localisation de la dissociation des complexe sidérophore-fer chez les bactéries (quelques exemples).....	- 28 -
Tableau n°4 : Exemples de TBDTs confirmés chez <i>P. aeruginosa</i> et substrats associés ..	- 31 -
Tableau n° 5 : Exemples de chaines peptidiques en fonction des espèces de <i>Pseudomonas</i> fluorescents et des différentes souches. ....	- 33 -
Tableau n°6 : Comparaison des systèmes de sécrétion de la pyoverdine impliqués dans différentes souches de <i>Pseudomonas</i> . ....	- 38 -
Tableau n°7 : Récepteurs TonB dépendant pour le sidérophore pyoverdine chez les <i>Pseudomonas</i> .....	- 40 -
<b>Partie II : Résultats (Chapitres VI à VIII)</b> .....	<b>- 78 -</b>
Tableau n°8 : Liste des potentiels interagants de FpvG.....	- 110 -
Tableau n°9 : Souches construites pour l'étude du H2-T6SS dans la sécrétion de PvdI.....	- 114 -
<b>Partie IV : Matériels et Méthodes</b> .....	<b>- 132 -</b>
Tableau n°10 : Concentrations en fer mesurées dans les milieux utilisés pour les expériences.....	- 133 -
<b>Annexes du Matériels et Méthodes</b> .....	<b>- 147 -</b>
Tableau n°11 : Souches utilisées et construites pour cette thèse .....	- 147 -
Tableau n°12 : Plasmides utilisés pour cette thèse .....	- 148 -
Tableau n°13 : Oligonucléotides utilisés dans cette thèse .....	- 149 -
Tableau n°14 : Préparation du gel de séparation .....	- 151 -
Tableau n°15 : Préparation du gel de concentration.....	- 151 -



## Liste des Abréviations

**ABC** : ATP Binding Cassette  
**Å** : Angstrom  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADP** : Adénosine diphosphate  
**AHL** : N-acyl homosérine lactone  
**AI** : Auto-inducteurs  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**Bfr** : Bacterioferritine  
**CAA** : Milieu casaminoacides  
**Da** : Dalton  
**DDM** : N-dodécyle- $\beta$ -maltoside  
**DHBS** : N-(2,3-dihydrobenzoyl) serine  
**DO** : Densité optique  
**DTT** : Dithiothréitol  
**ECF** : Facteur sigma extra-cytoplasmique  
**EM** : Microscopie électronique  
**ENT** : Entérobactine  
**Fe** : Fer  
**Ftn** : Ferritine  
**Fur** : Ferric uptake regulator  
**GDP** : Guanosine diphosphate  
**GSH** : Glutathion  
**Ka** : Constante d'affinité  
**LB** : Lysogeny broth  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**M** : Molaire ( $\text{mol/m}^3$ )  
**MFS** : Major facilitator superfamily  
**MOI** : Multiplicity Of Infection  
**NIS** : NRPS Indépendant Sidérophores  
**NRPS** : Non ribosomal peptidase synthesis / Peptidases à synthèse non ribosomique  
**OMP** : Outer Membrane Protein  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**OMV** : Outer membrane vesicles  
**Pb** : paire de base  
**PBP** : Periplasmic Binding Protein  
**PCA** : Phénazine-1-carboxylic  
**Pch** : Pyochéline  
**PDB** : Protein Data Bank (Numéro d'attribution)  
**Phu** : Pseudomonas heam uptake  
**PHZ** : Phénazine  
**Pi** : Phosphate  
**PM** : Poids Moléculaire  
**Pmf** : proton motrice force / Force proton-motrice  
**PQS** : Pseudomonas quinolone signal  
**Pvd** : Pyoverdine  
**QS** : Quorum Sensing  
**ROS** : Espèces réactives à l'oxygène  
**SDS** : Dodécylsulfate de sodium  
**Tat** : Twin arginin translocation  
**TBDT** : TonB dependant transporter / Transporteur TonB dépendant  
**TM** : (segment/domaines) Transmembranaires  
**TMBZ** : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine  
**TSS** : Type System Secretion (Exemple : T1SS  $\rightarrow$  système de sécrétion de type 1)  
**UV** : Ultra-Violet  
**X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosi

# Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, ubiquitaire avec une capacité considérable à s'adapter à divers environnements (eaux, sols, animaux, plantes...). Cette bactérie est également un pathogène opportuniste capable de provoquer de nombreuses infections chez l'homme.

Comme la plupart des organismes vivants, *P. aeruginosa* a besoin de fer pour sa croissance. Or, le fer est un élément très peu biodisponible dans l'environnement microbien. Pour l'acquérir, *P. aeruginosa* a développé diverses stratégies dont de nombreuses basées sur l'utilisation de petites molécules chélatrices de fer, appelées sidérophores. *P. aeruginosa* produit et sécrète deux sidérophores différents : la pyoverdine (PvdI) et la pyochéline (Pch). Ces sidérophores vont être sécrétés dans le milieu environnant de la cellule, et vont chélater le fer ferrique libre. Les complexes sidérophores-Fer sont ensuite reconnus à la surface de la bactérie par des transporteurs spécifiques pour être ensuite internalisés. Les voies d'import de ces complexes sidérophores-Fer vont impliquer de nombreux acteurs protéiques différents selon les voies, ainsi qu'une régulation très fine au niveau moléculaire. Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition du fer par le sidérophore PvdI.

La [première partie](#) de ce manuscrit sera une synthèse bibliographique divisée en plusieurs chapitres. Le premier chapitre décrira *P. aeruginosa* et ses facteurs de virulence. Le second chapitre se concentrera sur les voies d'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries à Gram négatif. Le chapitre III détaillera les voies d'import du fer par les sidérophores PvdI et Pch chez *P. aeruginosa* et le chapitre IV les autres stratégies d'acquisition du fer développées par ce pathogène. Enfin, le dernier chapitre de la synthèse bibliographique analysera les mécanismes de régulation impliqués dans l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*.

La [deuxième partie](#) de ce manuscrit sera consacrée aux résultats obtenus pendant cette thèse ainsi que les perspectives qui en découlent, suivie d'une [troisième partie](#) consacrée à la discussion générale. La [quatrième partie](#) de cette thèse résumera les méthodes utilisées pour les expériences réalisées dans le cadre de ce travail.



## **Partie I : Synthèse bibliographique**



**Chapitre I :**  
***Pseudomonas aeruginosa***

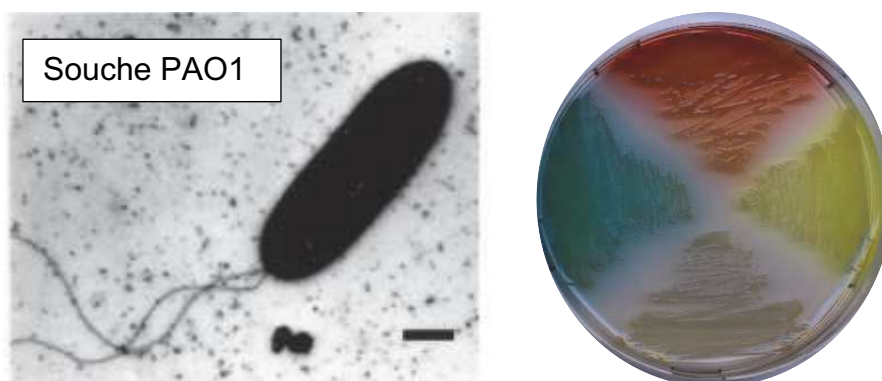
## I) Généralités chez *Pseudomonas aeruginosa*

### a. Généralités

L'organisme modèle étudié au laboratoire est *Pseudomonas aeruginosa*, un bacille à Gram négatif observé pour la première fois dans un contexte militaire. Au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, le chirurgien Dr. Charles Emmanuel Sédillot remarqua un écoulement bleu/vert des infections des plaies de soldats qu'il associa avec la présence d'un agent infectieux. Le pigment responsable de la couleur des plaies fut isolé en 1860, mais il faudra attendre 1882 pour que le Docteur Carle Gessard isole complètement la bactérie, qui s'avèrera être *P. aeruginosa*. Les premières observations d'infections aiguës et chroniques corrélées à cet agent infectieux datent de 1916 (Freeman, 1916). Depuis, les études concernant ce micro-organisme n'ont cessé d'évoluer et les mécanismes moléculaires associés à sa physiologie et sa virulence ont été de vastes sources d'études.

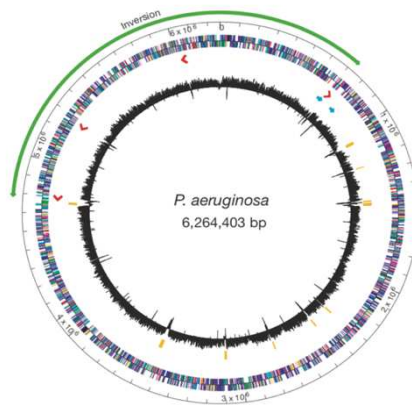
Ce bacille mesure entre 1 et 5 µm et possède au moins un flagelle polaire (**Figure n°1**). La coloration de Gram révèle que *P. aeruginosa* est une bactérie à coloration de Gram négatif, c'est-à-dire possédant une double paroi : une membrane cytoplasmique ainsi qu'une membrane externe, séparées par un compartiment appelé périplasme. Les membres de la famille de *Pseudomonas* produisent différents pigments colorés qui vont être caractéristiques de l'espèce (**Figure n°1**).

Concernant son mode de respiration, *P. aeruginosa* favorise la respiration en aérobie, mais dans des conditions où l'oxygène est très limité, *P. aeruginosa* est aussi capable de faire de l'anaérobiose en utilisant des nitrite ou nitrate comme substrats (Davies *et al.*, 1989).



**Figure n° 1 : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et différents pigments produits par les *Pseudomonas*.** **A gauche**, représentation en microscopie électronique d'une cellule de *P. aeruginosa* PAO1 cultivée sur milieu gélosé pour étude de la motilité (*swarming*). Grossissement X10 400, la barre noire représentant 5 µm. D'après (Rashid & Kornberg, 2000). **A droite**, différents pigments que peuvent produire des souches différentes de *Pseudomonas* : certaines souches synthétisent un pigment bleu, la pyocyanine, et un pigment vert, la pyoverdine, spécifiques aux *Pseudomonas* fluorescents comme *P. aeruginosa*. Certaines souches de *Pseudomonas* peuvent ne pas être pigmentées ou produire des pigments rouge et noir, comme la pyorubine et la pyomélanine, respectivement (Photos et informations de Katy Jeannot et Thomas Guillard dans un rapport 2019 de la Société Française de Microbiologie).

Au laboratoire, nous étudions précisément la souche *P. aeruginosa* PAO1. Le génome de *P. aeruginosa* PAO1, séquencé intégralement en 2000, mesure environ 6,3 millions de paires de bases (Mbp), ce qui est remarquablement plus élevé que la plupart des bactéries avec pas moins de 5 570 cadres ouverts de lecture prédits (Stover *et al.*, 2000) (Figure n°2). Au moins 500 gènes codent pour des éléments de régulation et environ 370 sont impliqués dans la virulence bactérienne. Ceci indique que ce micro-organisme possède une grande capacité à s'adapter et s'établir très facilement et rapidement à un large panel d'environnements qu'ils soient naturels (environnement comme l'eau ou le sol) ou artificiels (matériel médical).



**Figure n° 2 : Représentation circulaire du génome de *P. aeruginosa***

Même si *P. aeruginosa* est retrouvé dans divers environnements, il est retrouvé majoritairement près des zones à activité humaine (Crone *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* est impliqué dans diverses infections chez des patients dont le système immunitaire est affaibli, ce qui définit cette bactérie comme un pathogène opportuniste (Tableau n°1). *P. aeruginosa* est responsable jusqu'à 20 % des infections nosocomiales et peut provoquer des infections létales. Plusieurs aspects du métabolisme de *P. aeruginosa* expliquent une colonisation facile et son établissement durable chez l'hôte, notamment :

- Sa capacité à sécréter de nombreux facteurs de virulence facilitant la colonisation de l'hôte et la compétition avec d'autres bactéries,
- Sa capacité à s'adapter aux conditions de stress et à former des biofilms,
- Sa résistance aux antibiotiques qui ne cesse de croître et de se propager,
- Sa capacité à acquérir par différentes stratégies des nutriments en conditions difficiles, comme le fer notamment.

**Tableau n°1 : Différents types d'infections provoquées par *Pseudomonas aeruginosa*.**

\*La mucoviscidose est une maladie génétique causée par la mutation des deux copies du gène CFTR qui entraîne la formation d'une couche de mucus épais dans les voies respiratoires. La présence de ce mucus empêche la clairance mucociliaire et favorise l'installation de bactéries notamment *P. aeruginosa*. Tableau adapté de (Gellatly & Hancock, 2013).

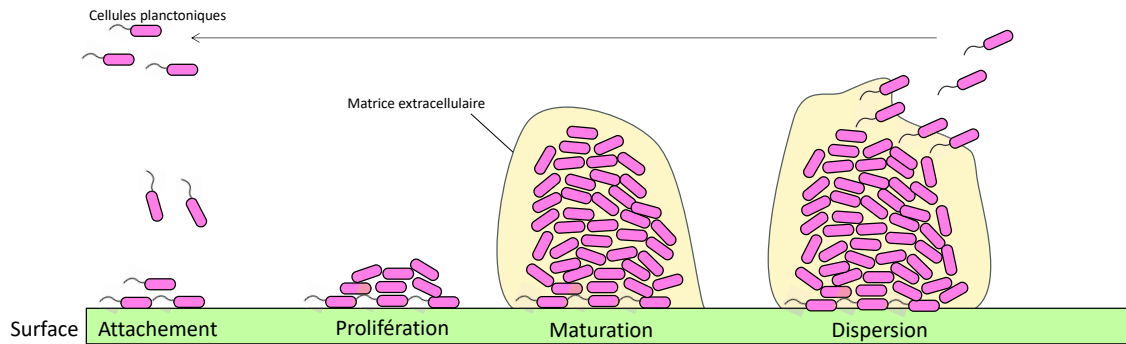
Infection	Patients à risque
Urinaire	Personne avec cathéter
Bactériémie	Immunodéficient (personnes infectées par le VIH...)
Pneumonie/Infection respiratoire	Personnes âgés, personnes atteintes de la mucoviscidose*
Cornée	Porteur de lentilles de contact, contamination des solutions de lavage des lentilles
Pied diabétique	Diabétiques
Peau et tissu inférieur	Grand brûlés, infection post-opératoire

**b. Définition du biofilm**

La capacité de *P. aeruginosa* à se développer sous forme de biofilm est un élément important de sa pathogénèse et il me paraissait important de rappeler brièvement cette particularité. Le biofilm a été décrit comme « un assemblage de micro-organismes et de produits extracellulaires associés, attachés à une surface abiotique ou biotique » (Citation de M.E Davey et G.A. O'Toole). Le biofilm est une adaptation du mode de vie des bactéries leur permettant de se protéger des pressions extérieures et donc leur survie dans des environnements hostiles. C'est notamment le cas dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose lors d'une thérapie antibiotique agressive et en présence d'une réponse immunitaire forte du patient (Folkesson *et al.*, 2012; Stewart & William Costerton, 2001). Brièvement, la formation d'un biofilm commence par l'adhésion d'une ou plusieurs bactéries à une surface biotique ou abiotique. L'approche de la surface nécessite la mobilité fournie par les flagelles, puis l'adhésion nécessite la présence d'appendices de type fimbriae et pili de type IV à la surface du micro-organisme (O'Toole & Kolter, 1998). Les bactéries vont ensuite proliférer et former une micro-colonie (phase de prolifération). Suit ensuite une étape de maturation où les cellules vont excréter des facteurs conduisant à la formation autour de la micro-colonie d'une matrice extracellulaire composée principalement d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. L'accumulation de ces éléments conduit à la formation d'un biofilm mature. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm afin de coloniser d'autres surfaces (phase de dispersion) (Paolozzi *et al.*, 2015) (**Figure n°3**).

Les bactéries présentes dans le biofilm possèdent un métabolisme et un phénotype très différents des cellules planctoniques : leur métabolisme est ralenti et leur virulence est

amoindrie. Toutes ces caractéristiques leur confèrent une longévité accrue au sein de l'hôte et promeut l'apparition d'infections chroniques. La résistance aux agents antimicrobiens est augmentée dans le cas des biofilms (Costerton *et al.*, 1999; Drenkard, 2003).



**Figure n° 3 : Schéma simplifié de la formation d'un biofilm.** Adapté d'après (Alav *et al.*, 2018).

### **c. Infection à *P. aeruginosa* : exemple de la mucoviscidose.**

*P. aeruginosa* est l'une des bactéries les plus retrouvées dans les infections respiratoires chez les patients hospitalisés. Elle est également la cause majeure de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. L'interaction de *P. aeruginosa* avec les patients atteints de mucoviscidose est décrite comme un processus en deux étapes. Le premier stade correspond à la colonisation des poumons des malades par des bactéries, stade qui est alors associé à des infections aiguës. Le second stade consiste en l'apparition de bactéries persistantes produisant différents facteurs promouvant la formation de biofilm et favorisant des infections chroniques (Goodman *et al.*, 2004; Parsek & Singh, 2003). Ainsi, le phénotype de *P. aeruginosa* varie considérablement selon que la souche ait été isolée d'un patient ayant une infection aiguë ou chronique. Les souches isolées de patients dont l'infection est récente vont exprimer des facteurs de virulence et de motilité et vont posséder une longue chaîne latérale sur leur lipopolysaccharide (LPS). Les bactéries à l'origine des infections chroniques vont présenter un profil différent. Elles vont sous-exprimer certains facteurs de virulence (notamment la production de toxines), ne seront plus mobiles (perte du flagelle) et n'auront plus de chaîne latérale sur leur LPS, ou bien cette dernière sera plus courte (Goldberg & Pier, 1996). Enfin, ces isolats vont surexprimer de l'alginate, responsable du phénotype mucoïde, et auront de ce fait tendance à former un biofilm.

## II) Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Comme cité précédemment, différents facteurs de virulence vont être exprimés ou sécrétés selon le type d'infection. De façon non exhaustive, différents facteurs impliqués dans la pathogénèse de *P. aeruginosa* vont être cités ci-dessous, montrant la complexité et l'incroyable diversité des stratégies de virulence que possède ce micro-organisme. Il faut tout de même noter que la régulation de l'expression de ces facteurs de virulence implique de nombreux mécanismes permettant à la bactérie de s'adapter au mieux face à son environnement. Ces mécanismes ne seront pas décrits dans cette thèse.

### a. Facteurs d'adhérence et de mobilité

Les facteurs d'adhérence et de mobilité chez *P. aeruginosa* comprennent un flagelle polaire qui va permettre la mobilité de type *Swarming* mais aussi l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires (Feldman *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2000; Montie *et al.*, 1982) ; l'expression de pili de type IV permettant l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires (Hahn, 1997) ; l'expression de facteurs d'attachement de type fimbriae (Vallet *et al.*, 2001); la présence du LPS sur la membrane externe participant à l'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales pulmonaires et à la réponse inflammatoire intense (Goldberg & Pier, 1996; Lynn & Golenbock, 1992).

### b. Facteurs de colonisation

Les facteurs de colonisation vont principalement impliquer des effecteurs participant à la dégradation des tissus et des cellules de l'hôte et donc à l'invasion des bactéries. De façon non exhaustive, les principaux facteurs de colonisation sont :

- L'exotoxine A, codée par *toxA* (Liu, 1966), qui a une activité mono-ADP-ribosyltransférase et agit sur le facteur d'élongation 2 eucaryote. Son activité entraîne l'arrêt de la synthèse protéique et la mort des cellules (Gallant *et al.*, 2000; Iglewski, 1977).
- LasA et LasB, deux enzymes protéolytiques participant à la dégradation de l'élastine et des immunoglobulines. Ces deux protéines sont importantes pour l'invasion des cellules épithéliales par *P. aeruginosa* (Cowell *et al.*, 2003; Galloway, 1991; Heck *et al.*, 1990).
- Les toxines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY qui sont injectées dans les cellules eucaryotes par le système de sécrétion de type 3 (T3SS). Ces toxines participent à la détérioration du cytosquelette cellulaire entraînant la mort des cellules et des lésions pulmonaires. Elles participent également à l'inhibition de la réponse immunitaire phagocytaire. ExoS



et ExoT sont des enzymes bi-fonctionnelles avec une activité GTPases et ADP-ribosyltransférase. ExoY est une adénylate cyclase dont l'activité entraîne l'accumulation d'AMPc dans la cellule hôte et ExoU est une phospholipase (Barbieri & Sun, 2005; Hauser, 2009; Yahr *et al.*, 1998). L'expression du T3SS est souvent associée aux infections aiguës invasives et a été également reliée à une hausse de la mortalité chez certains patients (Hauser, 2009).

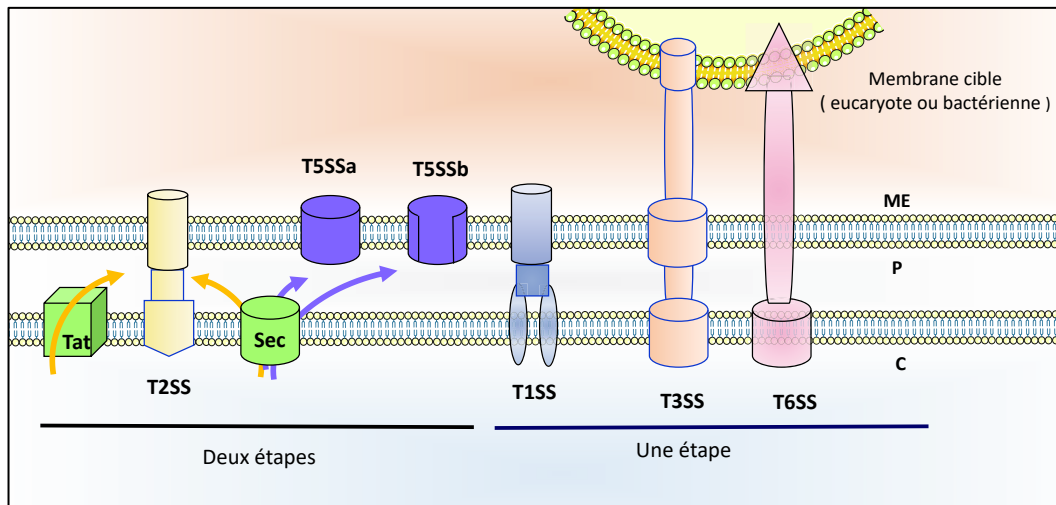
- La pyocyanine, un métabolite de la famille des phénazines, est une molécule oxydante contribuant à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène et de stress oxydatif dans les cellules du tissu respiratoire (Muller, 2002).
- Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires sécrétés participant à l'invasion des tissus pulmonaires grâce à leur pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire. Ils perturbent également la clairance mucociliaire des poumons (Read *et al.*, 1992; Zulianello *et al.*, 2006).
- Différentes protéases dont la protéase alcaline AprA et la protéase IV. La première dégrade la fibrine et les protéines du complément de l'hôte (protéines de l'immunité innée chez l'homme)(Guzzo *et al.*, 1991; Laarman *et al.*, 2012). La seconde est codée par le gène *prpL* et dégrade des protéines du complément, des immunoglobulines, la lactoferrine, la transferrine et l'élastine (Engel *et al.*, 1998; Wilderman *et al.*, 2001).
- Les lectines LecA et LecB, qui ont un rôle dans l'adhésion aux cellules pulmonaires et l'induction de lésions pulmonaires aiguës (Chemani *et al.*, 2009; Wentworth *et al.*, 1991).

Néanmoins, les souches bactériennes de *P. aeruginosa* isolées des patients peuvent ne pas avoir le même génotype que la souche de laboratoire PAO1. En effet, des souches très virulentes ne possédant ni de gènes codant pour le T3SS, ni de gènes *lasB* et *toxA* ont été isolées. Ces souches, présentant un phénotype hyper-virulent, sont en fait pourvues d'autres facteurs de virulence comme le système d'exolysines ExlA/ExlB (Huber *et al.*, 2016).

### **c. Les systèmes de sécrétion**

Les différents effecteurs sécrétés par la bactérie traversent les membranes *via* différents systèmes de sécrétion (TSS) (**Tableau n°2**). Deux catégories de système de sécrétion sont retrouvées, ceux transportant les protéines à travers l'enveloppe bactérienne en une étape, et ceux les transportant en deux étapes. La première étape correspond au passage de la membrane interne jusque dans le périplasme via les systèmes Sec et/ou Tat, et la seconde à une prise en charge par le système de sécrétion associé pour le passage de la membrane externe (Filloux, 2011). *P. aeruginosa* possède 5 types de systèmes de sécrétion différents,

pour certains codés en plusieurs copies dans le génome : T1SS, T2SS, T3SS, T5SS et T6SS (Figure n°4).



**Figure n°4 : Représentation schématique et simplifiée des 5 systèmes de sécrétion présents chez *P. aeruginosa*.** ME= Milieu extracellulaire, P=Périplasme et C=cytoplasme.

Les T2SS et T5SSa/b transportent leurs effecteurs en deux étapes :

- **T2SS** : les substrats sont d'abord pris en charge par le système de sécrétion Sec ou Tat via la reconnaissance de leur peptide signal en N-terminal. Ce dernier est ensuite clivé dans le périplasme. Le substrat adopte ensuite une conformation tridimensionnelle propre qui lui permet d'être reconnu par les protéines Xcp ou Hxc du T2SS pour être transloqué dans le milieu extracellulaire (Ball *et al.*, 2002; Filloux *et al.*, 1998; Voulhoux, 2001).
- **T5SS** : les substrats passent la membrane interne par le système Sec, puis sont transportés à travers la membrane externe par une protéine formant un tonneau  $\beta$ . Il existe deux sous-types de T5SS chez les bactéries à Gram négatif, les auto-transporteurs où c'est le substrat lui-même qui possède un domaine C-terminal permettant la formation du tonneau  $\beta$  (T5SSa) dans les membranes externes et les transporteurs à deux partenaires (T5SSb) (Bleves *et al.*, 2010).

Les T1SS, T3SS et T6SS transportent leurs effecteurs en une étape :

- **T1SS** : c'est le système de sécrétion le plus simple : le substrat passe d'abord par un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) au niveau de la membrane interne, puis est pris en charge par une protéine de membrane externe (OMP) qui permet la sécrétion dans le milieu extracellulaire. Une protéine localisée dans le périplasme permet de relier les deux composants (Delepelaire, 2004).
- **T3SS** : Le T3SS, aussi appelé injectisome, est un appareil composé d'au moins 20 protéines qui permettent l'injection, telle une aiguille, des toxines ExoUTSY citées précédemment, directement dans le cytosol des cellules eucaryotes (Hauser, 2009).

- **T6SS** : *P. aeruginosa* code pour 3 systèmes de sécrétion de type 6 distincts, nommés H1-T6SS, H2-T6SS et H3-T6SS (Mougous, 2006). Le H1-T6SS permet la sécrétion de facteurs de virulence directement dans des cellules procaryotes (Russell *et al.*, 2011) tandis que les H2 et H3-T6SS peuvent injecter les facteurs directement dans les cellules eucaryotes et procaryotes (Jiang, 2014; Sana *et al.*, 2012). Ces systèmes possèdent une structure analogue à la queue d'un phage, capable de se contracter et de s'étirer pour injecter les effecteurs dans les cellules cibles.

Les T3SS et T6SS permettent donc de délivrer les facteurs de virulence directement dans la cellule cible en traversant la membrane ; le T3SS est nécessaire pour l'infection aiguë, et inversement le T6SS est important pour l'infection chronique (Brencic & Lory, 2009; Moscoso *et al.*, 2011) :

Le **tableau n°2** résume les systèmes de sécrétion et certains des facteurs de virulences associés décrits ci-dessus.

**Tableau n°2 : Exemples d'effecteurs et du type de système de sécrétion associé.** Tableau réalisé d'après (Filloux, 2011).

Système de sécrétion	Facteur de virulence
<b>T1SS</b>	<u>Alcaline protease</u> : AprA <u>Acquisition de l'hème</u> : HasAp
<b>T2SS</b>	<u>Protéase/Elastase</u> : LasA et LasB <u>Alcaline phosphatase</u> : PhoA <u>Exotoxine A</u> : ToxA <u>Protéase IV</u>
<b>T3SS</b>	<u>Toxines</u> : ExoS, ExoT, ExoU, ExoY
<b>T5SSa</b>	<u>Lipase</u> : EstA
<b>T5SSb</b>	<u>Protease</u> : LepA
<b>T6SS</b>	<u>H1-T6SS</u> : Toxines : Tse1, Tse2, Tse3 <u>H2-H3-T6SS</u> : Phospholipases : PldA, PldB

#### d. Les facteurs de virulence lors de l'infection chronique

Après son établissement chez l'hôte, *P. aeruginosa* va devoir trouver des stratégies pour survivre au sein de l'hôte et échapper au système immunitaire. Le passage d'une infection aiguë à une infection chronique se manifeste par le changement d'expression des facteurs de

virulence : par exemple, la diminution de l'expression des gènes associés au système de sécrétion de type III (virulence aigue) et l'augmentation de l'expression du gène *algD* (Pierre *et al.*, 2008). *algD* code pour une GDP mannose déshydrogénase, un enzyme clé dans la synthèse d'alginate (Govan & Deretic, 1996) qui est un des exopolysaccharides majeur constituant la matrice du biofilm. Parmi d'autres facteurs exprimés lors de l'infection chronique, on retrouve les systèmes d'acquisition du fer (via des chélateurs de fer ferrique ou des systèmes permettant l'acquisition de fer ferreux libre), l'expression des H1-H2-H3-T6SS ainsi que des gènes codant pour des mécanismes de résistances aux antibiotiques comme des pompes à efflux.

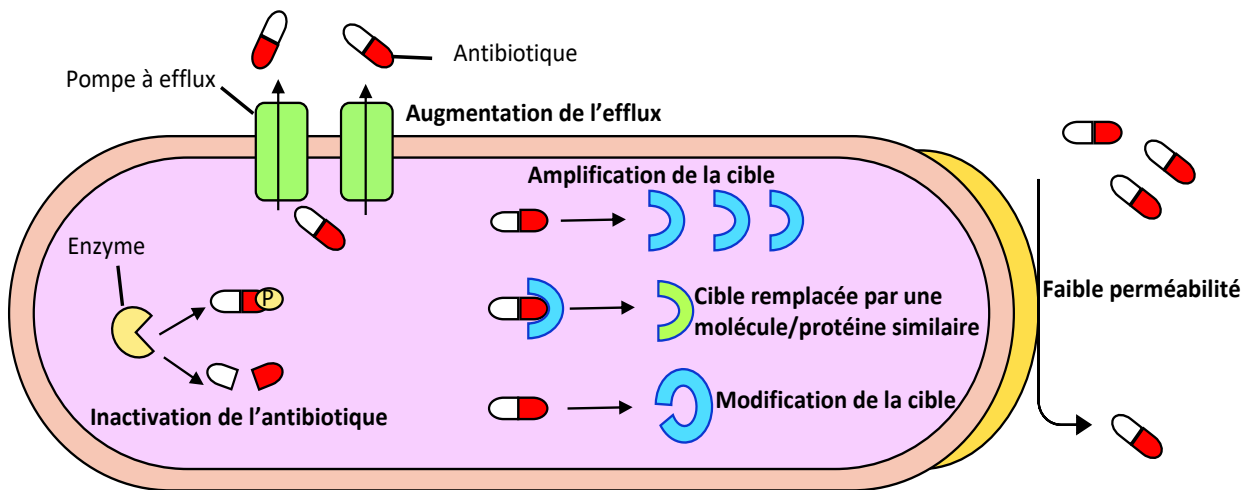
### III) *P. aeruginosa* et résistance aux antibiotiques

Un autre aspect de la virulence de *P. aeruginosa* est sa résistance aux antibiotiques. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé en 2017 *P. aeruginosa* en pathogène critique du fait de sa résistance notamment aux carbapénèmes, et a alerté la communauté scientifique sur le besoin urgent de trouver de nouveaux moyens de lutte. *P. aeruginosa* fait partie du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*), regroupant les pathogènes majeurs posant des problèmes d'antibiorésistance (Rice, 2008).

Deux raisons majeures expliquent cette résistance aux antibiotiques :

- L'utilisation excessive d'antibiotiques qui entraîne la sélection de souches résistantes (Hirsch & Tam, 2010).
- L'arsenal des mécanismes de résistance que la bactérie possède, appelé aussi résistance intrinsèque, acquise ou adaptative (**Figure n°5**).

La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* est liée à la faible perméabilité de la membrane externe qui bloque ou rend difficile l'import d'antibiotiques (R. Hancock, 1997), l'expression de pompes à efflux (par exemples MexXY-OprM et MexAB-OprM) expulsant de la bactérie les substances indésirables (R. E. W. Hancock, 1998; K. Poole, 2001) ainsi que la production d'enzymes dégradant ou inactivant les antibiotiques comme par exemples des  $\beta$ -lactamases ou des aminoglycosides phosphotransférases (Okii *et al.*, 1983; Richmond & Sykes, 1973). La résistance acquise correspond aux transferts horizontaux de gènes de résistance via des plasmides, des phages, des transposons ou encore des mutations (Breidenstein *et al.*, 2011). La résistance adaptative implique des changements phénotypiques liés à la présence d'antibiotiques afin de survivre, comme la formation de biofilm qui ralentit voir empêche la diffusion des antibiotiques dans les cellules bactériennes (Drenkard, 2003; Mulcahy *et al.*, 2014).



**Figure n°5 : Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques utilisés par les bactéries.**  
Adapté d'après Alav *et al.*, 2018.

Nous avons ainsi vu brièvement la diversité des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Ce chapitre ne prétend absolument pas tout résumer de la pathogénèse, mais a plutôt pour but de présenter une légère introduction de ce micro-organisme afin de mieux appréhender les chapitres qui vont suivre. En effet, un aspect qui n'a pas été cité dans cette partie mais qui va être également primordial dans la virulence bactérienne est la capacité de cette bactérie à acquérir par divers moyens le nutriment essentiel qu'est le fer.



**Chapitre II**  
**Acquisition du fer chez les bactéries  
à Gram négatif**

## l) Le fer

Tous les organismes vivants ont besoin de fer pour leur croissance et leur survie. Il a été décrit qu'un tiers des protéines et la moitié des enzymes dont les structures ont été résolues contiennent au moins un ion métallique, qui peut être du fer par exemple (Frawley & Fang, 2014). De plus, le fer est le quatrième métal le plus abondant sur terre (Andrews *et al.*, 2003) et, sauf quelques exceptions, le fer est indispensable à toute vie sur terre. Les seules exceptions connues concernent les bactéries du genre *Lactobacillus* (Weinberg, 1997), l'agent responsable de la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) (Posey, 2000) et l'agent responsable de la syphilis, *Treponema pallidum* (Posey *et al.*, 1999).

### a. Importance du fer dans la vie cellulaire

Le fer est décrit comme étant un élément nécessaire et primordial pour le métabolisme et le bon fonctionnement de la vie cellulaire. Dans les conditions physiologiques, le fer est présent sous deux formes : l'ion ferrique oxydé,  $Fe^{3+}$  et l'ion ferreux réduit,  $Fe^{2+}$ . Ces deux états confèrent au fer un pouvoir redox très important qui fait de ce métal un composé prosthétique intéressant pour les protéines, aussi bien comme catalyseur que comme transporteur d'électrons (Andrews *et al.*, 2003). Des enzymes impliqués dans la réparation de l'ADN (hélicases, nucléases...) ainsi que dans la synthèse des nucléotides (ribonucléotide reductase) utilisent le fer comme cofacteur (Puig *et al.*, 2017). Le fer est aussi utilisé comme cofacteur des enzymes impliqués dans le transport d'oxygène comme les cytochromes P450, la photosynthèse ou encore la fixation de nitrogène. De par son importance dans la physiologie des cellules, le fer est un élément essentiel pour la survie et la pathogénicité des microorganismes au sein de leur hôte. Mais c'est aussi un nutriment limitant pour le microorganisme car le fer est finalement très peu biodisponible au sein de l'hôte et lors d'une infection, une réelle bataille s'installe entre les deux entités pour ce nutriment.

### b. Paradoxe de la biodisponibilité du fer

Malgré son rôle essentiel pour la croissance des organismes vivants, le fer est un métal qui va être très peu biodisponible. A pH 7.0, le fer se trouve sous la forme insoluble  $Fe^{3+}$  et forme des hydroxydes de fer (Andrews *et al.*, 2003). En condition aérobie, le fer est sous la forme ferreux ( $Fe^{2+}$ ) qui est très toxique. En effet, le  $Fe^{2+}$  peut interagir avec l'oxygène ce qui peut amener à la formation de ROS (Espèces réactives à l'oxygène) via la réaction de Fenton (Figure n°6). Les ROS sont dévastateurs pour la vie cellulaire puisqu'ils vont avoir un pouvoir dégradant sur toutes macromolécules, comme les protéines ou encore l'ADN (Touati, 2000; Winterbourn, 1995). Chez l'homme, à cause de ces problèmes de solubilité du  $Fe^{3+}$  et de



toxicité de  $\text{Fe}^{2+}$ , le fer va être séquestré dans des molécules d'hème ou des protéines telles que la transferrine ou la lactoferrine. La concentration de fer libre et donc bio-accessible pour les bactéries n'excède ainsi pas  $10^{-24}$  M (Andrews *et al.*, 2003; Raymond *et al.*, 2003). Il a été estimé qu'une bactérie a besoin d'une concentration de fer d'environ  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  M dans son cytoplasme (Cunrath *et al.*, 2016) pour une croissance optimale, ce qui va provoquer une réelle compétition entre l'hôte et les micro-organismes pour ce nutriment.



**Figure n°6 : Réaction de Fenton**

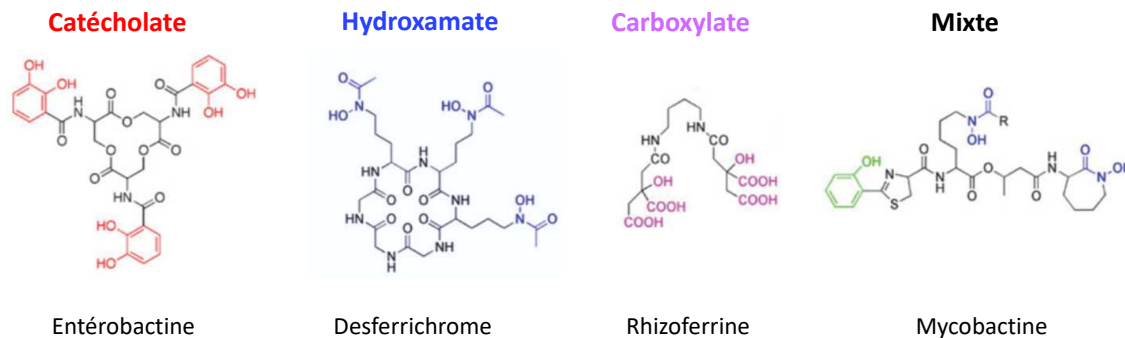
Ainsi, de nombreuses stratégies sont finement régulées et mises en œuvre par les bactéries en fonction de nombreux paramètres (concentration en fer disponible, stade de l'infection...) afin d'acquérir le fer et éviter son accumulation à des concentrations toxiques.

## II) Acquisition du fer par les sidérophores

### a. Les sidérophores

Les sidérophores (littéralement du Grec : sidêros, « le fer » et phérô, « porter ») sont de petites molécules synthétisées par la plupart des micro-organismes (bactéries et certains champignons) ainsi que par les plantes (Haas *et al.*, 2008; Kloepper *et al.*, 1980). Plus de 500 sidérophores ont été décrits depuis leur découverte avec des structures chimiques différentes et des masses moléculaires qui varient entre 200 et 2000 Dalton (Da) (Hider & Kong, 2010). Les sidérophores ont une affinité extrêmement forte pour le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ . On peut notamment citer comme exemple l'enterobactine, un sidérophore sécrété par *E. coli*, dont la constante d'affinité ( $K_a$ ) est de  $10^{52} \text{ M}^{-1}$  (Harris *et al.*, 1979). Lorsque le fer est en complexe avec un sidérophore, il est hexacoordonné. Ainsi, les sidérophores avec les affinités les plus fortes pour le fer et les plus retrouvés vont avoir une structure hexadentée. Les ligands de coordination sont majoritairement des groupements hydroxamates, catécholates et carboxylates qui sont rattachés à une structure chimique permettant la formation de la structure hexadentée. Certains sidérophores possèdent une denticité plus faible : ils peuvent être tétradentés, tridentés ou encore bidentés et auront une affinité plus faible pour le fer que les sidérophores avec une hexacoordination (Albrecht-Gary & Crumbliss, 1998). Dans les cas où les sidérophores ont une denticité plus faible, les complexes sidérophores-fer ont une stoechiométrie supérieure à 1:1, ce qui entraîne la fixation du fer par deux ou plusieurs sidérophores afin d'obtenir une coordination complète du fer (Spasojevic *et al.*, 2001). On

retrouve trois grands types de sidérophores en fonction des groupements chélateurs : les catéchols, les hydroxamates et les carboxylates. Il existe également des sidérophores mixtes qui vont contenir différents groupements chélateurs (Schalk & Guillon, 2013b) (**Figure n°7**). *P. aeruginosa* produit et sécrète deux sidérophores : la pyoverdine et la pyochéline.



**Figure n°7 : Exemples de structures des sidérophores.** Les groupements chélateurs du fer sont en couleur. L'entérobactine est produite par *E. coli* ; le desferrichrome est produit par les champignons de type *Streptomyces* ; la rhizoferrine est produite par des champignons du genre *Mycorales* ou *Aspergillus* et la mycobactine est produite par les Mycobactéries. Adapté d'après (Schalk & Guillon, 2013b).

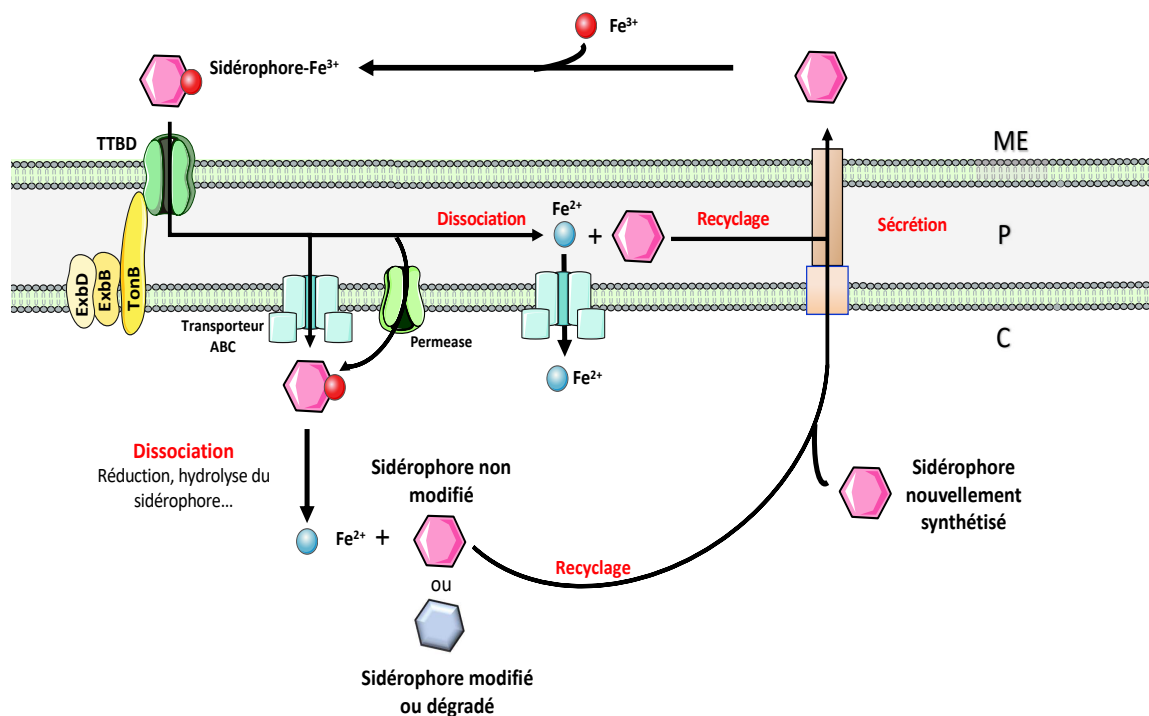
## **b. Synthèse des sidérophores**

La plupart des sidérophores bactériens sont synthétisés via l'action coordonnée d'enzymes à synthèses non ribosomiques (NRPS pour Non-Ribosomal Peptide Synthetases). Les NRPS sont des enzymes composés de plusieurs modules qui activent et incorporent des acides aminés spécifiques et les assemblent en chaîne peptidique. Généralement, un module de NRPS est composé de trois domaines enzymatiques différents : le domaine A d'adénylation, le domaine T de thiolation et le domaine C de condensation. Le domaine A va reconnaître et activer un acide aminé spécifique par adénylation puis va le transférer au domaine T qui va le fixer de manière covalente par l'ajout d'un groupement prosthétique phosphopantéthéine. Le domaine C a pour rôle de former des liaisons peptidiques entre les acides aminés fixés par le domaine T. La dernière NRPS possède généralement un domaine thioestérase adjacent au domaine T et permet l'hydrolyse de la liaison thioester du peptide sur le dernier module afin de libérer ce peptide nouvellement formé (Mootz *et al.*, 2002). Une autre voie de synthèse moins répandue existe pour les sidérophores : il s'agit du système NIS pour NRPS-Independent Siderophore synthétases. Les NIS synthétases sont responsables d'une seule réaction enzymatique. Plusieurs NIS peuvent donc être requises pour la synthèse d'un sidérophore (Carroll & Moore, 2018; Challis, 2005). Par exemple le citrate et la desferrioxamine B sont synthétisés via ces enzymes (Challis, 2005).

### III) Import des complexes sidérophores-fer au travers des membranes bactériennes

#### a. Import du fer par les sidérophores

Lorsque la bactérie se trouve en carence en fer, elle va sécréter dans son environnement des sidérophores capables de chélater le fer ferrique. Les complexes sidérophore-fer formés sont ensuite reconnus à la surface des bactéries par des transporteurs spécifiques puis importés au travers de la membrane externe. L'activité de ces transporteurs est régulée par une protéine de membrane interne, TonB, d'où le nom de Transporteur TonB-dépendant. Selon le sidérophore ou l'espèce bactérienne, le devenir des complexes sidérophore-fer dans le périplasma diffère. Dans un premier cas, la dissociation du fer du sidérophore peut se dérouler dans le périplasma, le fer étant ensuite transloqué dans le cytoplasme pour y être utilisé. Dans l'autre cas, le complexe sidérophore-fer est transloqué jusqu'au cytoplasme par des transporteurs de membrane interne de type ABC ou perméases. La dissociation du fer du sidérophore fait toujours intervenir une réduction du fer qui peut être associée à une modification chimique ou une hydrolyse du sidérophore. Le fer est ensuite utilisé par la cellule ou stocké en fonction des besoins de la bactérie. Le sidérophore peut être recyclé et, s'il est intact, entamer un nouveau cycle de chélation (**Figure n°8**).



**Figure n°8 :** Schéma général de l'acquisition du fer par les sidérophores chez une bactérie à Gram négatif. ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma et C : Cytoplasme.

## **b. Transporteurs TonB dépendant (TBDTs)**

Au niveau des membranes externes des bactéries à Gram négatif, on trouve des porines qui permettent la diffusion de petites molécules dont la taille ne dépasse pas 600 Da. Dans cette membrane se trouvent également des TBDTs qui permettent un transport actif de composés comme les complexes sidérophore-fer dans la cellule bactérienne. Ce transport requiert la force proton-motrice (pmf, pour proton motrice force) fournie par la membrane interne et le complexe protéique TonB, ExbB, ExbD localisé dans la membrane interne (Postle, 1993; Postle & Larsen, 2007). Les premières structures de TBDTs ont été résolues à la fin des années 90 et ont concerné FhuA (le TBDT du ferrichrome chez *E. coli*) (Ferguson *et al.*, 1998; Locher *et al.*, 1998) et FepA (le TBDT de l'enterobactine chez *E. coli*) (Buchanan *et al.*, 1999). Depuis, plus d'une trentaine de structures de TBDTs avec ou sans le ligand associé ont été résolues. Les TBDTs font partie d'une famille de protéines ayant toutes la même structure générale. Leur domaine C-terminal est composé d'un tonneau bêta ( $\beta$ ) de 22 brins antiparallèles reliés par des petites boucles périplasmiques et de larges boucles extracellulaires. Le domaine en tonneau  $\beta$  permet l'insertion dans la membrane externe. Le domaine globulaire N-terminal de la protéine obture le pore du tonneau  $\beta$  et y forme un bouchon (Noinaj *et al.*, 2010; Postle & Larsen, 2007).

L'interaction de ces TBDTs avec les complexes sidérophores-fer fait intervenir une première reconnaissance au niveau des boucles extracellulaires. Intervient ensuite un site de liaison localisé sur le bouchon, composé de résidus appartenant à la fois au bouchon, aux boucles extracellulaires ainsi qu'au tonneau  $\beta$  (Josts *et al.*, 2019; Moynie *et al.*, 2019). C'est au niveau de ce site de liaison que l'on trouve les complexes sidérophore-fer dans les structures aux rayons X. Le site de liaison des TBDTs est très spécifique et reconnaît en général un complexe sidérophore-fer donné ou une famille de sidérophores structuralement très proches (Schalk *et al.*, 2012). La liaison des complexes sidérophores-fer aux TBDTs est indépendante d'une source d'énergie. En revanche le transport nécessite la force proton-motrice de la membrane interne (Clément *et al.*, 2004; Schalk *et al.*, 2001).

Les TBDTs possèdent en N-terminal une région périplasmique d'environ 6-8 acides aminés, appelée boîte TonB, qui est nécessaire à l'interaction avec la protéine TonB de la membrane interne et le transfert de l'énergie de la force proton motrice (Schalk *et al.*, 2012). Cette boîte TonB est donc essentielle au fonctionnement du transporteur. Certains TBDTs ont un domaine N-terminal supplémentaire situé après la boîte TonB et localisé dans le périplasme. Ce domaine globulaire joue un rôle dans des cascades de signalisation permettant d'activer la transcription du gène codant pour le TBDT lui-même. Cette régulation est décrite dans le **Chapitre V**.

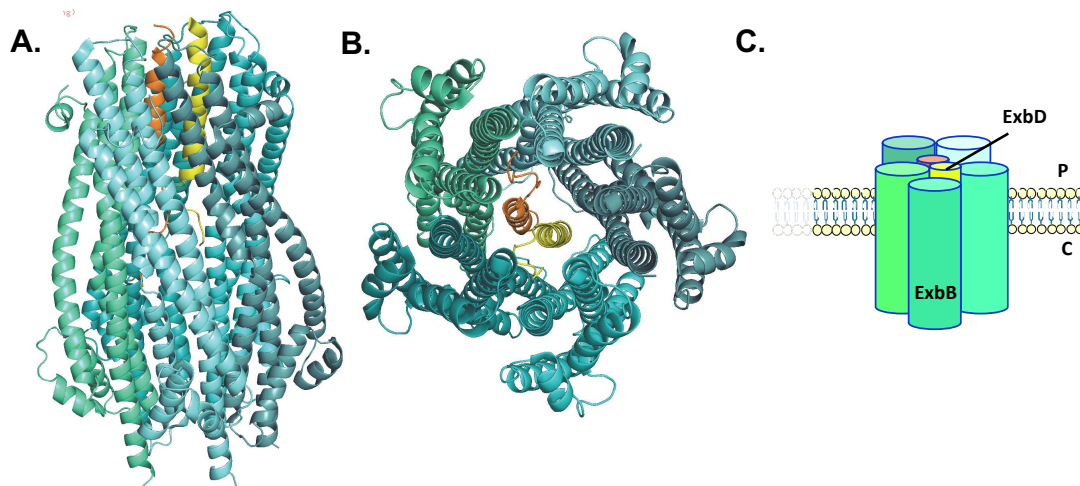
Le processus de transport implique une première étape de reconnaissance du complexe sidérophore-fer par le site de liaison suivie de la translocation jusqu'au périplasma bactérien. Ce transport implique la formation d'un canal au travers du transporteur pour le passage du complexe sidérophore-Fe. Deux hypothèses ont été émises quant à la formation de ce canal : le bouchon change de conformation et ouvre un canal à travers le tonneau  $\beta$  pour laisser passer le complexe sidérophore-fer ou alors le bouchon sort partiellement du tonneau, permettant au complexe de passer. Une combinaison des deux hypothèses est également envisagée par la communauté (Eisenhauer *et al.*, 2005; Endriß *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2007).

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

Aucune source d'énergie n'existe au niveau de la membrane externe des bactéries et du périplasma. Le complexe TonB-ExbB-ExbD (complexe Ton) a été identifié chez la plupart des bactéries à Gram négatif et permet de fournir l'énergie nécessaire aux transporteurs de la membrane externe via la force proton motrice de la membrane interne. Le complexe Ton est composé de trois protéines localisées dans la membrane interne : ExbB, ExbD et TonB. La région N-terminale de la protéine TonB est insérée dans la membrane cytoplasmique. Sa région centrale est une région très rigide, riche en proline. La région C-terminale sous forme dimérisée interagit avec le peptidoglycane tandis que sous forme monomérique elle interagit avec la boîte TonB présente dans la région N-terminale des TBDTs. L'interaction entre la boîte TonB et la protéine TonB ainsi que la force proton-motrice fournie par ExbB et ExbD entraînent plusieurs changements conformationnels au niveau du TBDT qui permettent le passage du ligand à travers la membrane externe. Le mécanisme de transduction de l'énergie par le complexe Ton au TBDT suggère que TonB alterne entre différentes conformations ayant un potentiel énergétique différent. Ainsi, TonB fournirait l'énergie au TBDT via des mouvements rotatoires de la région riche en proline (Klebba, 2016; Larsen *et al.*, 1999). Des études structurales récentes ont permis de résoudre la première structure complète du complexe ExbB-ExbD d'abord par cristallographie puis par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) (**Figure n°9**) (Celia *et al.*, 2019; Celia *et al.*, 2016) et ont permis de définir deux modèles pour la transduction de l'énergie fournie par la pmf :

- (i) Le modèle rotationnel : l'hélice transmembranaire du dimère de ExbD occuperait le pore transmembranaire créé par un pentamère de ExbB, et par des mouvements de rotation permettrait la diffusion de protons, fournissant ainsi une source d'énergie à TonB,
- (ii) Le modèle du piston : ExbD se déplacerait de façon verticale dans le pore de ExbB, comme un piston, et permettrait également grâce à ces mouvements la diffusion de protons.

Une combinaison des deux mécanismes peut également être possible. Cependant, les données les plus récentes des structures par cryo-EM suggèrent que le second modèle est le bon (Celia *et al.*, 2019). Pour assurer une meilleure lecture dans le manuscrit, le complexe ExbB-ExbD sera schématisé sous forme d'une unité de ExbB et une unité de ExbD dans les figures de cette thèse.



**Figure n°9 : Structure du complexe ExbB/ExbD.** A. 5 unités de ExbB en différentes déclinaisons de bleus entourent deux unités de ExbD en jaune et orange. B. Vue du dessus de la face périplasmique du complexe. C. Représentation schématique du complexe. PDB : 6TYI. P : Périplasm, C : Cytoplasme. D'après Celia *et al.*, 2019.

Chez *P. aeruginosa*, trois gènes codant pour des protéines TonB ont été identifiés : *tonB1*, *tonB2* et *tonB3* (Huang *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 1996.; Zhao & Poole, 2000). Deux systèmes ExbB/ExbD ont également été identifiés dans le génome de *P. aeruginosa*. La mutation du gène *tonB1* empêche l'import du fer via les sidérophores et de ce fait, ce mutant ne peut croître dans des conditions de carence en fer (Poole *et al.*, 1996). La mutation du gène *tonB2* n'entraîne pas d'effet sur la croissance en milieu carencé alors qu'un double mutant *tonB1tonB2* possède une croissance en milieu carencé en fer encore plus restreinte qu'un simple mutant *tonB1*. Les auteurs ont conclu que TonB2 a la capacité de restaurer partiellement l'activité de TonB1 (Zhao & Poole, 2000). La protéine TonB3 quant à elle n'est pas impliquée dans l'homéostasie du fer mais dans la motilité de type *twitching* et aurait un rôle direct dans la virulence, du moins observé chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Huang *et al.*, 2004).

#### **d. Transporteurs ABC**

Les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) sont une famille de transporteurs présents dans les trois domaines du vivant. Chez les bactéries à Gram négatif, ils sont localisés à la membrane interne et permettent aussi bien l'import de molécules ou de protéines dans le cytoplasme que leur sécrétion. Le T1SS décrit dans le **Chapitre I** est par exemple un type de transporteur ABC associé avec une protéine de membrane externe de type OMP (Outer Membrane Protein). Dans la plupart des mécanismes d'import impliquant les sidérophores, après passage de la membrane externe, le complexe sidérophore-fer est fixé par une protéine périplasmique (PBP pour Periplasmic Binding Protein) associé à un transporteur ABC (Schalk et Guillon, 2013b). Le complexe sidérophore-fer est ensuite transporté au travers de la membrane interne par l'interaction de la PBP-sidérophore-fer avec la perméase du système ABC (**Figure n°10**)

Les transporteurs ABC impliqués dans le transport des sidérophores sont généralement composés :

- D'une ou plusieurs protéine(s) périplasmique(s)
- De deux polypeptides transmembranaires qui forment un canal permettant aux molécules de passer la membrane (la perméase)
- Deux sous-unités fixant et hydrolysant l'ATP, permettant ainsi de fournir l'énergie nécessaire au transport (Köster, 2001).

Cette organisation oligomérique des perméases et des ATPases peut différer selon les voies sidérophores et les souches bactériennes. Par exemple, chez *E. coli*, l'import du fer par l'entérobactine fait intervenir au niveau de la membrane interne le transporteur FepBC<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, composé d'une PBP (FepB) et d'une perméase composée de deux protéines FepC associée à deux ATPase FepD (Shea & McIntosh, 1991). Pour le ferrichrome, le transporteur impliqué est FhuDBC<sub>2</sub> où les dimères de FhuB sont fusionnés en une chaîne polypeptidique pour former la perméase, l'ATPase FhuC existe sous deux copies pour former un dimère et FhuD est la PBP (A. Mademidis & Köster, 1998; Mademidis *et al.*, 1997). Il existe également des cas où il n'y pas de PBP décrites associées au transporteur ABC, comme pour la voie du sidérophore yersiniabactine chez *Yersinia pestis* (Perry & Fetherston, 2011).

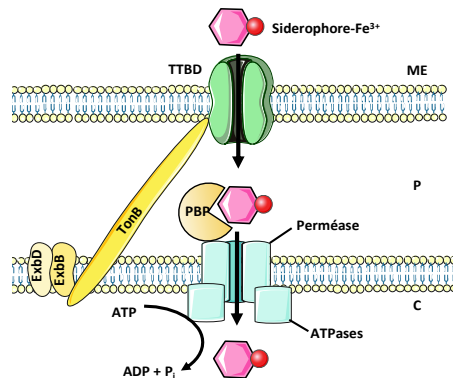
Malgré la diversité des transporteurs ABC et de leur substrat, les domaines de fixation de l'ATP partagent plusieurs motifs conservés (Krewulak & Vogel, 2008; Schneider & Hunke, 1998).

Ces motifs sont primordiaux pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP et comprennent :

- Le motif Walker A : GxxGxGKS/T (x étant n'importe quel autre acide aminé),
- Le motif Walker B : hhhD (h étant n'importe quel acide aminé hydrophobe),
- Une séquence « signature » : LSGGQQ/R/KQR, unique aux transporteurs ABC,
- Une région commutatrice possédant un résidu histidine,

- Une Q-loupe possédant un résidu de glutamine.

Contrairement au transport à travers la membrane externe, le transport via la membrane interne des sidérophores est moins spécifique. Les PBP associées peuvent fixer une variété de ligands différents. Par exemple, le transporteur FhuDBC<sub>2</sub> de chez *E. coli* transporte le ferrichrome mais aussi la ferrioxamine B, l'aérobactine et le coprogène, bien que ces ligands aient un TBBD spécifiques propres à chacun (Schalk & Guillon, 2013b).



**Figure n°10 : Représentation schématique du transport des sidérophores via la membrane interne par les transporteurs ABC.** ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasme, C : Cytoplasme.

#### e. Transport à travers les perméases

Des perméases pour lesquelles aucune PBP n'est associée sont également impliquées dans l'acquisition du fer par les sidérophores (O Cuiv *et al.*, 2004). Deux mécanismes hypothétiques ont été énoncés : soit le complexe sidérophore-fer est transféré directement du TBBD à la perméase présente au niveau de la membrane interne, soit le complexe diffuse librement dans le périplasme jusqu'à trouver le site de liaison sur la perméase. La force proton-motrice est la source d'énergie suggérée pour le transport mais non démontrée à ce jour (O Cuiv *et al.*, 2004; Schalk & Guillon, 2013b).

### IV) Mécanismes de dissociation des complexes sidérophores-Fer

Les complexes sidérophore-fer sont très stables thermodynamiquement. Or, le fer doit se dissocier du sidérophore afin d'être utilisé par la cellule. Trois grands mécanismes généraux de dissociation sont généralement proposés : dissociation par hydrolyse du sidérophore, dissociation impliquant une protonation des fonctions chélatrices et enfin, dissociation avec réduction du métal en fer ferreux qui est moins affiné avec le sidérophore (A. M. Albrecht-Gary & Crumbliss, 1998; Barchini & Cowart, 1996; Dhungana & Crumbliss, 2005). L'hydrolyse du sidérophore entraîne un surcoût métabolique qui n'est pas avantageux pour la bactérie puisque la synthèse de sidérophore est coûteuse en énergie et qu'il est possible de les recycler (Greenwood & Luke, 1978; Raymond *et al.*, 2003). La protonation des fonctions chélatrices



pourrait être la conséquence d'une acidification locale. Il est envisageable qu'une protéine tierce soit également impliquée dans ce mécanisme. La limite de cette hypothèse est qu'un pH acide même local n'est pas forcément compatible avec le pH physiologique à l'intérieur de la cellule (Schalk & Guillon, 2013b).

Enfin, la troisième option, faisant intervenir une réduction du fer ferrique en fer ferreux nécessite des agents réducteurs dont le potentiel redox doit être beaucoup plus négatif que celui du sidérophore. Il a en effet été montré que la plupart des sidérophores avaient un potentiel redox bien plus négatifs que la plupart des réducteurs biologiques comme l'ascorbate, le glutathion et le NADH (Creutz, 2002; Millis *et al.*, 1993; Williams & Yandell, 1982). Un tel scénario est donc envisageable dans la mesure où seraient impliqués une réductase spécifique et/ou un chélateur de fer ferreux. L'intervention d'un chélateur de fer ferreux aiderait à déplacer le potentiel redox du complexe sidérophore-fer vers une valeur plus positive par la formation d'un complexe ternaire (A. M. Albrecht-Gary & Crumbliss, 1998; Mies *et al.*, 2006). Ce chélateur peut également fournir une force thermodynamique suffisante pour la réduction par la formation d'un complexe très stable avec le fer ferreux (Boukhalfa & Crumbliss, 2002; Dhungana & Crumbliss, 2005; Spasojevic *et al.*, 1999)

Les études de la dissociation des complexes sidérophore-fer sont assez peu nombreuses dans la littérature. De celles menées, il en ressort que ce mécanisme est complexe. Il fait toujours intervenir une réduction du fer, associée ou non à une modification chimique du sidérophore. Cette modification a certainement pour but d'empêcher une nouvelle chélation du métal. Ce mécanisme diffère selon les sidérophores et bactéries, fait intervenir différents partenaires protéiques et peut se dérouler dans le périplasme ou le cytoplasme (Schalk & Guillon, 2013b). Certains mécanismes de dissociation de complexes sidérophores-fer dans les cellules bactériennes à Gram négatif ont ainsi été proposés ([Tableau n°3](#)) :

Chez *E. coli*, la dissociation de l'entérobactine est localisée dans le cytoplasme et fait intervenir d'abord une hydrolyse du sidérophore par une estérase (Fes) suivie d'une réduction du fer ferrique en fer ferreux par la réductase YqjH. Cette réductase catalyse la réaction de réduction à l'aide des cofacteurs FAD et NADPH pour le transfert d'électrons (Miethke *et al.*, 2011). YqjH peut également entraîner la dissociation d'autres complexes tris catéchols-Fe<sup>3+</sup> comme la vibriobactine et l'aérobactine (Miethke *et al.*, 2011).

La Salmochéline S4 (un dérivé de l'entérobactine doublement glycosylé) aurait un destin similaire chez *E. coli*. Jusqu'à présent, l'hypothèse avancée est que le complexe Salmochéline S4-Fe<sup>3+</sup>, une fois importé dans le cytoplasme, est fixé par l'estérase IroD qui va cliver la salmochéline en plusieurs produits de dégradation. La présence d'une réductase

cytoplasmique permettant ensuite la réduction du fer ferrique et par conséquent la libération du fer est fortement suggérée mais pas encore démontrée (Zhu *et al.*, 2005). Une autre protéine de type hydrolase, IroE, localisée dans le périplasme pourrait avoir un rôle dans la dissociation avant l'action de IroD. Elle est capable de cliver dans le périplasme la salmochéline S4 en une structure linéaire, la salmochéline S2, qui ensuite peut être clivée par IroD dans le cytoplasme. Toutefois, il a été montré que IroE clive de manière préférentielle l'apo-salmochéline et aurait donc un rôle uniquement dans la sécrétion du sidérophore sous forme linéarisé (H. Lin *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). Le rôle biologique exact de IroE reste à étudier.

La protéine FhuF, toujours chez *E. coli*, est une protéine cytoplasmique à centre Fer-Souffre capable de réduire le fer ferrique des sidérophores de type hydroxamates (desferrichrome, ferrioxamine B et coprogène) (Matzanke *et al.*, 2004). Dans le cas du desferrichrome, après réduction du fer, le sidérophore est acétylé afin de baisser son affinité pour le fer puis il est sécrété dans le milieu extracellulaire (Hartmann & Braun, 1980).

Chez *P. aeruginosa*, le ferrichrome est également acétylé après réduction dans le cytoplasme mais la réductase n'est pas identifiée (Hannauer *et al.*, 2010). La voie entérobactine chez *P. aeruginosa* fait également intervenir une estérase PfeE dans le périplasme qui clive le sidérophore en trois molécules d'acide 2,3-dihydroxybenzoïque. Le fer est ensuite libéré par réduction, néanmoins la réductase n'est pas déterminée ainsi que la localisation cellulaire du mécanisme (Perraud *et al.*, 2018).

Le seul exemple à ma connaissance de dissociation de complexe sidérophore-fer dans le périplasme concerne la voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*. Ce mécanisme sera décrit dans le chapitre suivant et fait intervenir une réduction du fer et une protéine chélatrice de fer ferreux.

De manière générale, les ferri-reductases décrites chez les bactéries à Gram négatif, impliquées dans divers mécanismes d'homéostasie du fer, utilisent le NADH ou le NADPH comme donneur d'électron pour la réduction du fer et utilisent des cofacteurs de types flavines (FMN, FAD, riboflavine)(Schröder *et al.*, 2003). Des protéines à centre Fer-Souffre, à l'exemple de FhuF chez *E. coli*, sont également retrouvées.

**Tableau n°3 : Mécanismes et localisation de la dissociation des complexe sidérophore-fer chez les bactéries (quelques exemples). ND= Non déterminé**

Sidérophores	Espèce	Localisation de la dissociation	Mécanismes impliqués dans la dissociation	Référence
<b>Entérobactine</b>	<i>Pseudomonas</i>	ND	Hydrolyse du sidérophore (Estérase PfeE) Réduction (Réductase à déterminer)	(Perraud <i>et al.</i> , 2018)
<b>Tris-catéchols</b>	<i>E. coli</i>	Cytoplasme	Hydrolyse du sidérophore (Estérase Fes) Réduction par YqjH (NDAPH/FAD réductase dépendante).	(H. Lin <i>et al.</i> , 2005; Miethke <i>et al.</i> , 2011)
<b>Salmochéline</b>	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Périplasme et cytoplasme	Hydrolyse et modification du sidérophore (IroD) Probable réduction du fer (à déterminer)	(Zhu <i>et al.</i> , 2005)
<b>Ferrichrome</b>	<i>Pseudomonas</i>	Cytoplasme	Probable réduction (réductase à déterminer) et acétylation du sidérophore (FiuC).	(M. Hannauer <i>et al.</i> , 2010a)
<b>Hydroxamates</b>	<i>E. coli</i>	Cytoplasme	Réduction (FhuF) puis acétylation du sidérophore (desferrichrome)	(Matzanke <i>et al.</i> , 2004)



## Chapitre III

### **Mécanismes d'acquisition du fer par les sidérophores endogènes chez *P.* *aeruginosa***

*P. aeruginosa* encode dans son génome de nombreuses voies d'acquisition du fer. Un exemple illustrant cette diversité est le nombre de TBDTs encodés et prédits dans son génome, qui se chiffre à 35. Sur les 35 TBDTs prédits, les substrats transportés ont été identifiés pour certains d'entre eux (**Tableau n°4**). Ils ne sont pas tous impliqués dans l'assimilation du fer mais peuvent être impliqués dans l'utilisation d'autres métaux comme le cobalt et le zinc. Ce nombre élevé de TBDTs encodés dans le génome de *P. aeruginosa* montre que la bactérie est capable d'exploiter un grand nombre de sidérophores qu'elle ne produit pas. En effet, *P. aeruginosa* utilise plusieurs voies d'acquisition du fer. Tout d'abord, la bactérie produit deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline. Elle peut également utiliser des exosidérophores et possède trois voies d'import du fer via la molécule d'hème, ainsi qu'une voie d'import du fer ferreux. Nous allons nous intéresser tout d'abord aux sidérophores endogènes dans ce chapitre, puis nous verrons les autres mécanismes d'acquisition du fer en **Chapitre IV**.

**Tableau n°4 : Exemples de TBDTs confirmés chez *P. aeruginosa* et substrats associés.** \*Le substrat suivi d'un astérisque signifie qu'il s'agit d'un sidérophore.

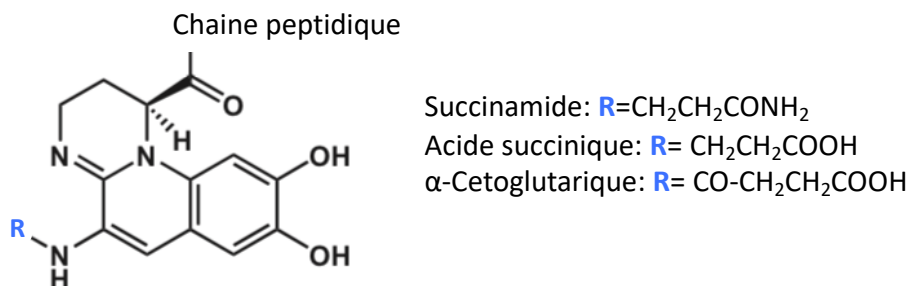
Nom du TBTD	Sidérophores ou molécules transportées	Référence
<b>FpvA/FpvB</b>	Pyoverdine*	(Ghysels <i>et al.</i> , 2004; Schalk <i>et al.</i> , 1999)
<b>FptA</b>	Pyochéline*	(R G Ankenbauer & Quan, 1994)
<b>PfeA</b>	Entérobactine*	(Dean & Poole, 1993)
<b>ChtA</b>	Aérobactine*, rhizobactine*	(Cuiv, 2006)
<b>FvbA</b>	Vibriobactine*	(Elias <i>et al.</i> , 2011)
<b>PirA</b>	Entérobactine* et dérivés catécholés	(Ghysels <i>et al.</i> , 2005)
<b>CirA</b>	Sidérophore de type catéchol*	(Pierre Cornelis & Bodilis, 2009)
<b>FecA</b>	Citrate*	(Marshall <i>et al.</i> , 2009)
<b>FemA</b>	Mycobactine*	(Maria A. Llamas <i>et al.</i> , 2008)
<b>FiuA</b>	Ferrichrome*	(Hannauer <i>et al.</i> , 2010a)
<b>FoxA</b>	Ferrioxamine*	(M. A. Llamas <i>et al.</i> , 2006)
<b>PhuR</b>	Hème	(Urs A Ochsner <i>et al.</i> , 2000)
<b>HxuA</b>	Hème	(Otero-Asman <i>et al.</i> , 2019)
<b>HasR</b>	Hème	(Urs A Ochsner <i>et al.</i> , 2000)
<b>CntO</b>	Pseudocaline (transport du zinc)	(Lhospice <i>et al.</i> , 2017)
<b>Btub</b>	Vitamine B12, Cobalamine	(Pierre Cornelis & Bodilis, 2009)
<b>OprC</b>	Transport du Cuivre	(Pierre Cornelis & Bodilis, 2009)

## l) La voie pyoverdine

### a. Structure de la pyoverdine

Les *Pseudomonas* fluorescents sont les seules bactéries de la famille *Pseudomonas* à produire et synthétiser le sidérophore pyoverdine (Pvd). La caractéristique phénotypique majeure de la production de Pvd est de donner la couleur vert/jaune aux souches la produisant en culture en solution aqueuse. Plusieurs variantes de Pvd sont synthétisées par les *Pseudomonas* fluorescents. Cependant, elles sont toutes composées (Meyer, 2000) (**Figure n°11**) :

1. d'un chromophore de type 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, dont les propriétés confèrent la couleur jaune/verte caractéristique de ces molécules.
2. une chaîne latérale attachée en position C3 du chromophore, qui peut être un acide dicarboxylique ou son amide correspondant,
3. une chaîne peptidique spécifique attachée à la partie non aromatique en position C1 du chromophore.



**Figure n° 11 : Structure du chromophore de type dihydroquinoline présent chez toutes les Pvd.** Différents exemples de chaînes peptidiques sont présentés dans le tableau n°5. La chaîne latérale R peut être : un succinate, un succinamide, un malate, un malamide, un glutamate ou encore un  $\alpha$ -cetoglutarate (Adapté d'après Schalk et Guillon, 2013a).

Les différences structurales des Pvd produites par les *Pseudomonas* fluorescents viennent de la variabilité de la chaîne latérale et surtout de la longueur et de la séquence de la chaîne peptidique. La chaîne latérale est généralement un diacide provenant du cycle de Krebs comme par exemple l'acide succinique, l'acide malique, un glutamate ou encore un  $\alpha$ -cetoglutarate (**Figure n°15**). La chaîne peptidique varie entre 6 à 12 acides aminés. La particularité de cette chaîne est qu'elle va contenir des acides aminés spéciaux tels que des D-isomères ou encore des acides aminés atypiques que l'on ne retrouve pas dans les protéines de manière générale. Cette chaîne peptidique spécifique est également la base de la reconnaissance sélective entre une Pvd et son TBDT associé (Greenwald *et al.*, 2009) (**Tableau n°5**).

**Tableau n° 5 : Exemples de chaînes peptidiques en fonction des espèces de *Pseudomonas fluorescents* et des différentes souches.**

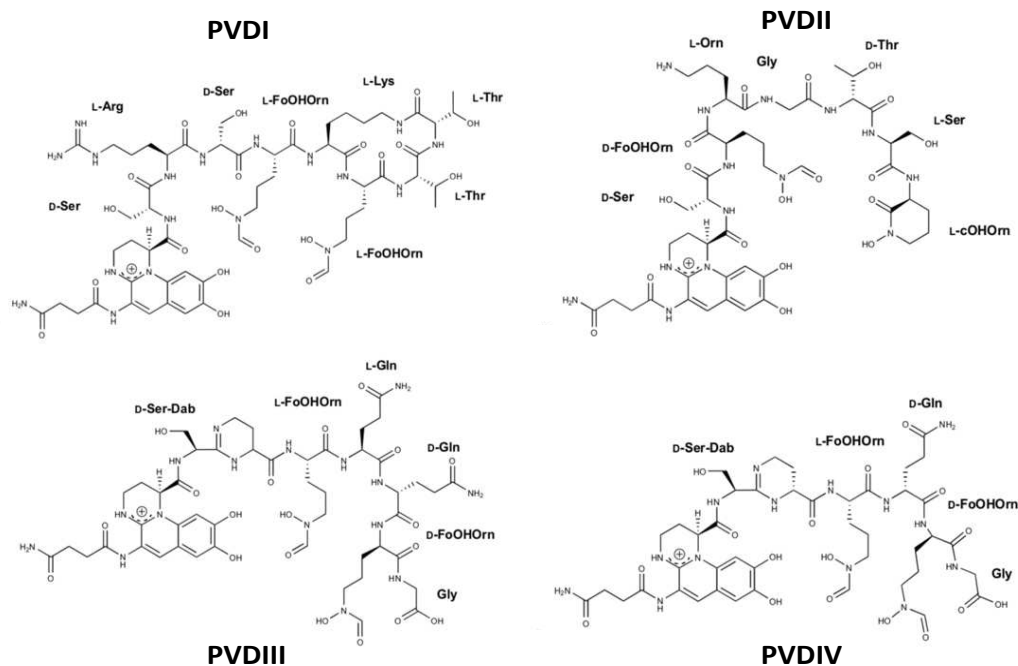
**Abréviations** : OHAs, threo-β-hydroxy aspartate ; Dab, 2,4-diaminobutyrate ; OHOrn, Nd-hydroxyornithine ; AcOHOrn, N4-acetyl-N4-hydroxyornithine ; fOHOrn, Nd-formyl-Nd-hydroxyornithine. Les crochets [ ] indiquent un peptide cyclique. PM : Poids Moléculaire en Dalton.

Siderovars	Espèces	PM (Da)	Chaîne peptidique des Pvds	Référence
<b>PAO1</b>	<i>P. aeruginosa</i>	1333	Ser-Arg-Ser-FoOHOrn-[Lys-FoOHOrn-Thr-Thr]	(G. Briskot <i>et al.</i> , 1986)
<b>Pa6</b>	<i>P. aeruginosa</i>	1172	Ser-Dab-FoOHOrn-Gln-Gln-FoOHOrn-Gly	(Gipp <i>et al.</i> , 1991)
<b>G173</b>	<i>P. fluorescens</i>	1174	Ser-Ala-AcOHOrn-[Orn-Asp-AcOHOrn-Ser]	(Fernandez <i>et al.</i> , 2003)
<b>13525</b>	<i>P. fluorescens</i>	1160	Ser-Lys-Gly-FOHorn-[Lys-FOHOrn-Ser]	(U. Hohlneicher <i>et al.</i> , 1995)
<b>D-TR1</b>	<i>P. chlororaphis</i>	1230	Asp-FoOHOrn-Lys-[Thr-Ala-Ala-FoOHOrn-Ala]	(Barelmann <i>et al.</i> , 2003)

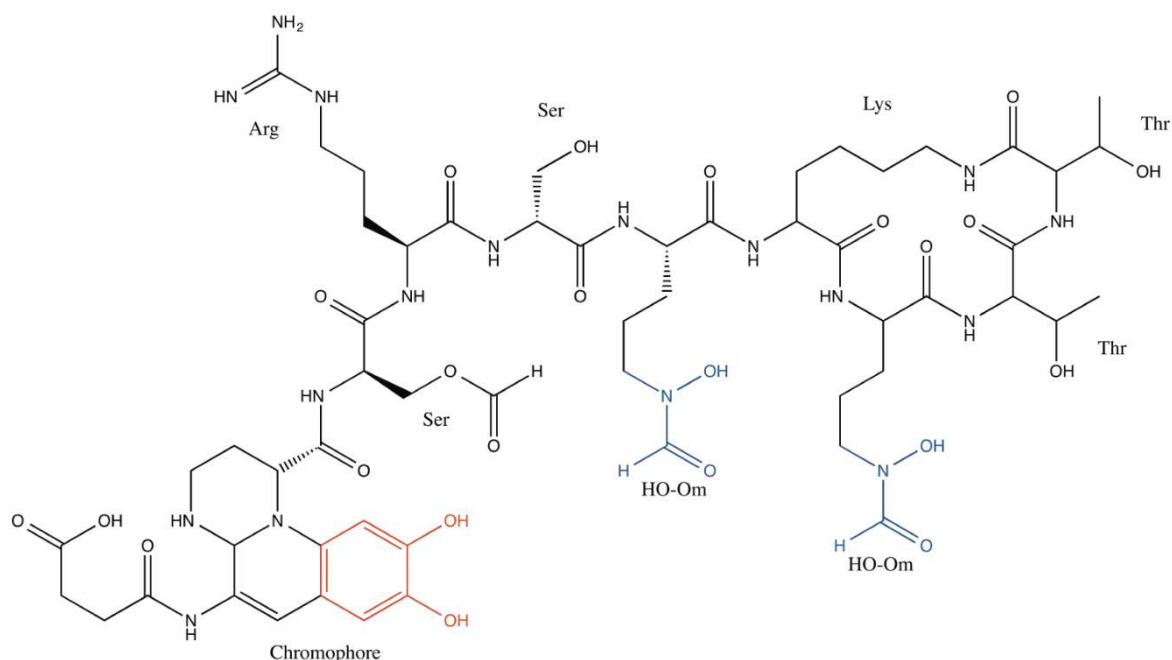
La diversité des Pvds a permis de les utiliser comme marqueurs taxonomiques pour l'identification des souches bactériennes par une approche de sidérotypage (Meyer *et al.*, 2008). Le sidérotypage se base sur la séquence des chaînes peptidiques et la nature de la chaîne latérale que possèdent les Pvds. Les Pvds vont donc avoir des points isoélectriques différents (pHi) en fonction des variations structurales des chaînes peptidiques et latérales. Cela permet de les caractériser par focalisation isoélectrique. Cette technique a permis d'identifier plus de 100 Pvds chez les *Pseudomonas fluorescents*.

Les souches de l'espèce *P. aeruginosa* sont capables de produire 4 Pvds différentes ayant chacune une séquence peptidique différente, chacune pouvant exister sous différents isoformes avec une chaîne latérale différente (**Figure n°12**) (Meyer *et al.*, 1997 Ruangviriyachai *et al.*, 2001). Ce manuscrit se concentre essentiellement sur la PvdI produite par PAO1 et dont le Poids Moléculaire (PM) est de 1333 Da (Gernot Briskot *et al.*, 1989). C'est la voie d'import du fer dépendant de PvdI qui a été le plus étudiée. Cette molécule chélate le fer ferrique, avec une stœchiométrie PvdI:Fe de 1:1 et par deux groupements hydroxamates et la fonction catéchol du chromophore (**Figure n°13**) avec une affinité de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (A.-M. Albrecht-Gary *et al.*, 1994).





**Figure n°12 :** Les quatre différentes Pvd's produites par *P. aeruginosa*. La chaîne latérale est ici un succinamide. Figure modifiée d'après (Cezard *et al.*, 2014).



**Figure n° 13 :** Structure de la PvdI produite par *P. aeruginosa* PAO1. Les groupements impliqués dans la chélation du fer ferrique sont le catéchol (en rouge) et les deux groupements hydroxamates (en bleus). La chaîne latérale R peut être : un succinate, un succinamide, un malate, un malamide, un glutamate ou encore un alpha-cetoglutarate

## b. Synthèse et sécrétion de la PvdI

Le locus Pvd correspond à une partie du génome de *P. aeruginosa* où sont regroupés les différents gènes codant pour des protéines diverses, impliquées dans la biosynthèse, l'import et la régulation de la voie PvdI (Figure n°14) (Ravel & Cornelis, 2003).

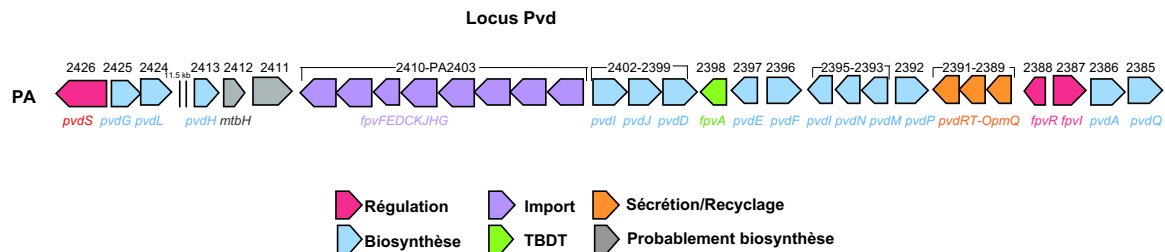


Figure n°14 : Organisation génomique du locus Pvd chez *P. aeruginosa* PAO1.

### 1. Biosynthèse du précurseur de la PvdI

Le précurseur de la PvdI est un peptide de 11 acides aminés assemblé dans le cytoplasme de la bactérie et dont les 3 résidus en N-terminal se cyclisent dans le périplasma pour former le chromophore. La synthèse du peptide implique 4 NRPS : PvdL, PvdI, PvdD et PvdJ (Lehoux *et al.*, 2000; Merriman *et al.*, 1995; Mossialos *et al.*, 2002). Durant toute la phase d'assemblage du précurseur, un acide myristique ou myristoléique est lié en N-terminal au peptide et permet probablement son ancrage dans la membrane cytoplasmique et évite sa diffusion dans le cytoplasme (Hannauer *et al.*, 2012b) (Figure n°15).

L'assemblage de la PvdI fait intervenir en premier PvdL qui est une NRPS atypique ne possédant pas de domaine C-terminal mais un module M1 similaire aux acyl-coenzyme A ligases. Cela lui permet d'incorporer la chaîne myristique ou myristoléique et non un acide aminé (Mossialos *et al.*, 2002; Ravel & Cornelis, 2003; Yeterian *et al.*, 2010). PvdL comporte 3 autres modules qui incorporent successivement l'acide L-glutamique (L-Glu), la L-tyrosine (L-Tyr) et le L-2,4-diaminobutyrate (L-Dab) (Mossialos *et al.*, 2002). La synthèse se poursuit avec la NRPS PvdI qui insère successivement une L-Sérine (L-Ser), une L-Arginine (L-Arg), une L-Sérine et une L-fOHOrn (Lehoux *et al.*, 2000; Ravel & Cornelis, 2003). Ensuite, PvdJ, avec ses deux modules, intègre une L-Lysine (L-Lys) et une L-fOHOrn. La biosynthèse du précurseur de la PvdI se termine par l'intervention de la NRPS PvdD qui incorpore deux L-thrénine (L-Thr). Le dernier module de PvdD possède un domaine thioestérase qui va permettre la libérer le précurseur de la PvdI (Ackerley *et al.*, 2003; Merriman *et al.*, 1995).

Deux gènes codant pour des thioestérases, PA2411 et *pvdG*, faisant aussi parti du locus Pvd, seraient également impliqués dans la biosynthèse de la PvdI et pourraient intervenir dans l'étape de libération du peptide des NRPS (Iain L. Lamont & Martin, 2003). Enfin, une protéine

auxiliaire, PA2412 appartenant à la famille des protéines MtbH-like, dont le rôle est d'augmenter l'efficacité du domaine A des NRPS en améliorant l'adénylation des acides aminés, pourrait aussi être directement impliquée dans la production de PvdI (Drake *et al.*, 2007; Felnagle *et al.*, 2010). L'implication de ces protéines codées par les gènes PA2411 et *pvdG* dans la biosynthèse de la PvdI reste à être étudié.

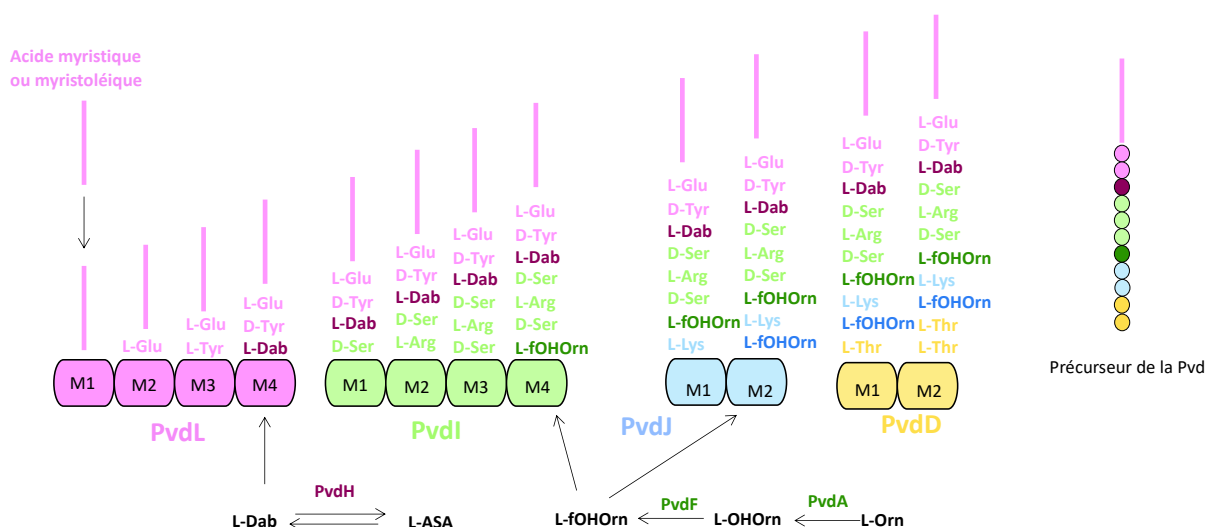
## 2. Synthèse des acides aminés atypiques

Comme il a été décrit précédemment, la PvdI possède deux acides aminés non conventionnels dans sa partie peptidique : le L-Dab et le L-fOHOrn. Ces deux acides aminés sont synthétisés par d'autres enzymes qui ne sont pas des NRPS : PvdH, PvdF et PvdA (Figure n°15).

Le L-Dab est synthétisé par l'enzyme PvdH qui est une aminotransférase. PvdH va catalyser la formation de L-Dab à partir de L-aspartate-β-semialdéhyde (Vandenende *et al.*, 2004).

La L-fOHOrn est synthétisée par PvdF et PvdA à partir de L-ornithine. PvdA catalyse la réaction d'hydroxylation et PvdF la réaction de formylation (Ge & Seah, 2006; McMorran *et al.*, 2001; P Visca *et al.*, 1994).

D'autres acides aminés atypiques peuvent être retrouvés dans les pyoverdines en fonction des souches de *Pseudomonas* comme par exemple : la β-hydroxy histidine, l'ornithine, le cyclo-N5-hydroxy ornithine (Cezard *et al.*, 2014) et certains enzymes impliqués dans leur synthèse ont été identifiés comme par exemple PvdY intervenant dans la synthèse de PvdII (Iain L. Lamont *et al.*, 2006).



**Figure n° 15 : Biosynthèse de la PvdI dans le cytoplasme et enzymes impliqués.** Le M correspond aux différents modules des NRPS. Adapté d'après Gasser *et al.*, 2015 et Schalk *et al.*, 2020.

### 3. Transport et maturation dans le périplasme

Le précurseur de la PvdI avec en N-terminal la chaîne myristique ou myristoléique est transporté dans le périplasme par le transporteur de membrane interne PvdE (Yeterian *et al.*, 2010). C'est dans ce compartiment cellulaire que le peptide va subir différentes étapes de maturation pour former la PvdI mature. Le premier enzyme impliqué est l'hydrolase PvdQ qui hydrolyse la chaîne myristique ou myristoléique pour donner la ferribactine (Drake & Gulick, 2011; Yeterian *et al.*, 2010). Le chromophore va ensuite se cycliser : les premières étapes sont des réactions d'hydroxylation et d'oxydation impliquant la tyrosinase PvdP, qui permet ainsi la formation de la dihydropyoverdine (Nadal-Jimenez *et al.*, 2014; Poppe *et al.*, 2018). L'oxydation finale de la dihydropyoverdine en PvdI mature est médiée par l'enzyme PvdO (Ringel *et al.*, 2018). Enfin, les protéines PvdN et PtaA sont responsables de la conversion du résidu L-Glu (le premier résidu de la PvdI accrochée en C3 du chromophore) en différents isoformes de Pvd, tel que l'acide succinique, alpha-cetoglutarique, le succinamide, le malamide ou encore acide malique (**Figure n°20**) (Ursula Hohlneicher *et al.*, 2001; Ringel *et al.*, 2016, 2017). Les synthèses des Pvds produites par d'autres espèces de *Pseudomonas* fluorescents sont très certainement comparables à ce qui a été décrit pour la PvdI de *P. aeruginosa* PAO1. L'assemblage du peptide ferait intervenir d'autres NRPS, excepté PvdL, qui est très conservée parmi les *Pseudomonas* fluorescents. En effet comme toutes les PvdS possèdent le même chromophore, la biosynthèse impliquerait toujours PvdL et l'incorporation de la chaîne myristique ou myristoléique, puis successivement l'acide L-glutamique (L-Glu), la L-tyrosine (L-Tyr) et le L-2,4-diaminobutyrate (L-Dab).

Les différentes NRPS participant à la biosynthèse de la PvdI sont organisées sous la forme d'un complexe multienzymatique appelé sidérosome associé à la membrane interne (Gasser *et al.*, 2015; Francesco Imperi & Visca, 2013). De plus il a été démontré par une approche de microscopie de fluorescence à haute résolution et de FRET (Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes) que PvdA interagissait physiquement avec les enzymes PvdJ, PvdI, PvdL et PvdD (Gasser *et al.*, 2020). Ce mode d'organisation en sidérosome permettrait une meilleure efficacité du transfert du substrat entre les enzymes jusqu'à sa sécrétion et ainsi éviterait la diffusion du sidérophore en cours de synthèse dans le cytoplasme. Ce mode d'organisation pourrait être conservé chez les bactéries afin d'éviter la diffusion de composé toxique à travers le cytoplasme.

### 4. Sécrétion dans le milieu extracellulaire

La PvdI mature est ensuite sécrétée dans l'environnement extracellulaire par PvdR-PvdT-OpmQ (**Figure n°16**) une pompe à efflux ATP dépendante dont les gènes sont également sur le locus de la PvdI (Hannauer *et al.*, 2010b). Cette pompe se compose de PvdT, une ATPase

localisée dans la membrane interne, OpmQ, une porine localisée dans la membrane externe et PvdR, une protéine périplasmique reliant OpmQ et PvdT. Cependant, il a été montré qu'un mutant délété pour les trois gènes *pvdR*, *pvdT* et *opmQ* est toujours capable de sécréter dans le milieu extracellulaire de la PvdI fluorescente. Ces résultats indiquent qu'un ou plusieurs autres systèmes sont impliqués dans la sécrétion du sidérophore (Hannauer *et al.*, 2010b). Une autre pompe d'efflux, MexAB-OprM avait d'abord été proposée comme candidat dans l'export de la PvdI chez *P. aeruginosa* (Keith Poole *et al.*, 1993) avant que cette hypothèse ne soit réfutée (Hannauer *et al.*, 2010b; Imperi *et al.*, 2009).

Chez d'autres souches de *Pseudomonas*, plusieurs systèmes sont impliqués dans la sécrétion de sidérophores. Chez *P. putida*, l'homologue de PvdRTOpmQ est impliqué dans la sécrétion de la PvdI, ainsi qu'une seconde pompe, MdtABC-OpmB qui est homologue à une pompe responsable de la sécrétion de sidérophores chez *E. coli*. Cependant, la mutation des deux systèmes n'abolit pas complètement la sécrétion de la PvdI, ce qui laisse supposer qu'un autre système non identifié est encore impliqué (Henríquez *et al.*, 2019; Horiyama & Nishino, 2014). Chez *P. tawainensis*, une étude a montré que les pompes PvdRTOpmQ et MexAB-Oprm n'étaient pas impliquées dans la sécrétion de la Pvd mais que celle-ci était sécrétée via le système de sécrétion de type 6 (Chen *et al.*, 2016). Il est ainsi relativement clair que les systèmes de sécrétion de la PvdI vont être très dépendants de la souche de *Pseudomonas* et que plusieurs systèmes différents peuvent être impliqués ([Tableau n°6](#)).

**Tableau n°6 : Comparaison des systèmes de sécrétion de la Pvd impliqués dans différentes souches de *Pseudomonas*.**

Souches	Localisation	Systèmes impliqués	Systèmes potentiellement impliqués	Référence
<i>Pseudomonas putida</i>	Sol	<b>PvdRTOpmQ</b> <b>MdtAB-OpmB</b>	<b>T6SS ?</b>	(Henríquez <i>et al.</i> , 2019)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Plantes et sols	<b>PvdRTOpmQ</b>	<b>T6SS ?</b>	(Ringel <i>et al.</i> , 2018)
<i>Pseudomonas tawainensis</i>	Sols	<b>T6SS</b>	Inconnu	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ubiquitaire	<b>PvdRTOpmQ</b>	<b>T6SS ?</b>	(Hannauer <i>et al.</i> , 2010b)

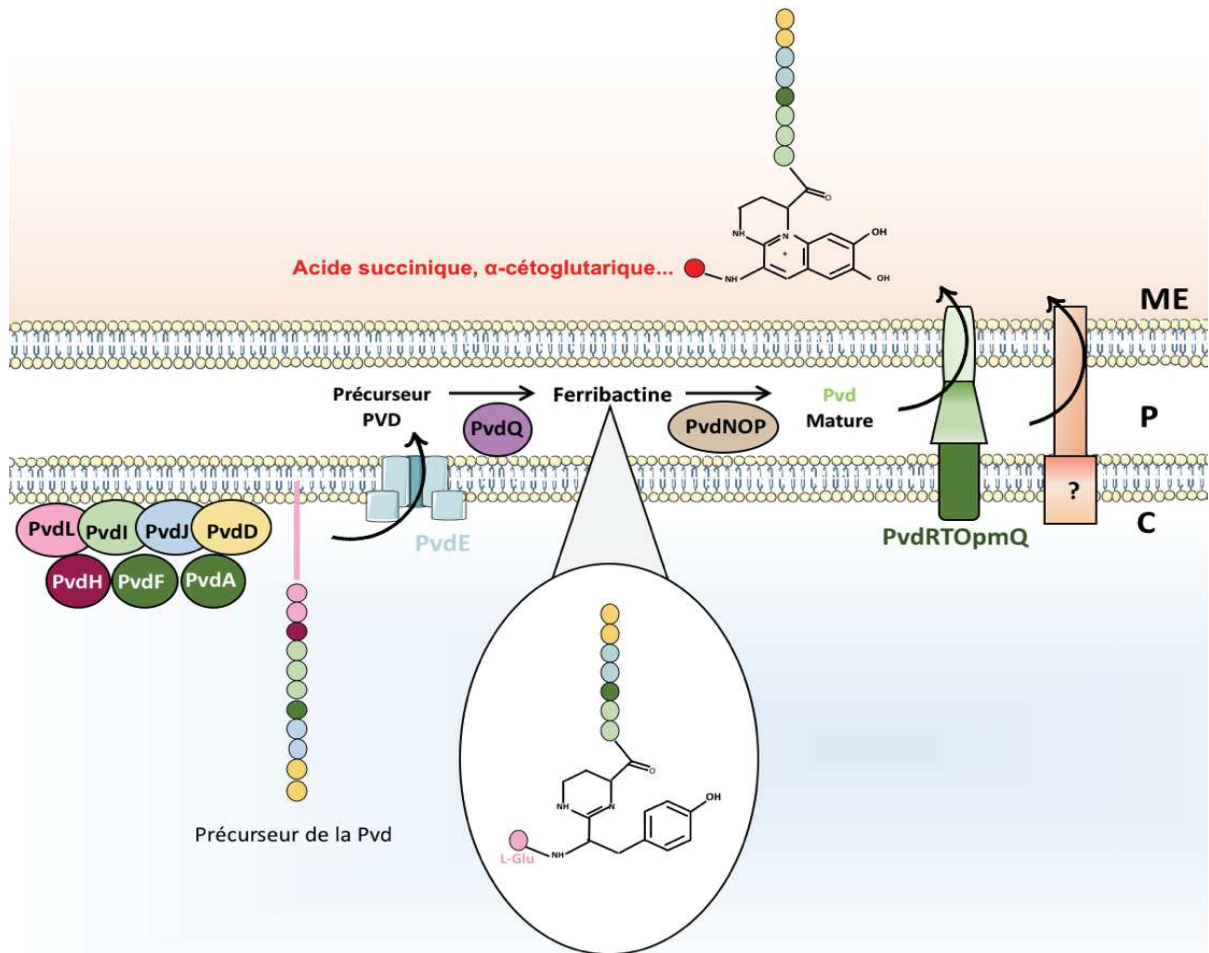


Figure n° 16 : Biosynthèse, maturation et sécrétion de la PvdI chez *P. aeruginosa*. ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma, C : cytoplasme.

### c. Import du fer par la PvdI au travers de la membrane externe

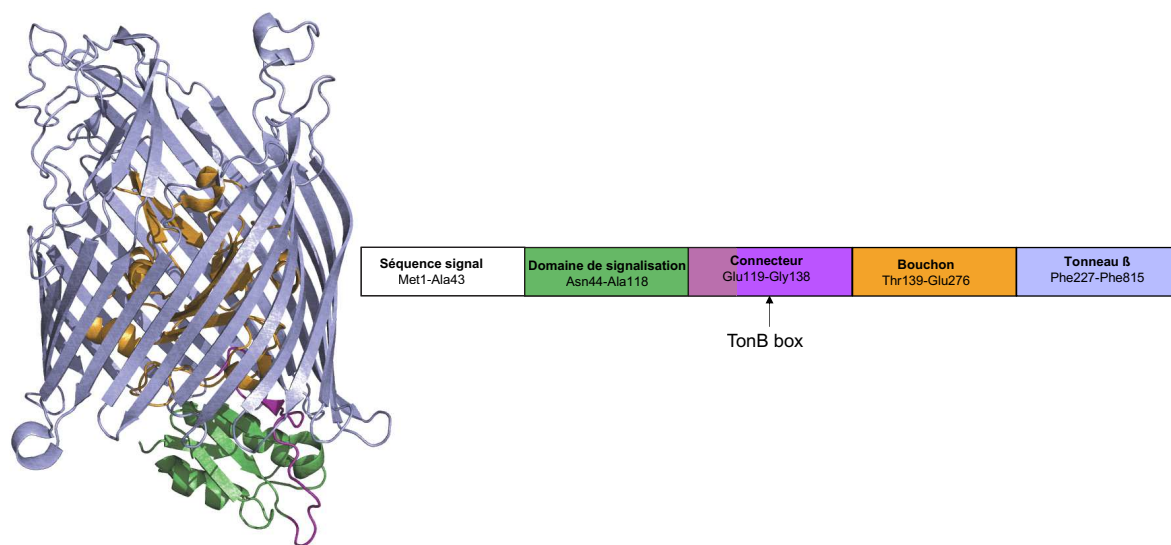
#### 1. Implication des transporteurs FpvA et FpvB

Après avoir été sécrétée dans le milieu extracellulaire, la PvdI mature est capable de lier le fer ferrique avec une très forte affinité. Le complexe PvdI-Fe est ensuite reconnu à la surface de la bactérie par un transporteur de membrane externe pour y être transloqué dans le périplasma. Deux transporteurs chez *P. aeruginosa* PAO1 sont impliqués dans l'import de PvdI-Fe : FpvAI (FpvA est utilisé pour faciliter la lecture dans ce manuscrit) et FpvB. Il est tout de même important de noter qu'en fonction des PvdS produites par les Pseudomonas, des transporteurs FpvA avec des spécificités de liaison différentes vont être exprimés pour importer les différents complexes PvdI-Fe. A chaque Pvd est en fait associé un transporteur FpvA spécifique. Le [tableau n°7](#) résume cette diversité. Dans cette partie comme dans les autres, on s'intéressera au cas de *P. aeruginosa* PAO1 (première ligne du tableau).

**Tableau n°7 : Récepteurs TonB dépendant pour le sidérophore Pvd chez les Pseudomonas.**

Type de Pvd	Récepteurs associés	Référence
<b>PvdI (Pvd)</b>	FpvAI (FpvA), FpvB	(P Cornelis <i>et al.</i> , 1989; Ghysels <i>et al.</i> , 2004; Schalk <i>et al.</i> , 1999, 2001)
<b>PvdII</b>	FpvAII, FpvAIII	(P Cornelis <i>et al.</i> , 1989; Ghysels <i>et al.</i> , 2004)
<b>PvdIII</b>	FpvAIII, FpvB ?	(P Cornelis <i>et al.</i> , 1989; Ghysels <i>et al.</i> , 2004)
<b>PvdIV</b>	FpvAIV	(Ruangviriyachai <i>et al.</i> , 2001)

Comme les autres transporteurs de la famille TBDT, le transporteur FpvA se compose de 22 brins antiparallèles repliés sous la forme d'un tonneau  $\beta$ . Les feuilletts du tonneau sont reliés entre eux par de longues boucles extracellulaires et de petites boucles périplasmiques. Le pore du tonneau est occupé par le domaine N-terminal globulaire composé de 4 feuilletts  $\beta$  entourés d'hélice alpha et de petites boucles (Brillet *et al.*, 2007; Cobessi, Celia, Folschweiller, *et al.*, 2005). Ce domaine N-terminal forme le bouchon dans le pore du tonneau (Cobessi *et al.*, 2005). Le bouchon est connecté à un domaine de signalisation périplasmique formé de deux hélices alpha entourées de deux feuilletts  $\beta$  (Wirth *et al.*, 2007). Le bouchon et le domaine de signalisation sont séparés par une petite séquence peptidique, ou connecteur, qui comporte la boîte TonB dont la séquence pour FpvA correspond à Asp126-Leu127-Thr130-Ile132-Thr133 (Brillet *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007). Le travail de Brillet *et al.*, 2007 a permis de montrer que cette boîte TonB est repliée et est l'un des brins du feuillet  $\beta$  formé avec le domaine de signalisation. La boîte TonB permet au transporteur FpvA d'interagir avec le complexe de membrane interne TonB-ExbB-ExbD et est donc essentielle pour le fonctionnement du transporteur. Le domaine de signalisation interagit au niveau du périplasma avec le facteur anti-sigma FpvR et permet la régulation de la transcription et de l'expression de FpvA (Voir **Chapitre V** sur la régulation) (**Figure n°17**).



**Figure n°17 :** Structure de l'apo-FpvA. D'après Brillet *et al.*, 2007 (PDB=2O5P).

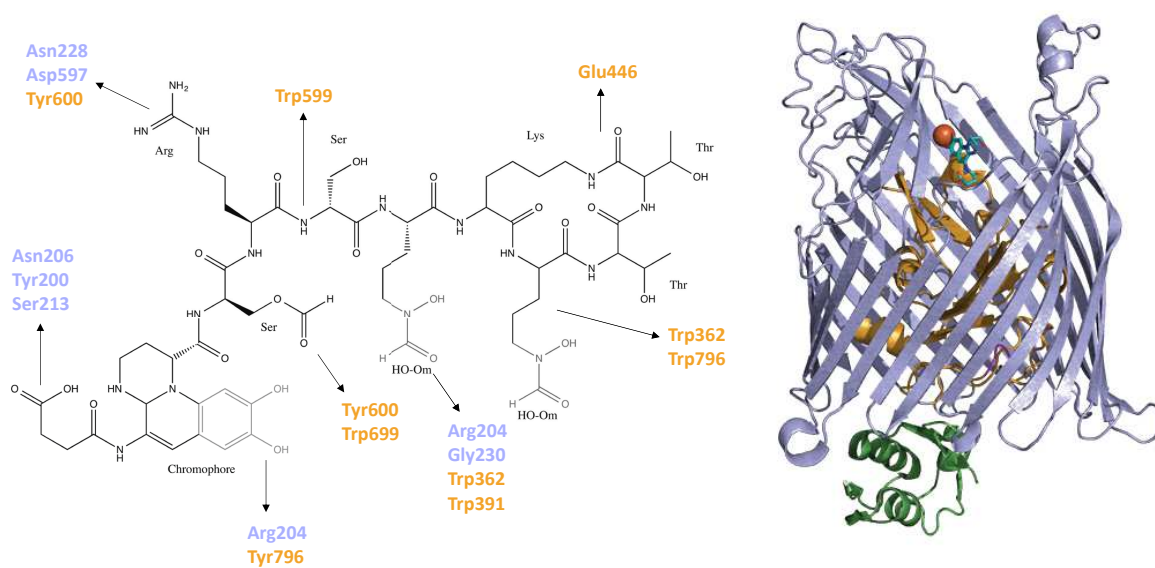
FpvB, le second transporteur de la PvdI a été découvert en 2004 par Ghysels *et al.* C'est la seule étude au niveau moléculaire qui existe dans la littérature concernant ce transporteur. Ils ont montré qu'un double mutant (délétion des deux gènes *fpvA* et *fpvB*) étaient incapable d'utiliser la PvdI pour acquérir le fer, et que la transcription du gène *fpvB* était régulé par la présence de fer dans le milieu. De plus, ils ont montré que FpvB avait une spécificité de liaison plus large et était capable d'importer le complexe PvdII-Fe et la pyocine (Ghysels *et al.*, 2004). Néanmoins, il n'existe pas de données structurales de ce transporteur alternatif. Son efficacité dans l'import du complexe Pvd-Fe semble être moins important que FpvA (données du laboratoire).

## 2. Le site de liaison de PvdI-Fe sur FpvA

Le site de liaison du complexe PvdI-Fe sur FpvA est hydrophobe et se compose de résidus d'acides aminés essentiellement aromatiques (**Figure n°18**). Ces résidus sont localisés à la fois sur le bouchon ainsi que dans les boucles extracellulaires du tonneau (Shen *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2007). Le complexe PvdI-Fe interagit avec le bouchon *via* son chromophore tandis que la partie peptidique du sidérophore interagit plutôt avec le tonneau β et les boucles extracellulaires (Wirth *et al.*, 2007). Il a été montré que certains résidus des boucles extracellulaires (Boucles L4, L7, et L9 et respectivement résidus W434, S603 et G701) étaient importants pour la fixation du complexe PvdI-Fe (Nader *et al.*, 2007). Le complexe PvdI-Fe se lie à FpvA avec une affinité de l'ordre de 0.5 nM (Schalk *et al.*, 2001). La reconnaissance de la PvdI par le site de liaison du transporteur FpvA est très spécifique et la partie peptidique du sidérophore détermine cette spécificité (Greenwald *et al.*, 2009). En effet, dans le complexe PvdI-Fe, la chaîne peptidique est, en quelque sorte, enroulée autour du fer mais laisse un large



espace accessible. L'orientation de cet espace laissé pour le métal va varier selon les PvdI et des acides aminés qui la composent. Ceci suggère que la position de la chaîne peptidique par rapport au fer constitue une des caractéristiques qui confèrent la reconnaissance spécifique du transporteur TDBT associé (Wasielewski *et al.*, 2008). Pour une même PvdI sécrétée en solution, Wasielewski et ses collègues ont montré qu'il existait en effet deux configurations de la sphère de coordination du métal (conformères A et B). Un seul de ces deux conformères est reconnu et fixé au transporteur FpvA. Cela confirme ainsi la stéréospécificité liée au TDBT. Le domaine de signalisation change également de conformation après fixation de PvdI-Fe (Figure n°18).



#### d. Mécanisme de dissociation du fer de la PvdI chez *P. aeruginosa*

Le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI a été étudié essentiellement au sein de notre équipe en utilisant les propriétés spectrales de la PvdI. En effet, de par la présence de son chromophore, la PvdI possède des propriétés spectrales très intéressantes. Elle a un maximum absorption à 400 nm à pH neutre sous sa forme apo. En revanche lorsque la PvdI est complexée au fer, un second pic d'absorption apparaît à 450 nm. Sous sa forme apo, ce sidérophore est également fluorescent et émet de la fluorescence à 447 nm. Lorsque la PvdI est complexée au fer, la fluorescence est éteinte. Ces propriétés spectrales permettent de

suivre la dissociation du complexe PvdI-Fe en temps réel et directement dans les bactéries : l'augmentation de fluorescence correspondant à l'apparition d'apo-PvdI ([Figure n°19](#)).



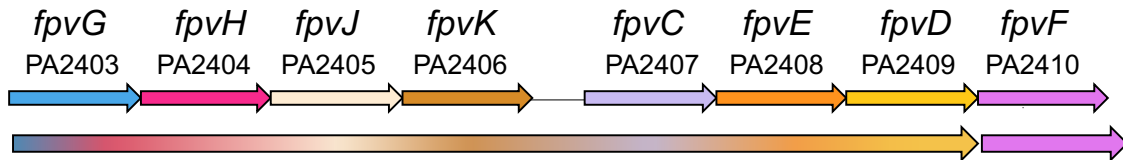
[Figure n°19](#) : Propriétés spectrales de la PvdI.

La première expérience a montré que la PvdI après avoir transporté le fer dans les cellules de *P. aeruginosa* était recyclée dans le milieu extracellulaire (Schalk *et al.*, 2002). Ce recyclage a été suivi en mesurant l'apparition de fluorescence liée à l'apo-PvdI dans le milieu extracellulaire. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que cette PvdI recyclée avait la même masse molaire que la PvdI nouvellement synthétisée, démontrant ainsi que la PvdI dans le processus de dissociation du fer ne subissait ni dégradation ni modification chimique (Schalk *et al.*, 2002). Ce recyclage de la PvdI ayant transporté du fer dans le milieu extracellulaire est effectué par la pompe PvdRTOpMq impliquée également dans la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée (Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2009). Une délétion des gènes codant pour la pompe PvdRTOpMq entraîne une accumulation d'apo-PvdI dans le périplasme bactérien (Hannauer *et al.*, 2010b).

Le Gallium (Ga) a été utilisé comme outil pour démontrer que la dissociation du fer de la PvdI impliquait une réduction du fer dans le périplasme bactérien. Le Ga est un métal qui a les mêmes propriétés de coordination et la même taille que le fer ferrique. En revanche, le Ga n'a pas d'état d'oxydation (II) et ne peut donc pas être réduit. Enfin, la PvdI en complexe avec le Ga fluoresce à 400 nm alors que le complexe PvdI-Fe ne fluoresce pas. L'équipe a montré, que des cellules de *P. aeruginosa* PAO1 incapables de produire de la PvdI et incubées en présence du complexe PvdI-Ga accumulent dans leur périplasme le complexe fluorescent et la PvdI n'est pas recyclée (Greenwald *et al.*, 2007). La même expérience réalisée en présence du complexe PvdI-Fe ne montre pas d'accumulation de fluorescence dans le périplasme, mais un recyclage de la PvdI dans le milieu extracellulaire (Greenwald *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent vivement que la dissociation du fer de la PvdI implique une réduction du fer dans le périplasme.

L'équipe a également montré que les 8 gènes *fpvGHJKDEF* localisés au niveau du locus Pvd (Ravel & Cornelis, 2003)([Figure n°20](#)) sont aussi impliqués dans l'import du fer par la

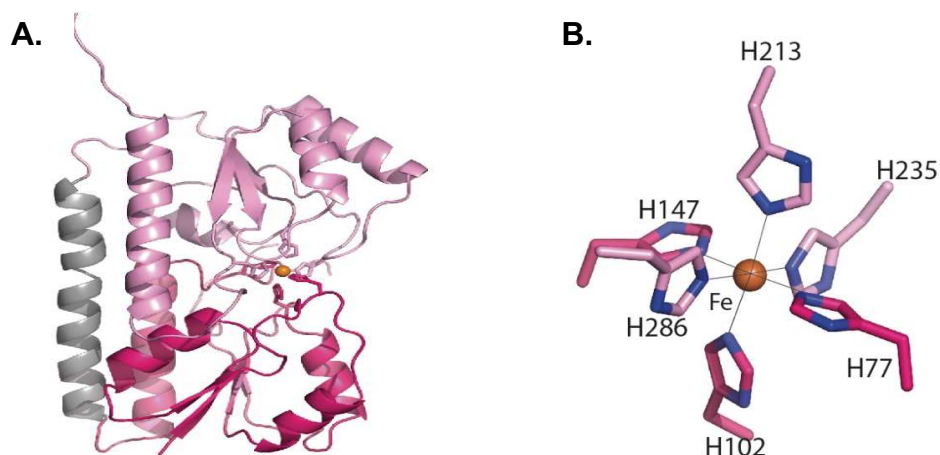
PvdI. La délétion de chacun de ces gènes impacte l'import de  $^{55}\text{Fe}$  et la dissociation du fer de la PvdI (Brillet *et al.*, 2012 ; Ganne *et al.*, 2017). Les gènes *fpvGHJKCDE* sont transcrits en opéron et le gène *fpvF* est transcrit seul (Gao *et al.*, 2018).



**Figure n°20 : Organisation génomique des gènes *fpvGHJKCEDF* chez *P. aeruginosa* PAO1.**

### 1. Rôle de FpvC

FpvC (PA2407) est une protéine périplasmique appartenant à la sous-famille des protéines TroA-like. Les protéines de cette famille chélatent des métaux tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  et sont associées pour la plupart en tant que *Periplasmic Binding Protein* (PBP) à des transporteurs de type ABC (Brillet *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 1999). Des expériences *in vitro* de dissociation du complexe PvdI-Fe ont montré que la présence de FpvC purifiée activait la dissociation du complexe PvdI-Fe incubé en présence du réducteur DTT (dithiothréitol). Ceci suggère donc fortement que FpvC chélate le  $\text{Fe}^{2+}$  formé par l'action du DTT et dissocié de la PvdI (Ganne *et al.*, 2017). La structure de FpvC chélatant du fer ferreux a été résolue récemment en collaboration avec l'équipe de Solange Moreira (Vigouroux *et al.*, 2020) (**Figure n°21A**). La structure montre une coordination du fer ferreux par 6 résidus d'histidine (His) (**Figure n°21B**). FpvC est la seule protéine périplasmique à avoir un site hexahistidines impliqué dans la coordination d'un métal décrite à ce jour. La structure d'un mutant FpvC pour ses 6 His a également été résolue. L'absence de ces résidus entraîne un changement de conformation assez conséquent pour FpvC, avec un site de liaison plus ouvert (Vigouroux *et al.*, 2020). Après dissociation du complexe PvdI-Fe, FpvC serait la protéine chélatant le fer ferreux dans le périplasme de la bactérie.



**Figure n° 21 : Structure de FpvC dans la voie d'import du fer de la PvdI chez *P. aeruginosa*. A. Structure de FpvC-Fe<sup>2+</sup> (PDB ID : 6R5S), B. Site de l'hexacoordination du fer ferreux sur FpvC. Dans les deux figures le Fer est en orange. Figure d'après (Vigouroux *et al.*, 2020).**

## 2. Rôle de FpvF

FpvF fait également partie de la famille des protéines de type TroA et plus particulièrement de la sous-famille de protéines capables de lier les sidérophores (Brillet *et al.*, 2012). Des expériences en spectrométrie de masse en conditions natives avec la protéine purifiée ont montré que FpvF était capable de dimériser (FpvF<sub>2</sub>) et d'interagir également avec FpvC pour former des complexes FpvC-FpvF avec des stœchiométries variables (FpvF-FpvC, FpvF<sub>2</sub>-FpvC, FpvC-FpvF<sub>2</sub> et FpvF<sub>2</sub>-FpvC<sub>2</sub>) (Brillet *et al.*, 2012). La même approche a également permis de montrer que FpvF peut lier l'apo-PvdI ou le complexe PvdI-Fe afin de former des complexes FpvF-FpvC-Pvd-Fe (FpvF<sub>2</sub>-FpvC-Pvd-Fe, FpvC-FpvF<sub>2</sub>-Pvd<sub>2</sub>-Fe<sub>2</sub>, FpvF<sub>2</sub>-FpvC<sub>2</sub>-Pvd-Fe ou encore FpvC<sub>2</sub>-FpvF<sub>2</sub>-Pvd<sub>2</sub>-Fe<sub>2</sub>) (Brillet *et al.*, 2012). A ce jour, rien n'est connu de la structure de FpvF mais des essais de cristallisation sont en cours en collaboration avec l'équipe de S. Moreira.

## 3. Transport à travers la membrane interne par FpvDE

Les protéines FpvD et FpvE possèdent des séquences homologues à des protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC : FpvD code pour une protéine fixant l'ATP et FpvE une perméase (Brillet *et al.*, 2012). Les gènes *fpvC* et *fpvF* codant pour les protéines périplasmiques FpvC et FpvF sont localisés de part et d'autre des gènes *fpvD* et *fpvE* dans le génome de *P. aeruginosa*, suggérant que ces deux protéines périplasmiques sont associées au transporteur ABC FpvDE. C'est le seul exemple dans le domaine de l'assimilation du fer par des sidérophores d'un transporteur de type ABC avec deux protéines périplasmiques associées, l'une liant le fer (FpvC) et la seconde le sidérophore (FpvF). Lorsqu'un mutant

déléte pour *fpvCDEF* est incubé en présence de PvdI-<sup>55</sup>Fe, on observe une baisse de la quantité de <sup>55</sup>Fe accumulée dans le cytoplasme et une augmentation de <sup>55</sup>Fe dans le périplasma. Ce résultat suggère un rôle pour FpvCDEF dans le transport du fer du périplasma au cytoplasme (Brillet *et al.*, 2012).

#### 4. Rôles de FpvGHJK

Situés au niveau du locus Pvd, les gènes *fpvGHJK* sont localisés en amont de *fpvCDEF*. Notre équipe a montré que FpvG était une protéine de la membrane interne (Ganne *et al.*, 2017). FpvH et FpvK sont également prédites pour être localisées dans la membrane interne et FpvJ pour être une protéine périplasmique (présence d'un peptide signal en N-terminal de la protéine). Un mutant délété pour les quatre gènes *fpvGHJK* transporte mais accumule moins de <sup>55</sup>Fe qu'une souche sauvage et le métal s'accumule plutôt dans le périplasma (Ganne *et al.*, 2017). FpvG possède des homologues de séquence avec une ascorbate ferri-réductase transmembranaire d'*Arabidopsis thaliana* appartenant à la famille des cytochrome b561 (Su *et al.* 2006). Ces informations impliquent que la protéine FpvG pourrait avoir un rôle de réductase lors de la dissociation du fer de la PvdI dans le périplasma de *P. aeruginosa*. En effet, une dissociation du fer de la PvdI a été observée *in vitro* en incubant des membranes isolées de bactéries surexprimant FpvG en présence de PvdI-Fe (Ganne *et al.*, 2017). FpvG serait donc la réductase impliquée dans le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI. Les séquences de FpvH, FpvK et FpvJ n'ont pas donné d'indice quant à la fonction de ces protéines. La mutation de ces trois gènes affecte *in vivo* la dissociation du fer de la PvdI, indiquant que ces trois protéines jouent un rôle en association avec FpvG dans le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI (Ganne *et al.*, 2017). De plus l'expression de ces trois protéines est nécessaire pour que FpvG ait une activité réductase optimale (Ganne *et al.*, 2017)

Ces différentes données ont permis d'avancer dans la compréhension du mécanisme de dissociation du fer de la PvdI dans le périplasma de *P. aeruginosa*. Après import dans le périplasma, PvdI-Fe se lierait au complexe FpvC-FpvF. Ces deux protéines, ainsi que la réductase FpvG et les protéines FpvH, FpvI et FpvK participeraient très probablement à la dissociation du fer de la PvdI dans le périplasma. Après réduction du fer, FpvC-FpvF-PvdI-Fe (ou le complexe sous une autre forme multimérique) se dissocierait en FpvC-Fe<sup>2+</sup> et FpvF-PvdI (Brillet *et al.*, 2012 ; Ganne *et al.*, 2017 ; Vigoureux *et al.*, 2020). FpvF pourrait ensuite participer de manière active au recyclage de la PvdI en amenant l'apo-sidérophore à la pompe d'efflux PvdRT-OpmQ qui permet de recycler la PvdI dans le milieu extracellulaire (F. Imperi *et al.*, 2009; Schalk *et al.*, 2002; Yeterian *et al.*, 2009) ([Figure n°22](#)).

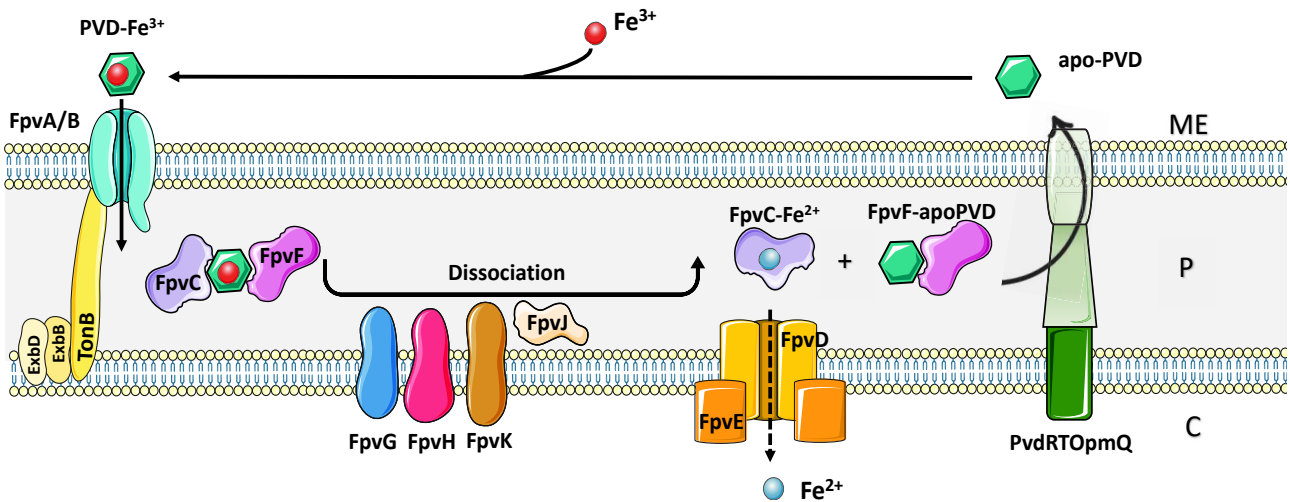


Figure n°22 : Résumé de la voie d'import du fer par la PvdI chez *P. aeruginosa*. ME : Milieu extracellulaire, P=périplasma, C=cytoplasme

#### e. Import des autres métaux par la PvdI

Notre équipe a pu démontrer que la PvdI est capable de chélater avec des affinités variables d'autres métaux tels que Ag, Al, Cd, Co, Cu, Ga, Hg, Mn, Ni et Zn (Braud *et al.*, 2009). Les complexes PvdI-métaux sont reconnus par le TBDT associé, FpvA puis sont transloqués dans le périplasma. Cependant, seuls les complexes PvdI-Cu, PvdI-Ga, PvdI-Mn et PvdI-Ni s'accumulent dans le périplasma. Les autres complexes sont expulsés de la cellule via la pompe d'efflux PvdRTOpMq (Braud *et al.*, 2009; Hannauer *et al.*, 2012a). Les différents métaux transportés par la PvdI ne peuvent probablement pas se dissocier de la PvdI dans le périplasma par le mécanisme de dissociation impliquant une réduction par FpvG. Ce mécanisme de dissociation ne fonctionnerait que pour le complexe PvdI-Fe. Les complexes PvdI-métaux ne pouvant pas se dissocier sont ré-expulsés de la bactérie par PvdRTOpMq. Cela indique que PvdRTOpMq et certainement FpvG jouent un rôle dans le contrôle de la nature du métal assimilé par la bactérie via la voie PvdI.

Il est intéressant de remarquer que PvdRTOpMq est capable de (i) sécréter la PvdI nouvellement synthétisée, (ii) sécréter la PvdI ayant transporté du fer dans la bactérie (recyclage) et (iii) excréter tout complexe PvdI-métal incapable d'être dissocié dans le périplasma de la bactérie.

## II) La voie pyochéline

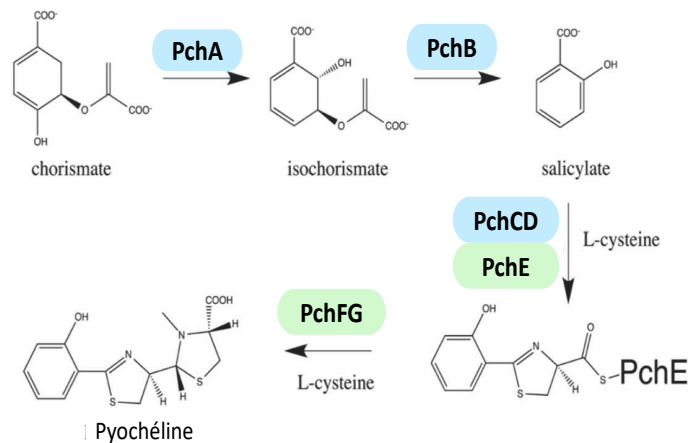
### a. Structure de la pyochéline

La pyochéline (Pch) est le second sidérophore synthétisé et sécrété par *P. aeruginosa*. La Pch résulte de la condensation d'une molécule de salicylate et de deux cystéines (Cox *et al.*, 1981) (**Figure n°23**). Il existe 4 stéréoisomères de Pch mais un seul (Pch1) sera reconnu par le TDBT associé FptA (Mislin *et al.*, 2006; Schlegel *et al.*, 2004).

Le fer est chélaté par la Pch avec une stœchiométrie de Pch:Fer de 2:1 et une affinité de  $10^{28}$  M<sup>-2</sup> (Brandel *et al.*, 2012; Mislin *et al.*, 2006; Schlegel *et al.*, 2006; Tseng *et al.*, 2006). La coordination du fer fait intervenir deux dendates de la première molécule de Pch et un dentate pour la seconde (Tseng *et al.*, 2006).

### b. Synthèse de la pyochéline

Sept enzymes de biosynthèse organisés en deux opérons distincts sont impliqués dans la synthèse de la Pch chez *P. aeruginosa* : *pchDCBA* et *pchEFGHI* (Cornelia Reimmann & Serino, 1998; Serino *et al.*, 1997). L'intégralité de la biosynthèse de la Pch se déroule dans le cytoplasme bactérien avec comme première étape l'intervention de l'isochorismate synthase PchA qui convertit un chorismate en isochorismate. L'isochorismate est ensuite converti en salicylate par la pyruvate lyase PchB (Gaille *et al.*, 2003; Serino *et al.*, 1995). La molécule de salicylate est ensuite activée par adénylation via PchD (Serino *et al.*, 1997) puis chargée sur la NRPS PchE qui lie une L-Cystéine pour former le dihydroaeruginoate (Dha) sous le contrôle de PchC (Quadri *et al.*, 1999; C. Reimmann *et al.*, 2004; Cornelia Reimmann & Serino, 1998). Le Dha est transféré à une seconde NRPS, PchF, qui lie une deuxième L-cystéine (C. Reimmann *et al.*, 2004). La Pch mature ainsi formée est libérée par la réductase PchG (C. Reimmann *et al.*, 2001) (**Figure n°23**). Comme pour la voie PvdI, les enzymes de biosynthèse de la voie Pch interagissent certainement ensemble afin de former un complexe multienzymatique associé à la membrane interne appelé sidérosome (Cunrath *et al.*, 2015). Rien n'est connu à ce jour concernant les protéines pouvant être impliquées dans la sécrétion de Pch dans l'environnement de la bactérie après biosynthèse.



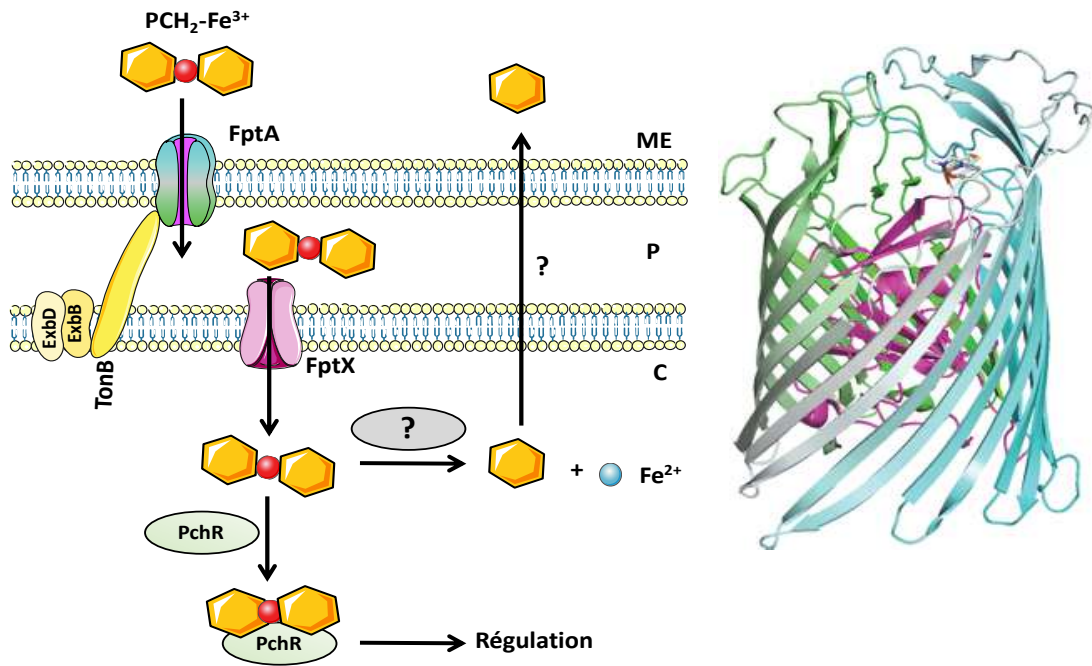
**Figure n°23 : Biosynthèse de la pyochéline chez *P. aeruginosa*.** Adapté d'après (Gasser *et al.*, 2015)

### c. Import du fer par la pyochéline

Après sécrétion de Pch, le complexe  $Pch_2-Fe$  formé dans l'environnement de la bactérie est reconnu à la surface de la bactérie par le TBDT FptA (Robert G Ankenbauer, 1992; Cobessi, Celia, & Pattus, 2005). FptA permet l'import de  $Pch_2-Fe$  à travers la membrane externe, puis le complexe est transporté vers le cytoplasme à travers la perméase FptX, qui utilise la force proton motrice comme source d'énergie (Cunrath *et al.*, 2015; Youard *et al.*, 2011). L'existence d'un transporteur alternatif est cependant possible pour le passage du complexe  $Pch_2-Fe$  dans le cytoplasme car l'import du fer par la Pch n'est pas totalement aboli dans un mutant *fptX* (Cunrath *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2007). Dans le cytoplasme bactérien, le complexe  $Pch_2-Fe$  participe à la régulation de la transcription des gènes de la voie Pch en se fixant au régulateur PchR. Une fois le complexe  $PchR-Pch_2-Fe$  formé, il (i) active la transcription des gènes de biosynthèse de la Pch et d'import du complexe  $Pch_2-Fe$  et (ii) réprime la transcription de *pchR* (Michel *et al.*, 2005; Youard *et al.*, 2011)(voir **Chapitre V**) (**Figure n°24**). Concernant le mécanisme de dissociation du fer de la Pch, rien n'est connu à ce jour.

Comme pour la PvdI, la Pch est capable de chélater d'autres métaux que le fer comme Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl et Zn avec une moins bonne affinité (Braud, Hannauer, *et al.*, 2009) mais seuls les complexes  $Pch-Co$ ,  $Pch-Ga$  et  $Pch-Ni$  sont importés dans la cellule et s'y accumulent (Braud, Hannauer, *et al.*, 2009).





**Figure n°24 : Voie d'import du fer par la Pch chez *P. aeruginosa* et structure du transporteur FptA chargé en Pch.** Structure d'après Cobessi *et al.*, 2005 (PDB : 1XKW). ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma, C : Cytoplasme.

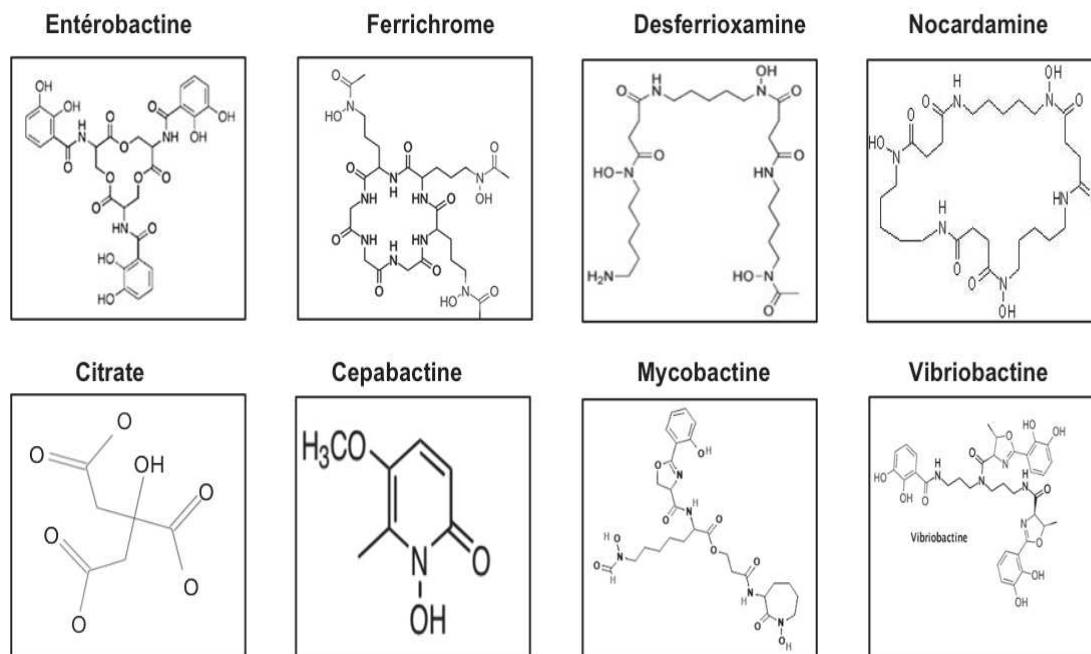


## Chapitre IV

### **Autres mécanismes d'acquisition du fer chez *P. aeruginosa***

## l) Acquisition du fer par les sidérophores exogènes

*P. aeruginosa* possède la capacité d'utiliser des sidérophores produits par d'autres micro-organismes : les exosidérophores (**Figure n°25**). Elle peut exploiter certaines Pvds produites par d'autres *Pseudomonas* et des sidérophores produits par d'autres familles bactériennes ou de champignons. Certaines voies sont bien décrites, comme celle de l'entérobactine (ENT), un sidérophore produit par *E. coli* (K Poole *et al.*, 1990) et le ferrichrome, un sidérophore produit par les mycètes (M. A. Llamas *et al.*, 2006). D'autres voies sont moins documentées, comme celle de la vibriobactine produite par *Vibrio cholerae* (Elias *et al.*, 2011), ou celle du chélateur « naturel », le citrate (Cox, 1980; Harding & Royt, 1990). Pour les autres sidérophores utilisés, comme par exemple la cepabactine produite par *Pseudomonas cepacia* (Mislin *et al.*, 2006), la mycobactine produite par les mycobactéries (Maria A. Llamas *et al.*, 2008) et la ferrioxamine produite par les Streptomyces (M. A. Llamas *et al.*, 2006; Visca *et al.*, 2002), seuls les TBDTs sont identifiés. Pour l'instant, rien n'est connu des autres protéines impliquées et des mécanismes de dissociation du fer de ces exosidérophores.



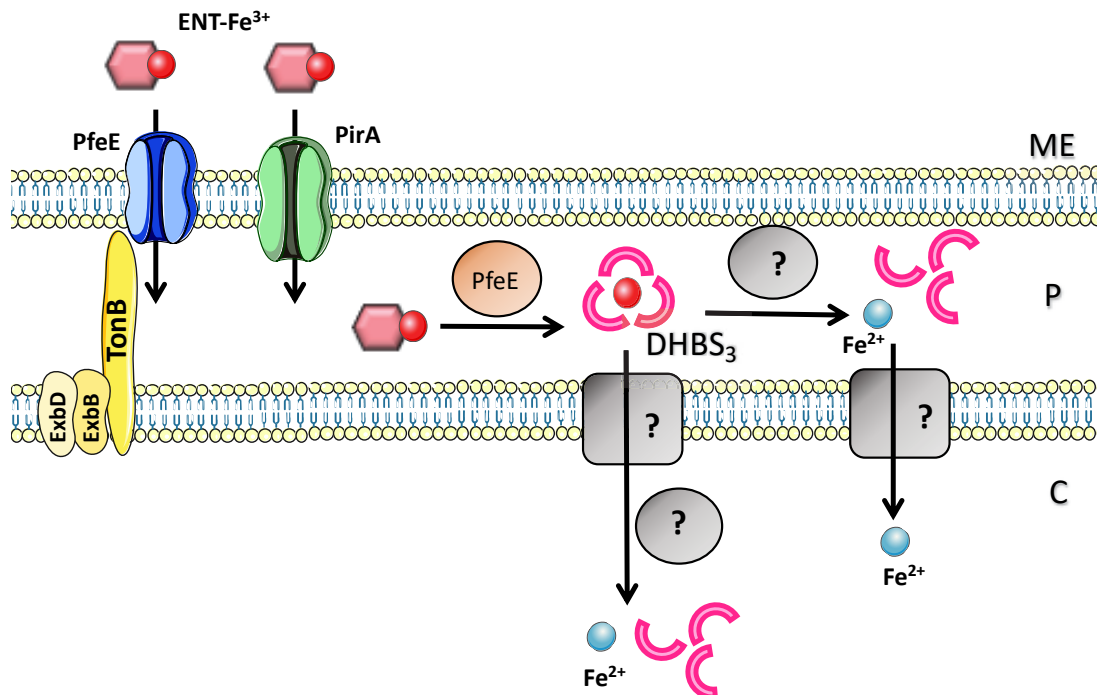
**Figure n°25 :** Structures des différents sidérophores exogènes pouvant être utilisés par *P. aeruginosa*.

L'intérêt de pouvoir acquérir du fer par une multitude d'exosidérophores confère à la bactérie un avantage dans la lutte pour l'acquisition du fer par rapport à d'autres micro-organismes. En effet, il n'est pas rare de retrouver *P. aeruginosa* en situation de co-infection avec d'autres pathogènes (Folkesson *et al.*, 2012). De manière générale, dans l'environnement où vit la

bactérie, d'autres espèces microbiennes seront présentes et le fait de pouvoir « pirater » les sidérophores des autres bactéries ou champignons est un avantage indéniable dans la lutte pour le précieux nutriment.

### a. Voie Entérobactine

La voie enterobactine (ENT) a été plus largement étudiée chez *Escherichia coli* que chez *P. aeruginosa*. Chez cette dernière, le complexe ferri-ENT est reconnu par les transporteurs TonB dépendant PfeA et PirA et est ensuite transloqué dans le périplasma (Ghysels *et al.*, 2005; K Poole *et al.*, 1990). Dans le périplasma, l'estérase PfeE hydrolyse l'ENT en complexe avec le fer en trois molécules de DHBS (N-(2,3-dihydrobenzoyl) serine) toujours en complexe avec le fer (Perraud *et al.*, 2018). La dissociation du fer des trois molécules de DHBS nécessite une réduction du fer ferrique en fer ferreux mais ni la réductase ni la localisation cellulaire du mécanisme n'ont été caractérisées (Perraud *et al.*, 2018). De ce fait, le compartiment cellulaire, périplasma ou cytoplasme, où se déroule la dissociation du fer des molécules de DHBS n'est pas encore identifié (Figure n°26).



**Figure n°26 : Utilisation de l'entérobactine par *Pseudomonas aeruginosa*.** ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma, C : Cytoplasme. Adapté d'après (Perraud *et al.*, 2018).

## **b. Voie des Hydroxamates**

Deux voies d'acquisitions du fer par les sidérophores de type hydroxamates ont été identifiées chez *P. aeruginosa* : une voie pour le ferrichrome et une voie pour la ferrioxamine B et ses analogues.

Le complexe ferrichrome-Fe<sup>3+</sup> est reconnu et transporté au travers de la membrane externe par le TBDT FiuA. Le complexe est ensuite transloqué au travers de la membrane interne par la perméase FiuB qui utilise la force proton motrice de la membrane interne comme source d'énergie. La dissociation du complexe ferrichrome-Fe<sup>3+</sup> se déroule dans le cytoplasme et implique une étape de réduction du fer en fer ferreux par une réductase non identifiée et une étape d'acétylation du ferrichrome par la N-acetyltransferase FiuC. Ce mécanisme d'acétylation serait important pour diminuer l'affinité du sidérophore pour le fer et favoriser la dissociation (Hannauer *et al.*, 2010a). Le ferrichrome acétylé est ensuite excrété de la bactérie par un mécanisme non identifié (Figure n°27). Des études récentes menées au laboratoire ont montré que FiuA n'était pas le seul TBDT à transporter ferrichrome-Fe<sup>3+</sup> mais le second transporteur n'a pas été identifié (Normand *et al.*, 2020 –récemment soumis pour publication).

*P. aeruginosa* peut utiliser deux sidérophores de type ferrioxamine : la ferrioxamine B et son analogue cyclisé, la nocardamine. Les complexes ferrioxamine-Fe<sup>3+</sup> et nocardamine-Fe<sup>3+</sup> sont reconnus et transportés par le TBDT par FoxA (M. A. Llamas *et al.*, 2006). Il a été démontré dans notre équipe qu'un autre TBDT non identifié est également impliqué dans le transport de la ferrioxamine B tandis que le complexe nocardamine-Fe<sup>3+</sup> est exclusivement transporté par FoxA (Normand *et al.*, 2020 –récemment soumis pour publication).

Après import dans le périplasme, une perméase, FoxB, pourrait être impliquée dans l'utilisation des ferrioxamines pour l'import dans le cytoplasme (Ó Cuív *et al.*, 2007). Le devenir des complexes dans le cytoplasme est inconnu (Figure n°27).

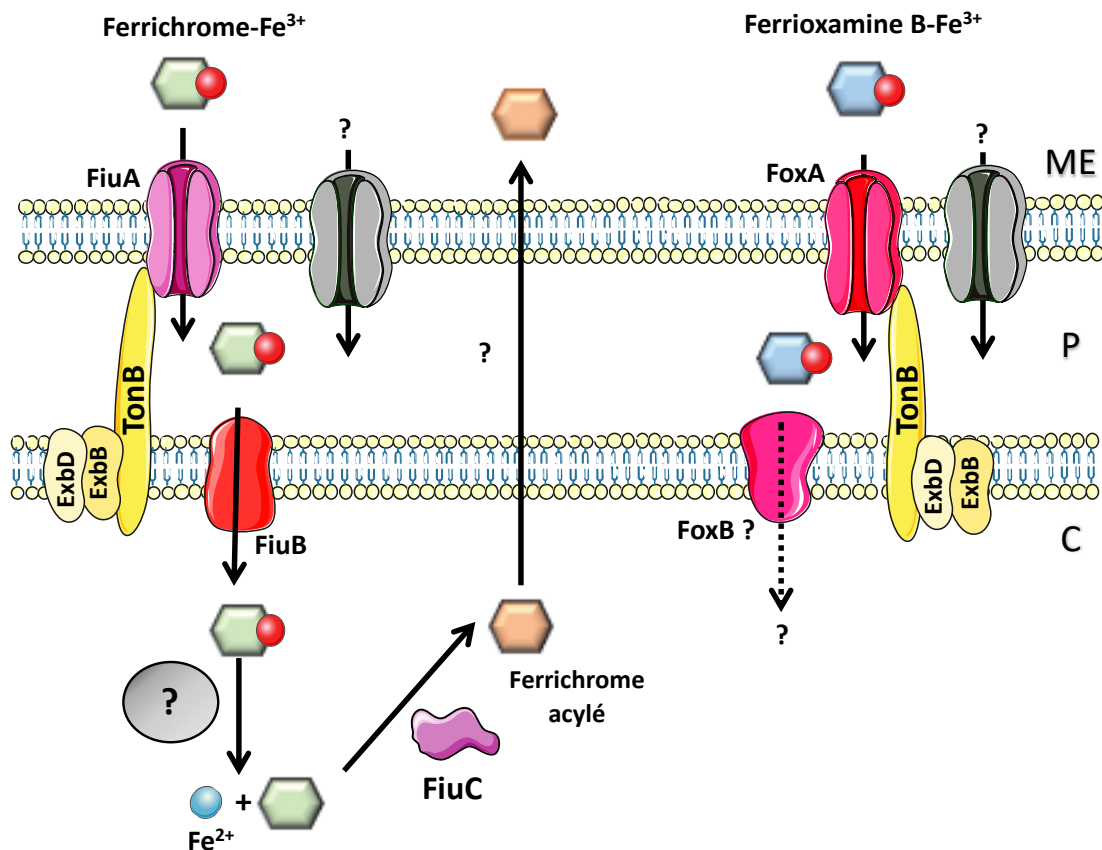


Figure n°27 : Utilisation du ferrichrome et de la ferrioxamine par *Pseudomonas aeruginosa*. ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma, C : Cytoplasme. Adapté d'après Hannauer *et al.*, 2010a

### c. Voie Vibriobactine

FvbA est le TBDT reconnaissant le complexe Vibriobactine-Fer à la surface membranaire et le transportant au travers de la membrane externe. Rien n'est connu du mécanisme de transport et de dissociation du fer de la Vibriobactine (Elias *et al.*, 2011).

### d. Citrate

La molécule de citrate est considérée comme un exosidérophore utilisé par *P. aeruginosa*. Le TBDT associé est FecA. Le citrate et le fer se dissocient dans le périplasma par un mécanisme impliquant une réduction du fer (Marshall *et al.*, 2009). Une protéine périplasmique, PcoA, ayant une activité oxydoréductase a été proposée comme étant la protéine permettant la réduction du fer et par conséquent la dissociation du complexe citrate-Fe<sup>3+</sup> (Marshall *et al.*, 2009). Le fer ferreux est ensuite transporté dans le cytoplasme, via le système de transporteur FeoB.

## II) Voies d'acquisition du fer n'impliquant pas les sidérophores

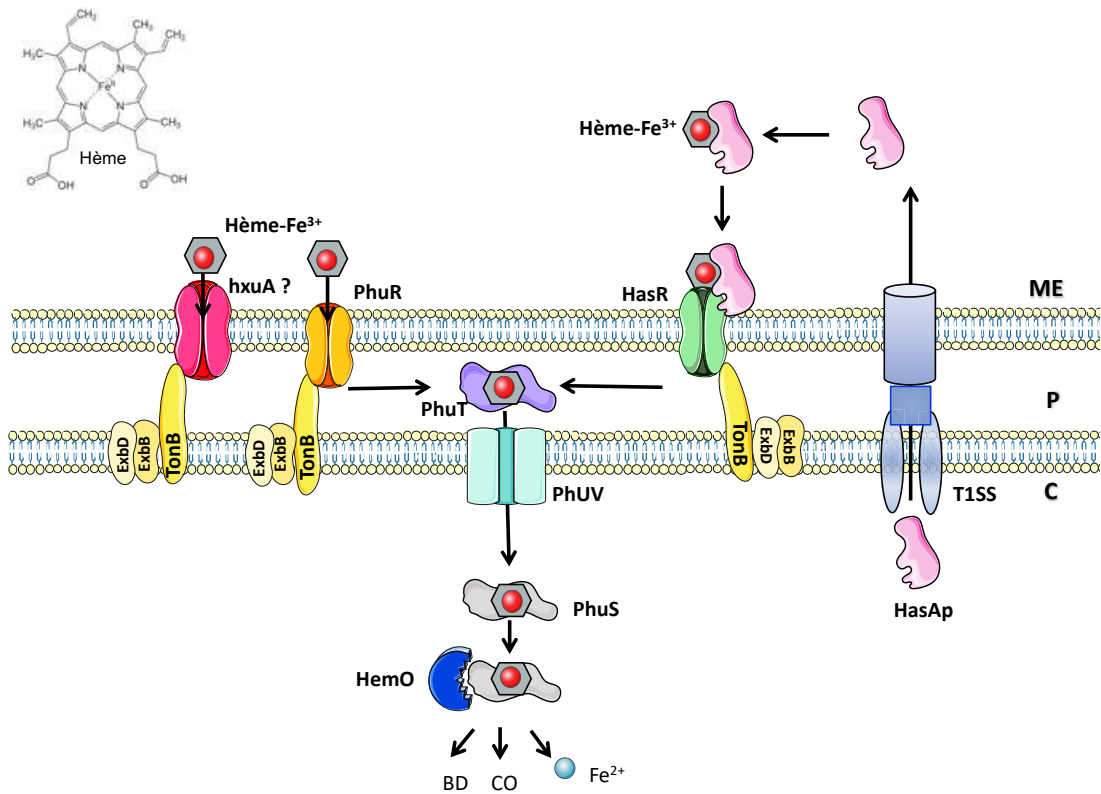
### a. Acquisition du fer par la molécule d'hème

L'hème est une molécule cruciale au bon fonctionnement des cellules de mammifères aérobies et est la source de fer la plus abondante dans le corps (Worwood, 2012). L'hème est formé d'une structure aromatique, ou porphyrine, elle-même constituée de quatre noyaux pyrrol et possède en son centre du fer qui peut être sous la forme ferrique ou ferreux. Le fer est lié aux 4 atomes d'azote de la porphyrine. L'hème est donc une molécule hydrophobique et sert de groupement prosthétique pour de nombreuses hémoprotéines (Ponka, 1999, Li *et al.*, 2011). De plus en plus d'études montrent que l'hème est une molécule importante dans la pathogénicité et constitue une source de fer indéniable pour *P. aeruginosa* notamment dans le cadre de la mucoviscidose (Konings *et al.*, 2013; Marvig *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014). Trois systèmes d'import d'hème sont connus chez *P. aeruginosa* (Figure n°28) :

Le premier système, nommé Phu (Pseudomonas haem uptake), permet à la bactérie d'extraire directement l'hème des hémoprotéines ou d'acquérir l'hème libre. Dans ce système, le TDBT PhuR interagit avec les hémoprotéines et extrait l'hème de ces protéines pour les importer dans le périplasma (Smith & Wilks, 2015). Le second système est le système Has. Dans ce dernier, la bactérie va sécréter une protéine HasA, appelée hémophore, qui va extraire l'hème des protéines de l'hôte (Dent *et al.*, 2019; Ochsner *et al.*, 2000). Le complexe HasA-hème est ensuite reconnu par le TDBT HasR qui va extraire l'hème de HasA et permettre le passage de l'hème dans le périplasma. La troisième stratégie est le système Hxu impliquant le TDBT HxuA. Il serait impliqué dans la reconnaissance de la molécule d'hème libre dans l'environnement de la bactérie (Otero-Asman *et al.*, 2019). Néanmoins, peu d'informations sont disponibles sur HxuA en tant que TDBT.

Le devenir de l'hème dans la cellule est ensuite commun aux trois systèmes. Dans l'espace périplasmique, l'hème est fixé par la protéine PhuT et transporté vers le cytoplasme par le transporteur ABC PhuUV. Dans le cytoplasme l'hème se lie à une protéine chaperonne, PhuS, afin d'être transporté jusqu'à la protéine HemO, une hème oxygénase qui dégrade l'hème en biliverdine IX $\beta$  et IX $\delta$ , Fe(II) et CO (Kaur *et al.*, 2009; Lansky *et al.*, 2006; O'Neill & Wilks, 2013).





**Figure n° 28 : Voies d'acquisitions du fer par l'hème chez *P. aeruginosa*.** BD : biliverdine, CO : monoxyde de carbone. ME : Milieu extracellulaire, P : périplasme, C : cytoplasme. Adapté d'après (Pierre Cornelis & Dingemans, 2013).

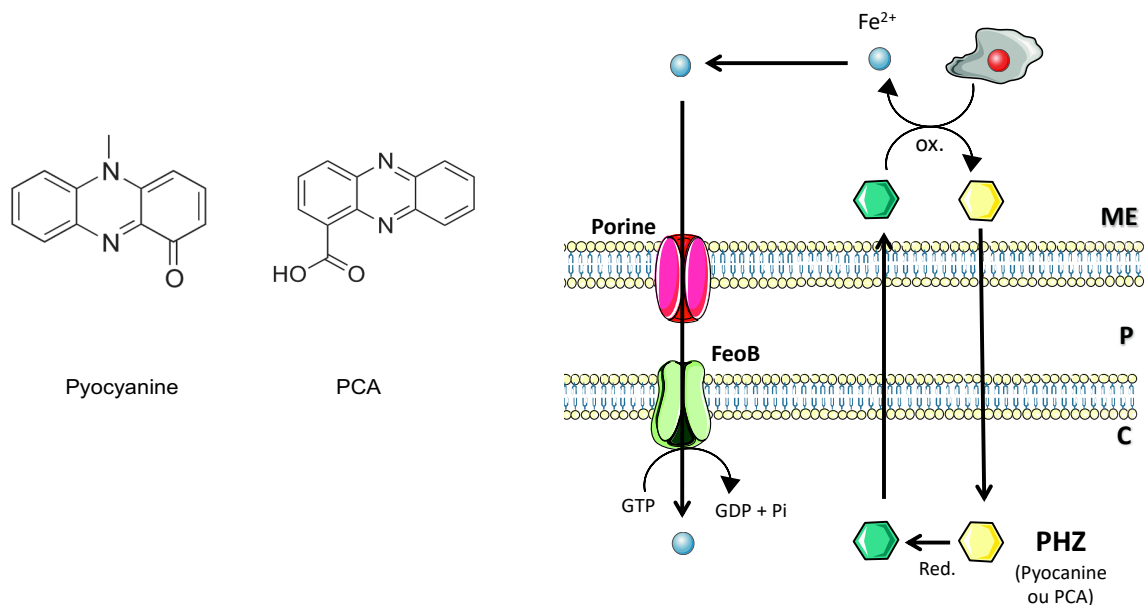
### b. Le système Feo

Dans les environnements anaérobiques ou microaérobiques à bas pH, le fer ferreux est importé directement *via* le système FeoABC. Le fer ferreux diffuse au travers de la membrane externe *via* une porine puis est transporté au travers de la membrane interne vers le cytoplasme par le canal GTP dépendant formé par FeoB (Cartron *et al.*, 2006; Seyedmohammad *et al.*, 2016) (**Figure n°29**). La transcription des gènes codant pour l'expression des protéines de cette voie est régulée par le régulateur transcriptionnel FeoC. Le rôle de FeoA reste méconnu chez *P. aeruginosa* (Lau *et al.*, 2016).

### c. Les phénazines

Les phénazines sont des métabolites secondaires sécrétés par *P. aeruginosa* capables de réduire le fer ferrique lié à des protéines et de le rendre plus accessible pour la bactérie (Y. Wang *et al.*, 2011; Yun Wang & Newman, 2008). Les phénazines sont sécrétées sous leur forme réduite dans le milieu extracellulaire où elles vont être oxydées, ce qui entraîne une réduction du fer. Les phénazines peuvent être recyclées et à nouveau réduites dans le cytoplasme. Le mécanisme de réduction est peu connu mais est couplé à l'oxydation du NADH

en  $\text{NAD}^+$  (Price-Whelan *et al.*, 2007). Chez *P. aeruginosa*, les phénazines correspondent à l'acide phénazine-1-carboxylique (PCA) et à la pyocyanine (le PCA étant le précurseur de la phénazine)(Y. Wang *et al.*, 2011). Le fer ferreux passe ensuite par le système Feo pour être utilisé par la cellule (**Figure n°29**).



**Figure n° 29 : Voie d'acquisition du fer par le système FeoABC et le « système » phénazines. A gauche**, structures de la pyocyanine et du PCA. **A droite**, détails des voies d'import du système FeoABC couplé aux phénazines. ME : Milieu extracellulaire, P : périplasme, C : cytoplasme. Adapté d'après (Pierre Cornelis & Dingemans, 2013).

### III) Import du fer en conditions d'infections (cas de la mucoviscidose).

L'avantage de posséder différents moyens d'acquisition du fer peut s'illustrer dans les cas des infections à *P. aeruginosa*, avec l'exemple des patients atteints de mucoviscidose.

Plusieurs études ont montré que les voies respiratoires des patients souffrant de cette maladie ne sont pas totalement dénuées de fer (Reid *et al.*, 2004, 2007; Stites *et al.*, 1998, 1999). Ce fer n'est pas libre mais va être retrouvé chélaté à des protéines comme la lactoferrine, la transferrine ou la ferritine. La PvdI sécrétée par *P. aeruginosa* est capable de prélever le fer directement de la transferrine et de la lactoferrine. De plus, certaines peptidases peuvent également dégrader les protéines chélatant le fer afin de le libérer (Döring *et al.*, 1988; Sriyosachati & Cox, 1986; Wolz *et al.*, 1994; Xiao & Kisaalita, 2018). Il a été reporté, dans le cas des infections sur le long terme, que certaines bactéries vont perdre la capacité à produire de la PvdI afin d'économiser de l'énergie et réduire leur virulence. Ces mêmes cellules vont quand même exprimer le transporteur FpvA pour utiliser la PvdI produite par les cellules

avoisinentes (Andersen *et al.*, 2015). La perte de la production de PvdI chez ces bactéries entraîne l'augmentation de l'expression des transporteurs de l'hème (Marvig *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2014). Les voies d'import utilisant l'hème sont donc également sollicitées dans le cas de la mucoviscidose et la source de cet hème est probablement liée à la présence de protéines comme l'hémoglobine, l'haptoglobine ou la myoglobine (Konings *et al.*, 2013).

La bactérie peut également acquérir le fer ferreux qui est présent dans les poumons des patients (Hunter *et al.*, 2013). En effet, dans les phases plus tardives de la maladie, le développement des bactéries sous forme de biofilm peut créer un microenvironnement hypoxique maintenant la forme réduite du fer. De plus, la présence de métabolites tels que les phénazines dans le septum de patients a été démontré. Ces phénazines peuvent réduire le  $Fe^{3+}$  présent en  $Fe^{2+}$  (Hunter *et al.*, 2013). Dans ces cas-là, les cellules peuvent acquérir le fer via le système FeoABC (Konings *et al.*, 2013).

Finalement, *P. aeruginosa* peut se développer en co-infection avec d'autres micro-organismes sécréteurs de sidérophores que *P. aeruginosa* peut exploiter (Harrison, 2007; Iain L. Lamont *et al.*, 2009).



## Chapitre V

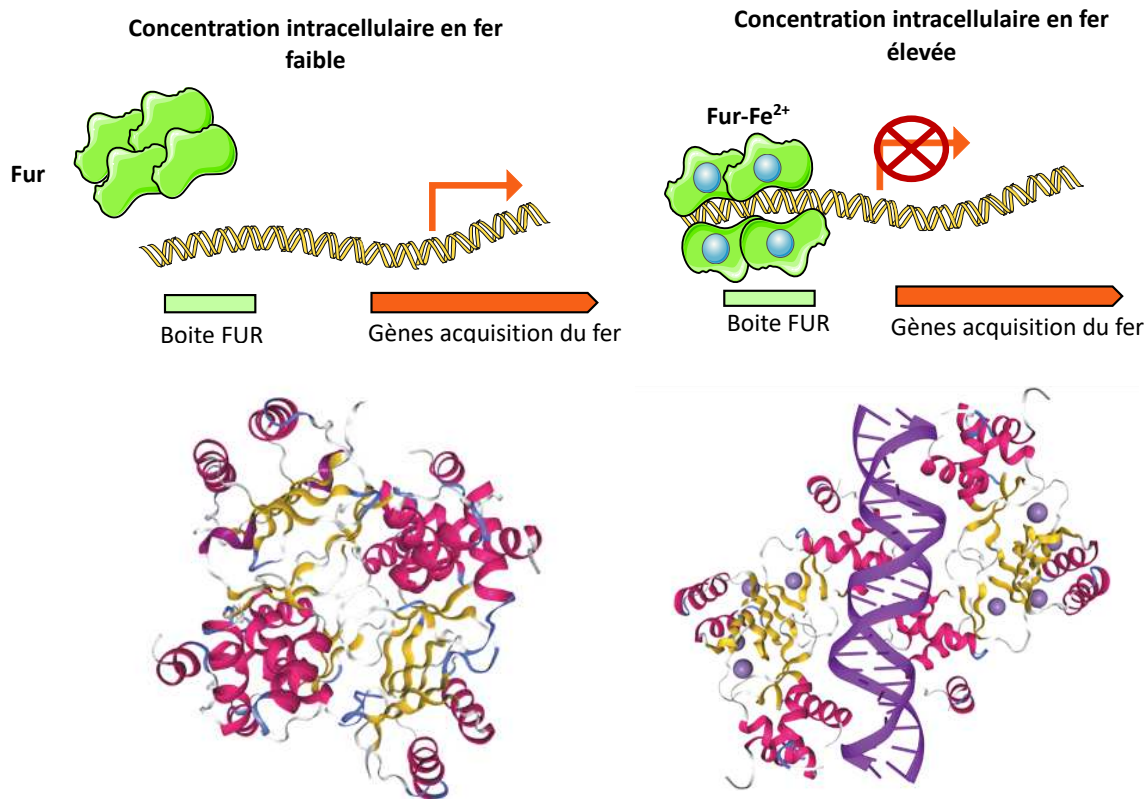
# Régulation de l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa*

Les multiples systèmes d'acquisition du fer de *P. aeruginosa* cités précédemment reflètent la capacité de cette bactérie à coloniser différents types d'environnements dont l'hôte. Cependant, l'hôte essaie de séquestrer le fer pour se protéger des pathogènes. Il s'agit d'une stratégie appelée immunité nutritionnelle. Toutes les voies d'acquisitions du fer ne sont pas exprimées et utilisées en parallèle par la bactérie. Cela implique que l'expression des protéines impliquées dans ces différentes voies est très finement régulée pour que la cellule s'adapte au mieux à son environnement et utilise la stratégie la plus efficace pour acquérir le fer. Par ailleurs, un excès de fer est toxique pour la cellule. Ceci implique également une répression de l'expression des gènes impliqués dans l'assimilation du fer en cas d'excès de fer.

### I) Régulation par la protéine Fur

La protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) a été identifiée pour la première fois chez *E. coli* (Bagg & Neilands, 1987; Escolar *et al.*, 1999). Cette protéine appartient à la superfamille des protéines Fur. Chez *P. aeruginosa*, elle agit principalement en tant que répresseur en contrôlant l'expression de la grande majorité des gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Fur a également un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes de virulence bactérienne et le stress oxydatif (Pierre Cornelis *et al.*, 2009; Troxell & Hassan, 2013). Apo-Fur se trouve dans le cytoplasme bactérien sous forme de tétramères. Lorsque la concentration intracellulaire en fer est suffisamment élevée et optimale, le fer libre  $Fe^{2+}$  se lie à la protéine Fur, qui forme alors des dimères dont chaque monomère possède en N-terminal un domaine de liaison à l'ADN et en C-terminal un domaine de dimérisation. Cette liaison du fer à Fur entraîne un changement de conformation qui permet au complexe de se fixer sur une séquence ADN spécifique. Cette séquence, nommée la boîte Fur, est localisée sur la région promotrice des gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Troxell & Hassan, 2013). Cette boîte Fur est une séquence consensus de type palindromique : 5' GATAATGATAATCATTATC 3' (U. A. Ochsner & Vasil, 1996). Un dimère de Fur se lie de chaque côté du double brin d'ADN, empêchant ainsi la liaison de l'ARN polymérase avec la région promotrice. L'expression des gènes cibles est alors réprimée (Figure n°30).

Fur peut également agir en tant qu'activateur. Trois mécanismes ont été décrits jusqu'à présent : Fur peut réprimer l'expression de petits ARN non codants régulateurs et ainsi activer indirectement l'expression de gènes contrôlés par ces petits ARN. Ce mécanisme est le seul décrit chez *P. aeruginosa*. Chez d'autres organismes, Fur peut également favoriser le recrutement de l'ARN polymérase en se fixant sur des sites *cis* de régulation. Enfin, Fur peut agir en tant qu'anti-répresseur en bloquant la fixation d'un répresseur de transcription à l'ADN (Troxell & Hassan, 2013).



**Figure n°30 : Régulation des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer par le répresseur Fur.**  
**En haut** : mécanisme général de la régulation médiée par Fur. **En bas**, structure de apo-Fur sous forme de tétramère (PDB : 6H1C) et structure des dimères de Fur fixés à la molécule d'ADN en violet (PDB : 4RB1). Les images ont été réalisées via NGL Viewer (Rose *et al.*, 2018).

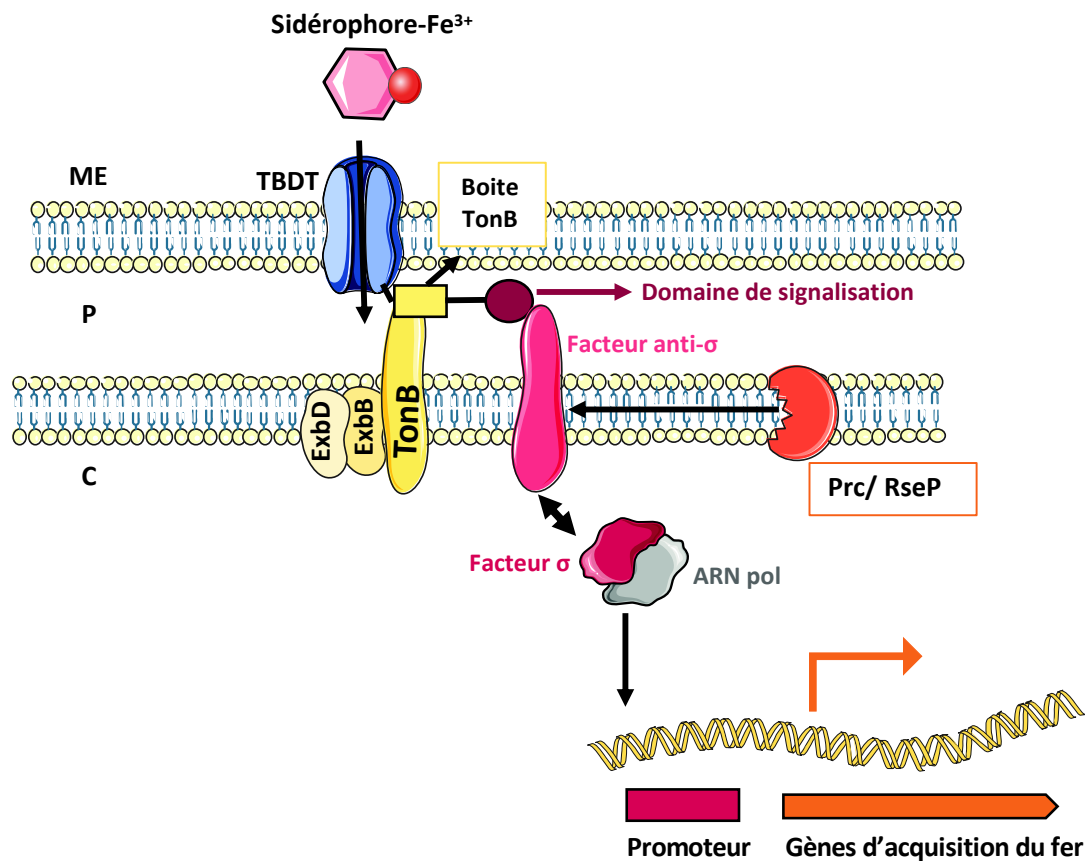
## II) Boucles d'auto-inductions

### a. Facteur sigma/anti sigma

Pour certaines voies d'acquisition du fer, il existe une régulation positive de la transcription des gènes de la voie. Cette régulation est induite par le sidérophore chargé en fer lui-même. Cette régulation intrinsèque des voies est médiée par des facteurs sigma spécifiques appartenant à la famille des facteurs sigma à fonction extra-cytoplasmique (ou facteur sigma ECF). Elle fait également intervenir des facteurs anti-sigma localisés dans la membrane interne et les TBDTs possédant un domaine de signalisation.

Ces facteurs sigma sont des protéines qui s'associent avec l'ARN polymérase. L'holoenzyme résultant de cette association est ensuite dirigée spécifiquement vers la région promotrice des gènes cibles pour initier leur transcription (Gross *et al.*, 1998). Les facteurs sigma peuvent eux-mêmes être soumis à une régulation interne par le biais de facteur anti-sigma. Un facteur anti-sigma a pour rôle d'empêcher un facteur sigma spécifique de s'associer avec l'ARN polymérase et donc va empêcher la transcription des gènes cibles du facteur sigma en question. Il existe ainsi des couples facteur sigma/facteur anti-sigma (Hughes & Mathee, 1998)

De manière générale, le domaine de signalisation du TBDT subit un changement de conformation lorsqu'il y a interaction entre le transporteur et le complexe sidérophore-fer. Ce changement conformationnel permet l'interaction de ce domaine avec le facteur anti-sigma associé qui est situé sur la membrane interne. Cela résulte en une protéolyse du facteur anti-sigma par l'action de deux peptidases. La partie périplasmique de l'anti-facteur sigma est d'abord clivée par une première peptidase nommée Prc. Ce premier clivage rend accessible un second site de protéolyse qui est ensuite clivé par une seconde peptidase nommée RseP chez la plupart des bactéries. Cela permet la libération dans le cytoplasme du facteur sigma qui peut alors se lier à l'ARN polymérase et ainsi permettre la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par le sidérophore ayant activé cette cascade de signalisation (**Figure n°31**) (Bastiaansen *et al.*, 2014; Draper *et al.*, 2011; Llamas *et al.*, 2014; Otero-Asman *et al.*, 2019).



**Figure n°31 : Régulation de l'homéostasie du fer par les facteurs sigma.** ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasme, C : Cytoplasme.

Chez *P. aeruginosa*, l'expression des protéines des voies sidérophores impliquant le ferrichrome (TBDT FiuA/ anti facteur sigma FiuR/ facteur sigma FiuI), la PvdI (TBDT FpvA/ anti facteur sigma FpvR/ facteurs sigma Fpvi et PvdS), le citrate (TBDT FecA/ anti facteur

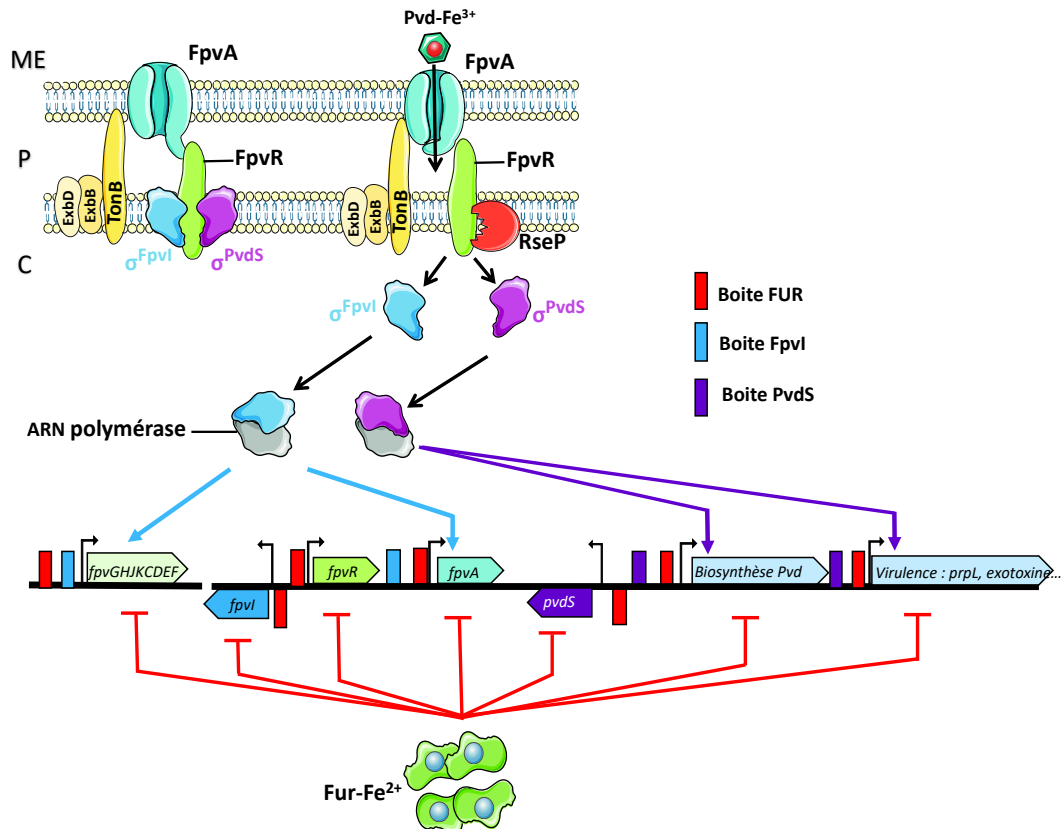


sigma FecR/ facteur sigma FecI), la ferrioxamine (TBDT FoxA / anti facteur sigma FoxR/ facteur sigma FoxI) et la mycobactine (TDBT FemA/ anti facteur sigma FemR/ facteur sigma FemI) est régulée par un mécanisme de ce type.

Concernant la PvdI, la régulation de la transcription des différents gènes de la voie PvdI fait intervenir deux facteurs sigmas (Fpvl et PvdS) et un facteur anti-sigma (FpvR) (Figure n°32). Lorsque le complexe PvdI-Fe est reconnu par le TBDT FpvA à la surface de la bactérie, FpvA subit un changement conformationnel de sa partie périplasmique en N-terminal. Ce changement permet au domaine de signalisation situé dans le périplasma d'interagir avec le facteur anti-sigma FpvR (Brillet *et al.*, 2007 ; Schalk *et al.*, 2009). Cette interaction entraîne une protéolyse de FpvR via deux enzymes, une peptidase site-1-like et la peptidase RseP (Draper *et al.*, 2011). Ces deux enzymes permettent de libérer dans le cytoplasme les deux facteurs sigmas PvdS et Fpvl normalement séquestrés par FpvR (Beare *et al.*, 2003; Draper *et al.*, 2011; I. L. Lamont *et al.*, 2002). Les deux facteurs sigma recrutent ensuite la RNA polymérase. Pour PvdS, le site de fixation se fait au niveau de la séquence consensus appelée boîte IS (pour Iron-Starvation) constituée de TAAAT-N16 / 17-CGT (Rombel *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 2001). Cela active la transcription des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de la PvdI ainsi que des gènes impliqués directement dans la virulence bactérienne comme par exemple le gène *toxA* codant pour l'exotoxine A (Urs A. Ochsner *et al.*, 1996) ou encore le gène *prpL* codant pour la protéase prpL (Lamont *et al.*, 2002; Wilderman *et al.*, 2001). La synthèse de PvdI et l'import dans *P. aeruginosa* du complexe PvdI-Fe vont entraîner la synthèse de facteurs de virulence. C'est donc l'un des raisons pour laquelle la PvdI est considérée elle-même comme un facteur de virulence.

Le facteur sigma Fpvl permet l'initiation de la transcription du gène *fpvA* codant pour le TBDT FpvA (Beare *et al.*, 2003) et des gènes d'import *fpvGHIJKDEF*. En l'absence de complexe PvdI-Fe, les deux facteurs sigma Fpvl et PvdS sont séquestrés par le facteur anti-sigma FpvR. Les gènes cibles ne sont par conséquent pas transcrits. Cependant, en l'absence de PvdI-Fe, il existe tout de même une quantité significative de PvdS et Fpvl non liées à FpvR dans le cytoplasme. Cela permet une expression basale très faible de FpvA, ainsi qu'une sécrétion très faible de PvdI. Cette quantité de PvdI sécrétée peut potentiellement s'accumuler et atteindre une concentration suffisante pour ensuite induire l'expression des gènes cibles (Edgar *et al.*, 2017). La voie PvdI est également sous le contrôle de la protéine Fur qui réprime

la transcription des gènes cibles lorsque la concentration en fer atteint une certaine concentration dans le cytoplasme de la cellule.



**Figure n°32 : Régulation de la transcription des gènes de la voie PvdI via FpvI, PvdS et Fur.**  
ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma et C : Cytoplasme. Adapté d'après (Schalk *et al.*, 2020).

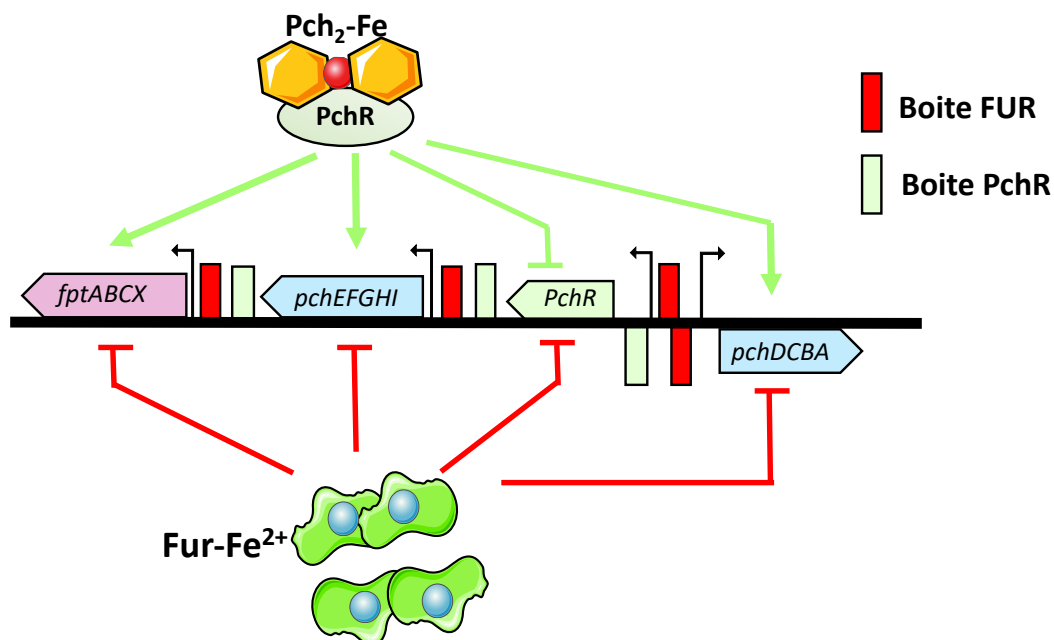
D'autres voies d'acquisition du fer n'impliquant pas les sidérophores sont également régulées par les facteurs sigma/anti-sigma. C'est le cas de la voie d'import de l'hème, avec le système HasR (TBDT), HasS (facteur anti-sigma) et HasI (facteur sigma). Dans le cas du système Has, l'activation de la transcription des gènes *hasR* et *hasA* (codant l'hémophore HasAp) est régulée par les facteurs sigma HasI et anti-sigma HasS (Dent *et al.*, 2019). Cette régulation est amorcée par la liaison du complexe HasAp-hème au TBDT HasR. Concernant le système Hxu, le génome de *P. aeruginosa* code pour les gènes *hxuR* et *hxuI*, un système anti-sigma/sigma certainement impliqué dans la régulation de la transcription des gènes de la voie Hxu (Otero-Asman *et al.*, 2019).

## b. Régulateurs types AraC

Les régulateurs de la famille AraC sont des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer, mais aussi du métabolisme du carbone, de la réponse au stress et de la pathogénicité chez les bactéries (Gallegos *et al.*, 1997; Martin & Rosner, 2001). Ces régulateurs sont organisés en deux différents domaines : un domaine C-terminal très conservé avec deux motifs hélice-turn-hélice impliqués dans la reconnaissance de l'ADN et la

fixation spécifique sur la région promotrice (Cass & Wilcox, 1986; Kwon *et al.*, 2000; Martin & Rosner, 2001). Le second domaine d'environ 150 acides aminés, moins conservé, se situe du côté N-terminal et participe à la reconnaissance du ligand et de sa dimérisation (Michel *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, la régulation de la transcription des gènes de la voie Pch est médiée par le régulateur transcriptionnel PchR (Heinrichs & Poole, 1996). PchR est localisée au niveau du cytoplasme bactérien et va reconnaître et lier le complexe Pch<sub>2</sub>-Fe après son import dans la bactérie. Le complexe formé PchR-Pch<sub>2</sub>-Fe va ensuite se lier sur une séquence très conservée située dans la région promotrice des gènes cibles : la boîte PchR (Heinrichs & Poole, 1996; P.-C. Lin *et al.*, 2013; Michel *et al.*, 2005, 2007). Cette liaison permet l'activation de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse (opérons *pchDCBA* et *pchEFGF*) et l'import du fer par la Pch (opéron *fptABCX*). La boîte PchR est constituée d'une séquence consensus de 32 paires de bases, comprenant la séquence ATCGAAA répétée deux fois et est séparée par 14 nucléotides (Michel *et al.*, 2005).

PchR est aussi un répresseur transcriptionnel de sa propre transcription. L'organisation génomique fait que la boîte PchR de *pchD* chevauche la région promotrice du gène *pchR*. Ainsi, lorsque PchR-Pch<sub>2</sub>-Fe se fixe au niveau de la boîte PchR en amont de *pchD*, la transcription de *pchR* est inhibée (Michel *et al.*, 2005) (Figure n°33). La voie Pch est également régulée via l'action du répresseur Fur.



**Figure n°33 : Régulation de la transcription des gènes de la voie Pch chez *P. aeruginosa* par le répresseur Fur et le régulateur transcriptionnel PchR.** Adapté d'après (Schalk *et al.*, 2020).

### **c. Régulation par les systèmes à deux composantes**

Les systèmes à deux composantes sont composés d'un senseur (généralement une histidine-aspartate-kinase) qui est capable de détecter différents stimuli du milieu extracellulaire, et d'un régulateur. En cas de stimulus extérieur, la kinase phosphoryle le régulateur qui va à son tour activer l'expression des gènes appropriés pour répondre aux besoins provoqués par ce stimulus. Il a été recensé plus de 60 systèmes à deux composantes chez *P. aeruginosa*, dont un est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes de la voie d'acquisition du fer par l'entérobactine. Deux gènes localisés en amont de *pfeA* (gène codant pour le TDBT du complexe ferri-enterobactine), codent pour un senseur (*pfeS*) et un régulateur (*pfeR*) (Dean & Poole, 1993). Ce système à deux composantes régule l'expression de *pfeA* et *pfeE* en réponse à la présence d'entérobactine-Fe (Dean & Poole, 1993). Après transport du complexe entérobactine-fer dans le périplasma de la bactérie par PfeA et avant son hydrolyse par PfeE, celui-ci interagit avec le senseur PfeS localisé dans la membrane interne. Cette interaction entraîne une autophosphorylation de PfeS, ce qui va permettre de phosphoryler PfeR, qui va activer la transcription des gènes *pfeA* et *pfeE* en se liant à une région promotrice.

Un second système à deux composantes a également été identifié. Il s'agit du système PirS/PirR, associé au TDBT PirA (Ghysels *et al.*, 2005). Le sidérophore reconnu par ce TDBT et détecté par ce système à deux composantes n'a pas été identifié à ce jour.

### **d. Autres types de régulateurs impliqués dans l'homéostasie du fer**

Un autre type de régulateur transcriptionnel est FvbR qui est impliqué dans la régulation de la transcription des gènes de la voie d'acquisition du fer par le sidérophore vibriobactine. FvbR fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels bactérien IclR. Peu d'études ont été réalisées sur le mode de régulation de FvbR. Il serait un répresseur de *fvbA* (codant pour le TDBT associé à la vibriobactine). Cette répression serait levée en présence du complexe vibriobactine-fer. Il est fort probable que le complexe vibriobactine-fer se fixe à FvbR, ce qui leverait la répression (Elias *et al.*, 2011).

### **III) Régulation par les petits ARN**

Les petits ARN (*small RNA*, sARN) mesurent environ entre 50 et 500 nucléotides et possèdent une forte structuration secondaire en tige boucles. Ces petits ARN régulateurs sont codés par des petits gènes en aval d'un promoteur spécifique et se terminent pour la plupart par un terminateur rho-indépendant. Plusieurs mécanismes de la régulation par les petits ARN sont

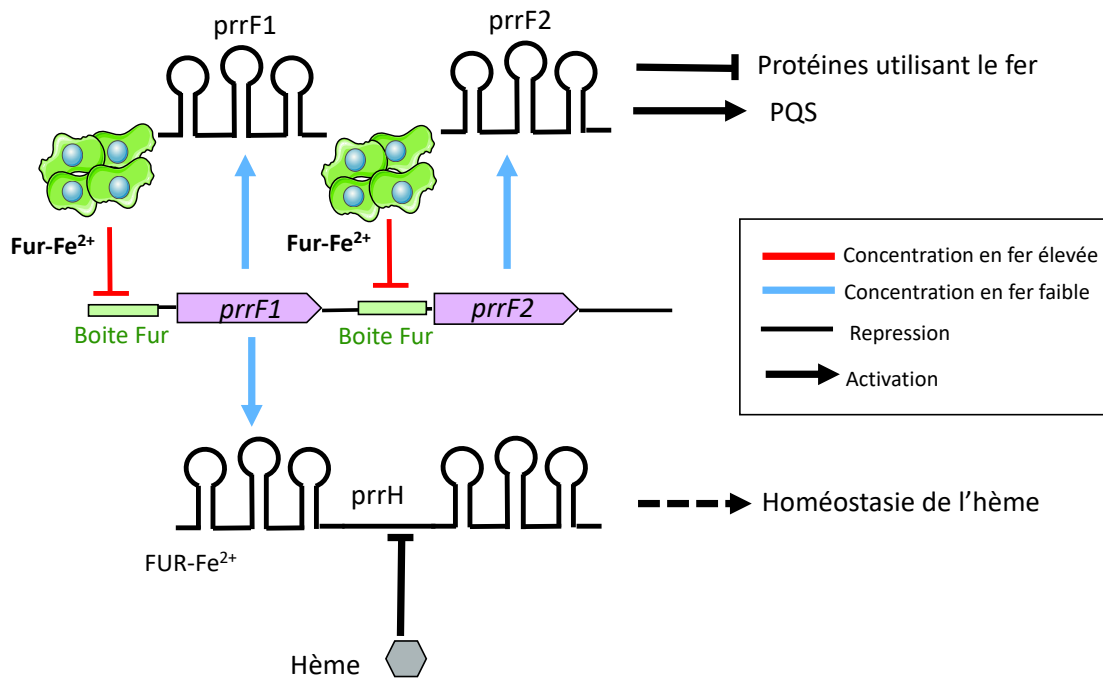
connus. Brièvement, le premier type de mécanisme repose sur l'hybridation d'un ARN messager (ARNm) avec un sARN ce qui va déstabiliser les ARNm. Cela entraîne la dégradation des ARNm et par conséquent l'absence d'expression des gènes cibles. Dans le second mécanisme, les sRNA s'hybrident avec l'ARNm ce qui modifie la structure secondaire des ARNm : soit la région RBS est masquée par cette hybridation et les ARNm cibles ne sont pas traduits (régulation négative), soit la région RBS est dévoilée et la traduction peut s'effectuer (régulation positive). Enfin les sARN peuvent moduler l'activité de protéines cibles en se fixant directement dessus (Majdalani *et al.*, 2005; Gottesman & Storz, 2011).

#### a. prfF1 et prfF2

La protéine Fur est également impliquée dans la régulation de l'expression de deux petits sARN : PrrF1 et PrrF2 qui sont homologues à 94% (Wilderman *et al.*, 2004). Ces deux petits ARN de 110 nucléotides sont homologues à RyhB, le premier sARN régulé par le fer à avoir été décrit chez *E. coli* (Jacques *et al.*, 2006). Les sARN PrrF1 et PrrF2 sont responsables de la répression de la transcription de gènes codant pour des protéines utilisant le fer, classées comme non essentielles pour *P. aeruginosa* (comme la superoxyde dismutase SodB, plusieurs enzymes du cycle de Krebs et des protéines à centre Fer-Souffre). Le mécanisme serait le même que pour RyhB, où les deux sARN se lieraient au niveau de la région complémentaire sur les ARNm afin de réduire leur stabilité et la traduction en protéine (Wilderman *et al.*, 2004). Ainsi, lorsqu'il y a trop peu de fer dans la cellule, PrrF1 et PrrF2 sont activés et empêchent la traduction des protéines non essentielles utilisant le fer, afin de favoriser ce nutriment pour d'autres réactions enzymatiques. Lorsque la concentration en fer devient assez élevée, la protéine Fur liée au fer réprime la transcription de PrrF1 et PrrF2, permettant ainsi à ces protéines non essentielles d'utiliser le fer disponible. Cette régulation a été nommée de manière élégante « la réponse épargnant le fer » (Figure n°34).

#### b. PrrH

L'organisation en tandem des gènes *prfF* permet l'expression d'un troisième sARN nommé PrrH qui est impliqué dans l'homéostasie de l'hème (Oglesby-Sherrouse & Vasil, 2010). PrrH est prédit pour réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie de l'hème (import, biosynthèse...) via la séquence unique dérivée de la région intergénique de *prfF1-prfF2* (Oglesby-Sherrouse & Vasil, 2010; Reinhart *et al.*, 2017). Le rôle biologique exact de PrrH n'est pas connu.



**Figure n°34 : Régulation par les petits ARN PrrF1, PrrF2 et PrrH.** Modifié d'après Reinhart *et al.*, 2016

#### IV) Interconnexion entre régulation de l'homéostasie du fer et d'autres systèmes : exemple de la PvdI

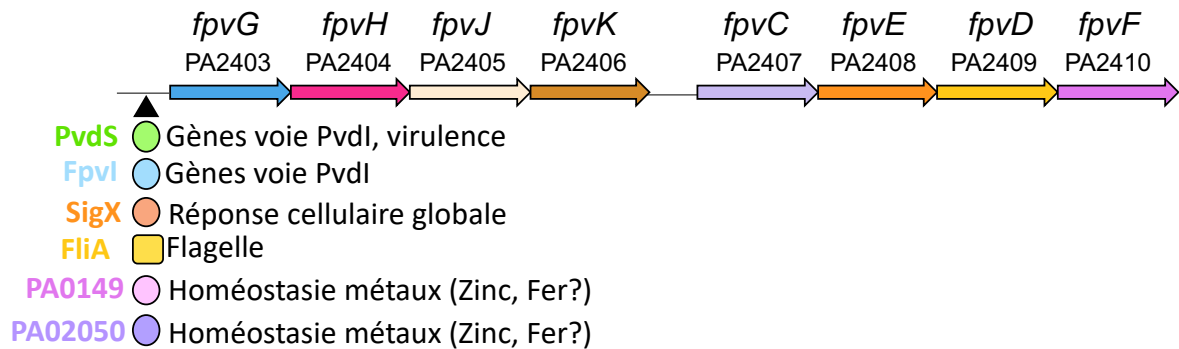
L'homéostasie du fer et sa régulation chez *P. aeruginosa* peut être interconnectée avec d'autres voies métaboliques et de virulence. Ce paragraphe met l'accent sur la voie PvdI car c'est cette voie d'import qui fait l'objet de cette thèse.

##### a. Voie PvdI et facteurs sigma extra-cytoplasmique

Un exemple illustrant ce principe est l'expression des gènes *fpvGHJKDEF*. Elle est contrôlée comme nous l'avons vu précédemment par les facteurs sigma PvdS et Fpvl, mais aussi par d'autres facteurs sigma à fonction extra cytoplasmiques. Ces autres ECF sont impliqués dans des systèmes de signalment de surface répondant à des signaux indépendants de l'homéostasie du fer (Chevalier *et al.*, 2019). Ces facteurs sigma sont (**Figure n°35**) :

- SigX: un facteur sigma impliqué dans la réponse cellulaire globale (chémotaxie, adaptation, mobilité, attachement, virulence, sécrétion de protéine...)

- PA0149 : un facteur sigma probablement associé au facteur anti-sigma PA0150 et au TDBT PA01451 dont les rôles sont inconnus mais qui permettrait probablement l'import d'un complexe sidérophore-métal
- FliA : ce facteur sigma n'est pas un ECF mais appartient à la famille des facteurs sigma 28 et est impliqué dans la régulation et la production du flagelle.
- PA2050 : les gènes régulés par ce potentiel facteur sigma ne sont pas identifiés mais seraient impliqués dans l'homéostasie des métaux.



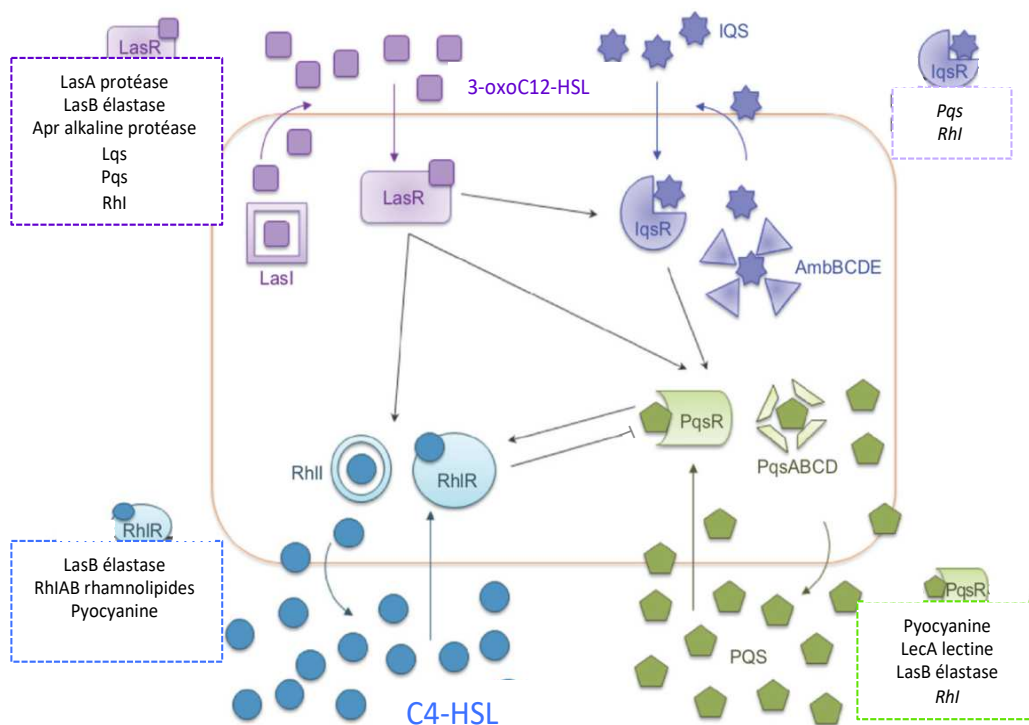
**Figure n°35 : Facteurs sigma impliqués dans la régulation des gènes d'import de la PvdI.** D'après Chevalier *et al.*, 2019.

De par son rôle dans l'acquisition du fer et la virulence bactérienne, la PvdI est une molécule importante pour *P. aeruginosa*. Compte tenu de la diversité des voies de régulation connectées à la transcription des gènes liés à la voie PvdI, cette voie d'import du fer pourrait être impliquée dans d'autres mécanismes plus ou moins indépendants du fer. Par exemple, la régulation par le facteur sigma FliA de la transcription des gènes impliqués dans l'import de PvdI-Fe suggère une régulation interconnectée entre la motilité et l'import du fer par la PvdI. L'expression du flagelle permettrait à la bactérie de se déplacer pour chercher le fer dans son environnement. La régulation par le facteur sigma SigX, impliqué entre autres dans la chimotaxie, appuierait également cette hypothèse. De plus, chez *P. putida*, un mutant incapable de produire de la PvdI perd sa motilité de type *swarming*. La concentration en fer dans le milieu extracellulaire pourrait agir dans ce cas comme un signal environnemental dans l'activation de la motilité mais le mécanisme exact n'est pas encore connu (Matilla *et al.*, 2007).

### **b. Relation de la voie PvdI avec le quorum sensing.**

Le quorum sensing est utilisé par la plupart des bactéries à Gram négatif pour la régulation et le contrôle de l'expression de divers gènes impliqués dans la virulence, le métabolisme, etc. Brièvement, il s'agit d'un mécanisme faisant intervenir la sécrétion d'auto-inducteurs (AI).

Lorsque le seuil de sécrétion d'AI a été atteint dans le milieu environnant les cellules, un complexe est formé entre les AI et un régulateur transcriptionnel ce qui va permettre d'activer ou non l'expression de nombreux gènes. Le quorum sensing est donc un mécanisme de communication entre les bactéries dépendant de la densité cellulaire puisque la concentration d'AI critique va dépendre de la densité cellulaire (Papenfort & Bassler, 2016). Plusieurs systèmes de régulation coexistent de manière hiérarchique chez *P. aeruginosa* : on retrouve les systèmes Las et Rhl qui dépendent de N-acyl homosérine lactones (AHL), le système PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) qui dépend des alkyle quinolones et le système IQS (Integrated Quorum Sensing) (J. Lee & Zhang, 2015). La **figure n°36** résume les différents facteurs de virulence qui sont sous le contrôle du quorum sensing chez *P. aeruginosa*.



**Figure n°36 : Mécanisme de régulation par le quorum sensing chez *P. aeruginosa* et facteurs de virulence associés.** Le 3-oxoC12-HSL (N-3-oxo-dodecanoyl homosérine lactone), le C4-HSL (N-butyryl-l-homosérine lactone), IQS et PSQ sont les molécules auto-inductrices des systèmes de quorum sensing Las, Rhl, IQS et PQS respectivement. Les flèches classiques signifient l'activation du système, les flèches finissant avec un trait signifient la répression du système. Modifié d'après (J. Lee & Zhang, 2015).

La voie PvdI est connectée aux deux systèmes de quorum sensing Las et Rhl. L'acylase périplasmique PvdQ impliquée dans l'hydrolyse de l'acide myristique ou myristoléique du précurseur de la PvdI est également capable d'hydrolyser les N-acyl homosérine lactones, qui sont les molécules auto-inductrices de ces systèmes de quorum sensing (Bokhove *et al.*, 2010). Ainsi, PvdQ régule négativement et de manière indirecte l'expression des gènes du



quorum sensing. Il a même été montré que l'administration de PvdQ en tant qu'inhibiteur du quorum sensing dans un modèle infectieux pulmonaire de souris atténuait la virulence liée à *P. aeruginosa* (Utari *et al.*, 2018). La voie PvdI est aussi connectée au troisième système quorum sensing, le système PQS. En effet, il a été montré que ce système était capable d'induire l'expression des gènes de biosynthèse de la PvdI et aussi de la Pch. En condition de biofilm, les molécules de PQS auraient aussi un rôle positif à jouer dans la production de sidérophores (Diggle *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2017).

Le rôle des sARN PrrF1 et PrrF2 va également au-delà de l'homéostasie du fer. En effet, ces deux petits ARN sont impliqués directement dans la virulence bactérienne : les PrrFs promeuvent la production de l'alkylquinolone 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, qui est l'auto-inducteur du système PQS. Ce système permet l'activation de l'expression de nombreux gènes de virulence comme *lasB*, *lecA*, la production de pyocyanine... (Cao *et al.*, 2001; Pesci *et al.*, 1999). De plus, dans un modèle murin mimant l'infection aiguë pulmonaire, il a été montré que le locus *prfF* codant pour les deux sARN est requis dans l'établissement de la virulence de *P. aeruginosa* (Reinhart *et al.*, 2015).

#### V) Adaptation phénotypique de *P. aeruginosa* en présence d'exosidérophores

Notre équipe a pu récemment démontrer la capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* en présence d'un mélange de plusieurs exosidérophores qu'elle peut exploiter (Perraud *et al.*, 2020). Cette étude a montré qu'en présence de sidérophores exogènes, *P. aeruginosa* active préférentiellement les voies d'import associées à ces exosidérophores tout en réprimant celles de ses propres sidérophores, la PvdI et la Pch. Ces études ont été réalisées dans un milieu carencé en fer ainsi que dans un milieu plus complexe impliquant un système d'infection par des cellules épithéliales (où la concentration en fer est élevée). L'affinité des sidérophores pour le fer joue en réalité un rôle important : plus le sidérophore sera compétitif pour le fer (comme les sidérophores Tris-Catécholés), plus il aura de chance d'activer l'expression du TBDT associé et des protéines d'import. Les voies d'imports du citrate-Fer et de l'hème ne sont par contre pas impactées par la présence d'exosidérophores (Perraud *et al.*, 2020). Ainsi, en plus des régulations intrinsèques décrites précédemment, *P. aeruginosa* est donc capable d'ajuster l'expression de ses voies d'imports du fer en fonction des molécules présentes dans le milieu extracellulaire. Elle profite donc au maximum de la diversité de son génome pour récupérer le fer.

## VI) Stockage du fer dans la cellule

La régulation de l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* est, comme nous avons pu le voir, complexe et fait intervenir de nombreux mécanismes de régulation. Cette complexité et cette diversité permettent à la cellule d'avoir une concentration intracellulaire en fer qui lui est optimale pour son métabolisme et sa croissance, tout en évitant une concentration trop forte en fer libre qui pourrait être toxique. En plus des différentes régulations qui ont été décrites dans ce chapitre, *P. aeruginosa* possède également un système de stockage du fer. Deux types de molécules de stockage sont connus chez les bactéries : les ferritine (Ftn) et les bacterioferritine contenant de l'hème (Bfr). Ces molécules oxydent le fer ferreux en utilisant l'O<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons et internalisent le fer ferrique résultant (Andrews *et al.*, 2003; Rui *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* possède deux protéines de stockage : la bacterioferritine BfrB et la ferritine FtnA (Yao *et al.*, 2011). Lorsque la cellule a besoin de fer, ce dernier est libéré des ferritines afin d'être utilisé par la cellule.

Le glutathion (GSH) a également été proposé comme molécule de stockage du fer. En effet, le GSH est une molécule que l'on retrouve en abondance dans le cytoplasme et qui est capable de fixer le Fe<sup>2+</sup> (Hider & Kong, 2011). Il a été montré que des mutants pour la biosynthèse de glutathion produisaient moins de PvdI. Ainsi, il existe un lien entre cette molécule et l'homéostasie du fer chez *P. aeruginosa* (Wongsaroj *et al.*, 2018). Le glutathion serait également un potentiel donneur d'électron dans la réaction de dissociation du complexe Pch<sub>2</sub>-Fe (Cox, 1980; Wongsaroj *et al.*, 2018).

# Objectifs de la thèse

Cette thèse a pour objectif d'étudier des mécanismes moléculaires de l'acquisition du fer par la voie PvdI chez *P. aeruginosa*.

**Dans un premier temps**, nous nous sommes intéressés à l'étape de dissociation du fer de la PvdI en abordant différents aspects. Nous avons tout d'abord étudié les interactions protéiques entre les protéines codées par les gènes *fpvGHJKDEF*, toutes impliquées dans le mécanisme d'import du complexe PvdI-Fe et de dissociation du fer du sidérophore. Nous avons opté pour une stratégie du double hybride bactérien. Comme toutes ces protéines sont transcrites plus ou moins ensemble et jouent toutes un rôle dans le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI, nous avons supposé qu'elles pourraient toutes interagir et éventuellement même former un complexe multi-protéique. Cette démarche a permis d'identifier des interactions protéiques, qui ont ensuite été validés par une approche biochimique (**Chapitre VI**). Nous nous sommes ensuite intéressés plus spécifiquement au mécanisme impliqué dans la dissociation du fer de la PvdI et plus particulièrement au rôle de la réductase FpvG (**Chapitre VII**).

**Dans un second temps**, nous nous sommes intéressés à la sécrétion de la PvdI. Comme nous l'avons décrit plus haut, la pompe à efflux PvdRTOpmQ est impliquée dans la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée et dans le recyclage de la PvdI ayant transporté du fer dans la cellule bactérienne. La délétion de cette pompe n'abolit pas totalement la sécrétion de la PvdI, indiquant qu'au moins un autre système de sécrétion non identifié est impliqué. Nous avons essayé d'identifier ce ou ces autres possibles systèmes de sécrétion responsables de l'export la PvdI (**Chapitre VIII**).



## **Partie II :** **Résultats**



**Chapitre VI :**  
**Réseau d'interactions des protéines**  
**impliquées dans la dissociation de**  
**Pvdl-Fe**

## I) Introduction

Le premier objectif de cette thèse a été de déterminer le réseau d'interaction des protéines impliquées dans l'import du fer par la PvdI chez *P. aeruginosa* et plus particulièrement entre les protéines codées par les gènes *fpvGHJKDEF*. Nous avons vu qu'après import de PvdI-Fe dans le périplasma par FvpA/FpvB, PvdI-Fe se lie certainement au complexe FpvC-FpvF puis est dissocié par réduction du fer. Cette réaction est médiée par FpvG, qui a besoin de l'expression de FpvHJK pour une activité optimale (Brillet *et al.*, 2012; Ganne *et al.*, 2017). FpvC aide à la dissociation en captant le fer ferreux formé et l'amène probablement au transporteur FpvDE pour son passage dans le cytoplasme. FpvF lie l'apo-PvdI, qui va être recyclée dans le milieu extracellulaire par la pompe d'efflux PvdRTOpmQ (F. Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2009). Les gènes codant pour ces différentes protéines sont organisés sous la forme d'un opéron (sauf pour *fpvF*) (Gao *et al.*, 2018). Ainsi, l'organisation génomique des gènes et le rôle de ces protéines pour le même mécanisme moléculaire suggèrent fortement des interactions entre toutes ces protéines et la formation d'un complexe intervenant dans le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI.

Pour étudier l'ensemble de ces interactions protéiques, nous avons dans un premier temps utilisé la stratégie de double hybride bactérien. Cette technique permet de détecter *in vivo* des interactions protéine-protéine sur la base de tests phénotypiques (Karimova *et al.*, 1998). Cette stratégie repose sur la fusion des protéines d'intérêts aux domaines T18 ou T25 de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. Si les protéines interagissent, les deux domaines se rapprochent et forment un enzyme actif. L'enzyme activé produit de l'AMPc, en présence d'ATP, qui va se fixer au régulateur catabolique CRP (cAMP Récepteur Protéin). Le complexe CRP-AMPc va alors induire l'expression du gène rapporteur *lacZ* et les interactions pourront être testées sur milieu indicateur, contenant le substrat de la  $\beta$ -galactosidase ou bien en mesurant directement l'activité de la  $\beta$ -galactosidase en milieu liquide. Ainsi, les interactions entre les protéines membranaires de la voie PvdI pourront être détectées par criblage blanc/bleu sur un milieu indicateur contenant le substrat de la  $\beta$ -galactosidase. La même approche de double hybride bactérien a également été utilisée pour étudier les interactions avec les protéines périplasmiques. Dans ce cas, les vecteurs de double hybride utilisés possèdent un domaine transmembranaire entre les domaines T18/T25 et les protéines périplasmiques. Les domaines T18 et T25 seront bien localisés dans le cytoplasme bactérien où se trouve l'ATP nécessaire à la production d'AMPc (Ouellette *et al.*, 2014). Dans un second temps, les interactions détectées en double hybride bactérien ont été confirmées par une autre approche plus biochimique en purifiant les complexes ou en les visualisant par des expériences de « pull-down ».

II) Résultats : Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié :



OPEN

# Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins

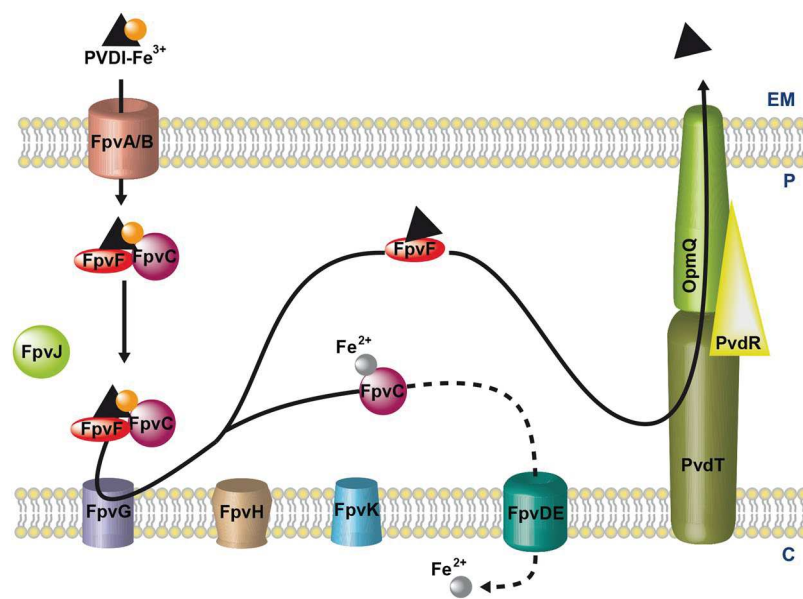
Anne Bonneau<sup>1,2</sup>, Béatrice Roche<sup>1,2\*</sup> & Isabelle J. Schalk<sup>1,2\*</sup> 

Pyoverdine (PVDI) has been reported to act both as a siderophore for scavenging iron (a key nutrient) and a signaling molecule for the expression of virulence factors. This compound is itself part of a core set of virulence factors produced by *Pseudomonas aeruginosa* during infections. Once secreted into the bacterial environment and having scavenged ferric iron, PVDI-Fe<sup>3+</sup> is taken back into the *P. aeruginosa* periplasm via the outer membrane transporters FpvAI and FpvB. Iron release from PVDI in the bacterial periplasm involves numerous proteins encoded by the *fpvGHJKDEF* genes and a mechanism of iron reduction. Here, we investigated the global interacting network between these various proteins using systematic bacterial two-hybrid screening. We deciphered a network of five interacting proteins composed of two inner-membrane proteins, FpvG (iron reductase) and FpvH (unknown function), and three periplasmic proteins, FpvJ (unknown function), FpvF (periplasmic PVDI-binding protein), and FpvC (iron periplasmic-binding protein). This interacting network strongly suggests the existence of a large protein machinery composed of these five proteins, all playing a role in iron acquisition by PVDI. Furthermore, we discovered an interaction between the periplasmic siderophore binding protein FpvF and the PvdRT-OpmQ efflux pump, also suggesting a role for FpvF in apo-PVDI recycling and secretion after iron delivery. These results highlight a multi-protein complex that drives iron release from PVDI in the periplasm of *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human Gram-negative pathogen considered by the World Health Organization to be an antibiotic-resistant priority pathogen<sup>1,2</sup>. During infections, *P. aeruginosa* faces a stressful environment and must overcome host-defense mechanisms. To survive within the host, *P. aeruginosa* secretes a large number of virulence factors, including the siderophores pyoverdines<sup>2,3</sup>. Siderophores are small organic compounds produced and secreted by bacteria to access iron<sup>4</sup>, a key nutrient essential for bacterial growth and virulence. Strains unable to produce pyoverdines have been reported to exhibit reduced virulence during infections in mice<sup>5</sup>. The role of pyoverdines in the virulence of *P. aeruginosa* has also been ascertained using rabbit and mouse lung infection models<sup>6–8</sup>. Pyoverdines are reported to have a dual role during infection. They are used as a siderophore by *P. aeruginosa* to scavenge iron from the host proteins<sup>5,8</sup> and also acts as a signaling molecule for the production of two major virulence factors, exotoxin A and the endo-proteinase PrpL<sup>3,9</sup>.

More generally, all fluorescent *Pseudomonas* species produce specific pyoverdines as major siderophores to access iron. These pyoverdines are all composed of a peptide of 6 to 12 amino acids, with a specific sequence, and linked to a chromophore derived from 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline<sup>10</sup>. The sequence of the peptide moiety of the different pyoverdines is very different in amino acid composition and in length among pyoverdines and is a determinant specific of each pseudomonads species<sup>10–14</sup>. *P. aeruginosa* strains produce three distinct pyoverdine types (PVDI, PVDII and PVDIII) each characterized by a different peptide chain<sup>15</sup> and PVDI is the siderophore produced by *P. aeruginosa* PAO1. Molecular mechanisms involved in iron acquisition by pyoverdines have mostly been investigated in *P. aeruginosa* PAO1.

<sup>1</sup>CNRS, UMR7242, ESBS, Illkirch, Strasbourg, France. <sup>2</sup>Université de Strasbourg, UMR7242, ESBS, Illkirch, Strasbourg, France. \*email: [beatrice.roche@unibas.ch](mailto:beatrice.roche@unibas.ch); [schalk@unistra.fr](mailto:schalk@unistra.fr)



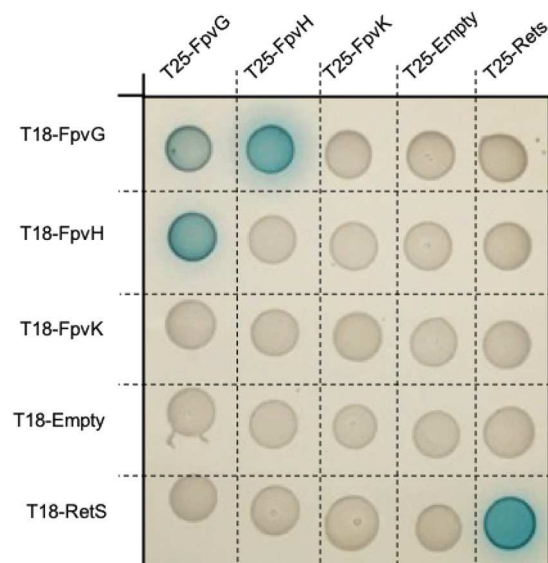
**Figure 1.** Model of  $\text{Fe}^{3+}$  uptake by the siderophore PVDI in *P. aeruginosa*. For details, see the Introduction section. EM: extracellular medium; P: periplasm; C: cytoplasm.

PVDI is synthesized by non-ribosomal peptide synthetases in the bacterial cytoplasm<sup>16,17</sup> and then matures in the periplasm<sup>18</sup> before secretion into the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ ATP-dependent efflux pump<sup>19</sup>. In the bacterial environment, PVDI chelates ferric iron, yielding the PVDI- $\text{Fe}^{3+}$  complex<sup>20</sup>. Ferric complexes of this siderophore are then recognized at the bacterial surface and imported across the outer membrane by two specific TonB-dependent transporters, FpvAI and FpvB (Fig. 1), with the TonB-ExxB-ExbD inner-membrane protein complex providing the necessary energy<sup>21–24</sup>. Once in the periplasm, PVDI- $\text{Fe}^{3+}$  is bound by the two periplasmic proteins, FpvC and FpvF<sup>25</sup>. Iron release from PVDI occurs in the bacterial periplasm and involves no chemical modification of the siderophore but rather iron reduction by the FpvG inner-membrane reductase<sup>26–28</sup>. *fpvG* is localized next to *fpvH*, *fpvJ*, and *fpvK* genes encoding three proteins of unknown function, but of which expression is required for optimal activity of FpvG<sup>28</sup>. Sequence alignment of FpvC revealed that this protein belongs to a group of metal-binding periplasmic proteins<sup>25</sup>, and previous *in vitro* studies of PVDI-Fe dissociation in the presence of DTT showed that FpvC can apparently bind ferrous iron after the reduction step and its dissociation from PVDI<sup>28</sup>. Iron is translocated further across the inner membrane into the cytoplasm by the predicted ABC transporter FpvDE<sup>25</sup>. All four proteins FpvC, FpvD, FpvE and FpvF, which genes are localized next to *fpvGHJK* genes, are also necessary for efficient dissociation of iron from PVDI<sup>28</sup>. After iron release, the apo form of PVDI is recycled into the extracellular medium by the PvdRT-OpmQ efflux pump, with the ability to again chelate  $\text{Fe}^{3+}$  in the bacterial environment<sup>29,30</sup>. Dimers of the periplasmic protein FpvF are able to bind apo-PVDI<sup>25</sup> and the recycling of apo-PVDI has been shown to be partially abolished in a  $\Delta fpvF$  mutant<sup>28</sup>, suggesting a role of FpvF in apo-PVDI recycling. Although it has been shown that FpvC and FpvF are able to form a complex that binds PVDI- $\text{Fe}^{3+}$ ,<sup>25</sup> the overall interaction network between all the proteins encoded by the *fpvGHJKCDEF* genes has not been yet investigated.

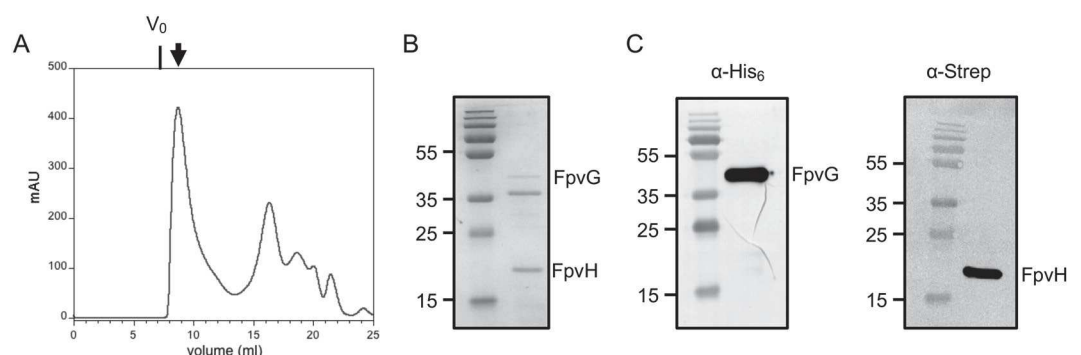
Here, we characterized the interacting network between *P. aeruginosa* proteins of the PVDI- $\text{Fe}^{3+}$  uptake pathway using the bacterial *E. coli* adenylate cyclase two-hybrid system (BACTH) for high throughput interaction screening. The results of BACTH screening revealed (i) an interaction between the two inner-membrane proteins FpvG and FpvH, (ii) an FpvJ-FpvC-FpvF periplasmic complex, and (iii) the ability of the two inner-membrane proteins (FpvG and FpvH) and the three periplasmic proteins (FpvC, FpvF, and FpvJ) to interact in a membrane machinery complex. These complexes were further confirmed by purification and pulldown experiments. We also found that the periplasmic apo-PVDI binding protein FpvF<sup>25</sup> is able to interact with PvdT, the inner-membrane protein of the PvdRT-OpmQ efflux pump, suggesting a role for FpvF in the transport of apo-PVDI to PvdRT-OpmQ through the bacterial periplasm. Our study has allowed unprecedented deciphering of the interacting network of the various proteins involved in  $\text{Fe}^{3+}$  release from PVDI in the periplasm of *P. aeruginosa*, linking both membrane and periplasmic proteins.

## Results

**Interaction between FpvG and FpvH and formation of an inner-membrane complex.** Previous studies have demonstrated that expression of the FpvH, FpvK, and FpvJ proteins is required for optimal reductase activity of FpvG<sup>28</sup>. Moreover, genes encoding the FpvG, FpvH, FpvJ, and FpvK proteins are organized in an operon<sup>31</sup> and it is well recognized that adjacent genes tend to encode interacting proteins<sup>32</sup>. FpvG, FpvH, and FpvK have been predicted to be inner-membrane proteins and FpvJ periplasmic, because of a signal peptide<sup>28</sup>. We deciphered the interacting network between the membrane proteins FpvG, FpvH, and FpvK by performing systematic BACTH screening in *E. coli*, which is based on the reconstitution of adenylate-cyclase activity. The



**Figure 2.** Interacting network with the membrane proteins FpvG, FpvH and FpvK. DHM1 cells producing the protein of interest fused to the T18 or T25 domain of adenylate cyclase were spotted on indicator plates containing X-gal for BATCH screening. Each protein was tested with an empty vector and the RetS protein, which is not related to the PVDI pathway. RetS is able to form dimers and serves as a positive control<sup>37</sup>. The blue color indicates an interaction between the two proteins of interest. The experiment was repeated three times with each time 10 colonies as described in Materials and Methods. A representative image is shown.



**Figure 3.** Purification of the inner-membrane FpvG-FpvH complex. (A) Size exclusion chromatography analysis of the solubilized and purified FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> complex on a Superdex 200 10/300 GL column. The dead volume is indicated as  $V_0$ . The arrow shows the fraction containing the FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> complex. (B) SDS-PAGE of the purified complex analyzed by Coomassie blue staining. (C) Immunoblot analysis of the purified complex using specific anti-His and anti-Strep antibodies. The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. The predicted size of FpvG<sub>His6</sub> and FpvH<sub>Strep</sub> are 46 kDa and 21 kDa respectively (Table S3 in Supplemental Material). Entire SDS-PAGE and blots are shown in Fig. S2 in Supplemental Information.

full-length *fpvG*, *fpvH*, and *fpvK* genes were fused to the T25/T18 domains of adenylate cyclase in the two-hybrid vectors. Screening of the possible protein-protein interactions between FpvG, FpvH and FpvK on indicator plates containing X-gal highlighted an interaction between FpvG and FpvH (Fig. 2), whereas no interaction could be observed for FpvK. FpvG interacted with itself, suggesting at least dimerization of this protein (Fig. 2). As FpvG was already been demonstrated to be an inner-membrane protein<sup>28</sup>, we investigated the subcellular localization of FpvH. Cell fractionation experiments showed that FpvH is also an inner-membrane protein (Fig. S1A in Supplemental Material).

We expressed FpvG and FpvH proteins with C-terminal His<sub>6</sub> and Strep-tag sequences, respectively, in *E. coli* to validate their interaction. Bacterial membranes were solubilized in detergent and the complex purified by Strep-trap affinity followed by size-exclusion chromatography (Fig. 3A). The presence of both FpvG and FpvH proteins in the elution peak was confirmed by Coomassie-blue staining and immunoblot analysis using specific anti-His<sub>6</sub> and anti-Strep antibodies (Fig. 3B,C). Isolation of the FpvG-FpvH complex confirmed the BACTH results and revealed the ability of FpvG reductase and FpvH to interact and form an inner-membrane complex.

**Interaction between FpvJ, FpvC, and FpvF and formation of a periplasmic protein complex.** FpvC and FpvF are the two periplasmic-binding proteins associated with the ABC transporter FpvDE<sup>25</sup>. Cell fractionation also demonstrated periplasmic localization of FpvJ (Fig. S1B in Supplemental Material). The presence of some FpvJ protein also in the cytoplasmic fraction was probably due to newly synthesized FpvJ, as previously described for periplasmic proteins<sup>33</sup>. Since the indicator plates assay cannot be used to detect interactions between periplasmic proteins, we screened the interactions between FpvJ, FpvC, and FpvF by quantifying  $\beta$ -galactosidase in liquid cultures (Fig. 4). Concerning the interaction between the three periplasmic proteins, we detected interactions between FpvJ and FpvC (Fig. 4A), FpvF with FpvJ and FpvC (Fig. 4B) as previously shown by Brillet *et al.*<sup>25</sup>, as well as an interaction of FpvC with itself (Fig. 4C). Altogether, our BACTH results show that the three proteins FpvC, FpvF, and FpvJ are able to all interact with each other, suggesting the existence of a periplasmic complex composed of the three proteins.

We overproduced FpvJ, FpvF, and FpvC in *E. coli*, adding a His<sub>6</sub>, Flag tag, and HA at the C-terminus of each protein, respectively, to confirm the existence of this periplasmic complex. The periplasmic fraction was incubated with anti-His beads. FpvF<sub>Flag</sub> and FpvC<sub>HA</sub> co-precipitated with FpvJ<sub>His6</sub> (Fig. 5). Negative controls showed that neither FpvF<sub>Flag</sub> nor FpvC<sub>HA</sub> alone were retained on the anti-His beads. Overall, these results show that FpvJ, FpvC and FpvF can form a periplasmic complex.

**Interaction between the inner-membrane proteins FpvG and FpvH with the periplasmic proteins FpvJ, FpvC, and FpvF.** Finally, we also tested the interactions between the inner-membrane and periplasmic proteins. BACTH analysis showed that both FpvG and FpvH membrane proteins interact with the three periplasmic proteins FpvJ, FpvF, and FpvC (Fig. 4). As with the membrane proteins, none of the periplasmic proteins interacted with FpvK in this two-hybrid approach (Fig. 4). Overall, BACTH screening revealed the existence of an interaction network between FpvG, FpvH, FpvJ, FpvF, and FpvC.

We next attempted to isolate all five proteins by pulldown experiments using an anti-Flag resin. The periplasmic fraction of *E. coli* overproducing FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, and FpvF<sub>Flag</sub> was incubated with solubilized membranes containing FpvG<sub>His6</sub> and FpvH<sub>Strep</sub>, and the mixture incubated with an anti-Flag resin. FpvG<sub>His6</sub>, FpvJ<sub>His6</sub>, and FpvC<sub>HA</sub> co-precipitated with FpvF<sub>Flag</sub> (Fig. 6). Equivalent results were obtained when fractions were incubated with PVDI-Fe (Fig. S5 in Supplemental Material). None of the non-Flag-tagged proteins were retained on the anti-Flag resin when incubated alone (Fig. S6 in Supplemental Material). We were unable to detect FpvH<sub>Strep</sub> either due to immunodetection problems or because this protein is not present in the complex. Overall, these results confirm the existence of at least a four-protein complex, linking the inner-membrane FpvG protein and three periplasmic components of the PVDI pathway. In addition, this complex could be isolated in the presence or absence of PVDI-Fe.

**FpvF interacts with the membrane protein PvdT of the PvdRTOPmQ efflux pump.** Previous studies have shown that FpvF can form dimers that bind apo-PVDI<sup>25</sup> and that PVDI recycling is altered in a  $\Delta$ *fpvF* mutant<sup>28</sup>. Based on these observations, it seemed possible that FpvF is involved in PVDI recycling by interacting with proteins of the efflux pump PvdRT-OPmQ. Indeed, our BACTH analysis revealed an interaction between FpvF and the membrane protein PvdT (Fig. 7).

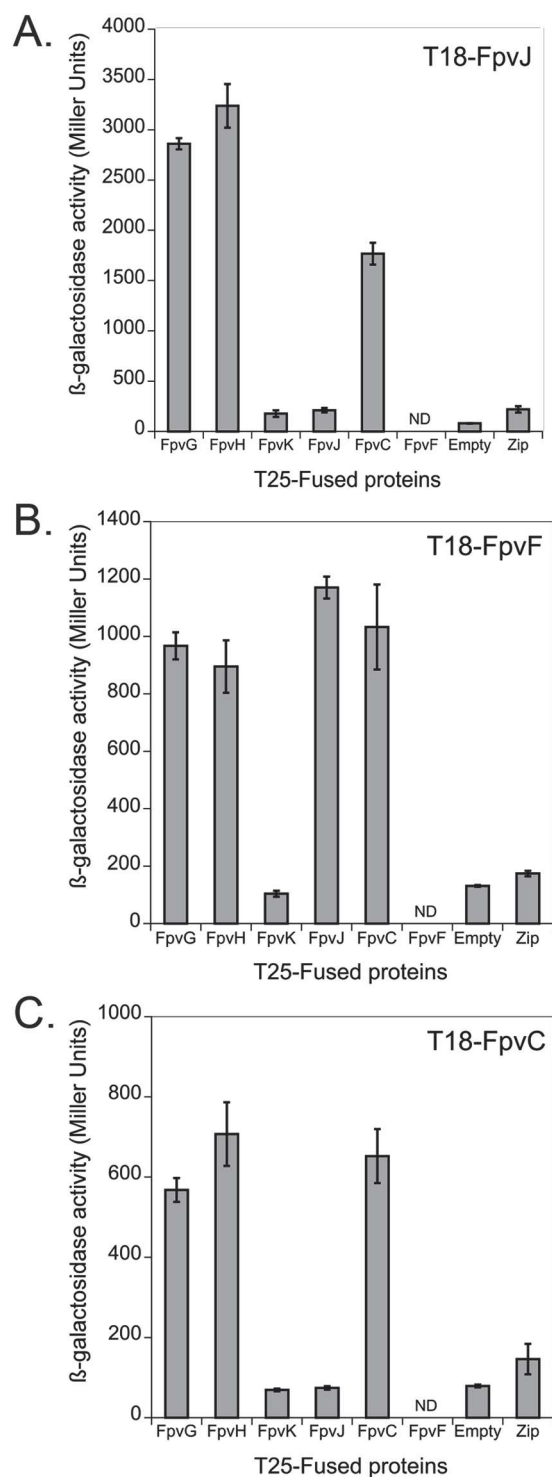
## Discussion

One of the major particularities of the PVDI-dependent iron acquisition pathway in *P. aeruginosa*, and probably conserved among fluorescent Pseudomonads, is that this siderophore delivers iron into the bacterial periplasm, with siderophore-free iron then being transported further by an ABC transporter into the cytoplasm. This mechanism is completely different from that described previously for other siderophore-dependent iron-uptake pathways, such as the enterobactin and ferrichrome pathways in *E. coli*, two archetypes in the field of bacterial iron homeostasis, which deliver iron directly into the bacterial cytoplasm<sup>34</sup>. After the uptake of PVDI-Fe<sup>3+</sup> across the outer membrane by FpvAI or FpvB<sup>21–23</sup>, iron release from PVDI in the bacterial periplasm requires the FpvGHJKDEF proteins<sup>28</sup>. Moreover, the molecular mechanism involved implies both iron reduction by FpvG reductase to decrease the affinity of PVDI for the metal and an iron chelator, FpvC<sup>26–28</sup>.

We used a systematic BACTH assay to unravel the interactions between these proteins and highlight specific interactions between FpvG reductase, the inner-membrane protein FpvH, and the three periplasmic proteins FpvJ, FpvC, and FpvF (Fig. 8). Although our BACTH screening was carried out using both N- and C-terminal T18/T25 tags, we observed no interactions with FpvK, suggesting that either (i) FpvK does not interact with the three other proteins, (ii) the interactions are transient or of weak affinity, (iii) the interaction requires a third protein partner, or (iv) the interaction is just not detectable by BACTH. Indeed, fusion to the T18 or T25 domains may affect the folding of the protein or prevent interactions<sup>35</sup>.

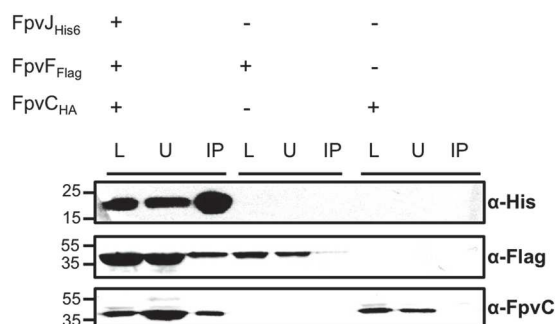
We biochemically confirmed the interaction between the two inner-membrane proteins FpvG-FpvH by affinity and size-exclusion chromatography, but we still know nothing about the stoichiometry of the FpvG-FpvH complex, except that FpvG is able to form dimers based on the BACTH data. Previously, the *in vivo* kinetics of iron dissociation from PVDI showed that FpvG activity is dependent on FpvH expression<sup>28</sup>. FpvJ and FpvK expression also affect FpvG activity, but clearly to a lower extent<sup>28</sup>. The ability of FpvK to affect FpvG reductase activity, like FpvH and FpvJ, highly suggests that it also interacts with the other inner-membrane proteins.

BACTH screening also showed an interacting network between the three periplasmic proteins FpvC, FpvF, and FpvJ. This complex was validated by pulldown experiments. FpvC and FpvF are two periplasmic-binding proteins associated with the ABC transporter FpvDE. Purified FpvC was shown to chelate ferrous iron in an *in vitro* PVDI-Fe dissociation assay using DTT as the iron reducer<sup>28</sup>. Mass spectrometry approaches under native conditions have shown that FpvF can bind PVDI, and that FpvC and FpvF are both able to form the tetrameric FpvC<sub>2</sub>-FpvF<sub>2</sub>-PVDI-Fe complex in the presence of PVDI-Fe<sup>25</sup>. The existence of FpvC-FpvF-PVDI-Fe complexes

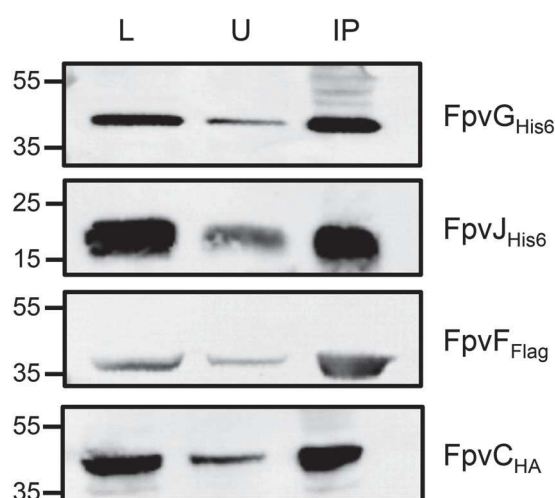


**Figure 4.** Interacting network with periplasmic (FpvC, FpvF and FpvJ) and membrane proteins (FpvG, FpvH and FpvK). Bacterial two-hybrid assays for proteins were quantified by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity, as described in Materials and Methods. Zip, which is not related to the PVDI pathway, served as a positive control<sup>38</sup>. ND: not determined because for FpvF we were unable to obtain the pKT25-FpvF vector. The experiment was repeated three times independently. Error bars represent the standard errors of the means.

in *P. aeruginosa* periplasm was confirmed by cross-linking experiments<sup>25</sup>, and we proposed that, after its uptake across the outer membrane, PVDI-Fe forms a FpvC-FpvF-PVDI-Fe complex. Isolation by pulldown experiments of the FpvC-FpvF-FpvJ complex strongly suggests that such a complex may exist in the bacterial periplasm of *P. aeruginosa* and is probably necessary in the mechanisms involved in iron release from PVDI.



**Figure 5.** Pull-down assay of the periplasmic FpvJ-FpvF-FpvC complex. Periplasmic fractions of BL21(DE3) cells co-expressing the indicated proteins FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, or FpvF<sub>Flag</sub> were incubated with anti-His beads. The loading (L), unbound (U), and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunodetection using anti-His<sub>6</sub>, anti-FpvC and anti-Flag antibodies. The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. The predicted size of FpvJ<sub>His6</sub>, FpvF<sub>Flag</sub> and FpvC<sub>HA</sub> are 15 kDa, 33 kDa and 36 kDa respectively. Entire blots are shown in Fig. S3 in Supplementary Information.

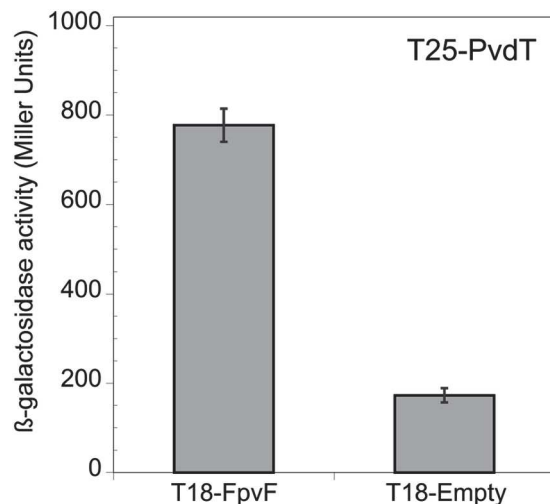


**Figure 6.** Pull-down assay of the FpvG-FpvJ-FpvC-FpvF complex. Periplasmic fractions of BL21(DE3) cells producing FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, FpvF<sub>Flag</sub> and membrane fraction of TOP10 cells producing FpvG<sub>His6</sub>, and FpvH<sub>Strep</sub> were incubated with anti-Flag beads. The loading (L), unbound (U), and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunodetection using anti-His<sub>6</sub>, anti-FpvC, and anti-Flag antibodies. The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. The predicted size are for FpvG<sub>His6</sub> 46 kDa, FpvH<sub>Strep</sub> 21 kDa, FpvJ<sub>His6</sub> 15 kDa, FpvF<sub>Flag</sub> 33 kDa and FpvC<sub>HA</sub> 36 kDa. Entire blots are shown in Fig. S4 Supplementary Information.

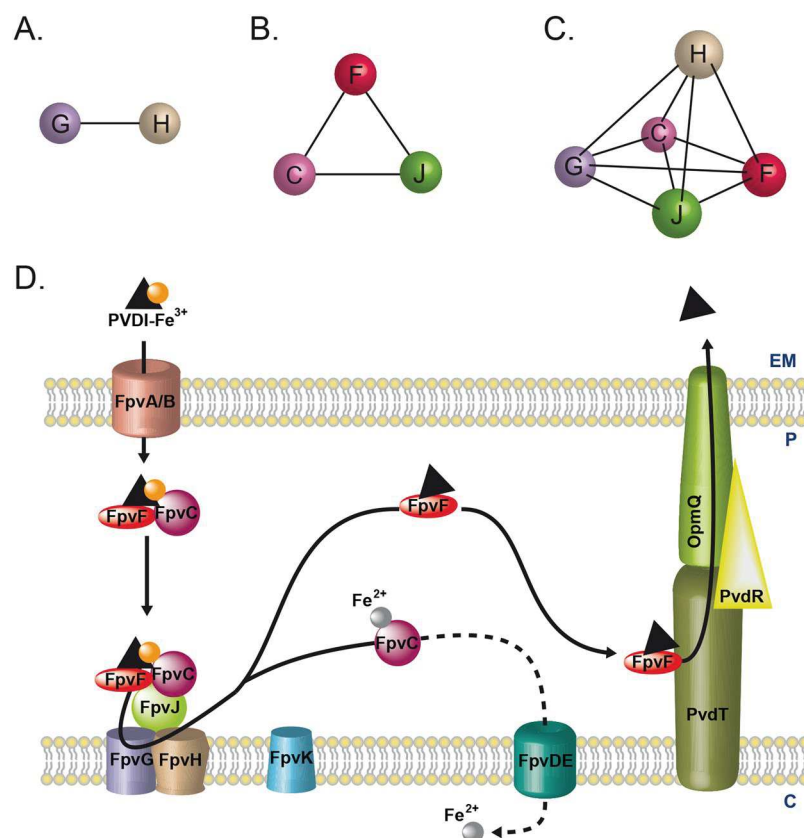
The function of FpvJ is currently unknown, but this protein may allow interaction of the FpvC-FpvF-PVDI-Fe complex with the FpvG-FpvH inner-membrane complex to achieve iron reduction and the transfer of ferrous iron from PVDI to FpvC. BACTH screening showed that all three periplasmic proteins FpvJ, FpvC, and FpvF can interact with the two-protein FpvG-FpvH complex in the absence or presence of PVDI-Fe, forming an inner-membrane machinery. We were able to isolate four of the five proteins by pull-down assay, confirming the existence of a complex between the inner-membrane reductase, FpvG, and the three periplasmic proteins, FpvF, FpvC, and FpvJ. Immunodetection of FpvH<sub>Strep</sub> with anti-Strep antibodies revealed non-specific bands of various molecular weights, preventing us from assessing the presence of FpvH in the pull-down assay (data not shown). The exact stoichiometry of this complex is still unknown.

Moreover, FpvDE is the putative ABC transporter that allows the translocation of ferrous iron across the inner membrane into the cytoplasm, and its deletion affects iron acquisition by PVDI<sup>25,28</sup>. We also evaluated the possible interactions of FpvDE with the periplasmic FpvC and FpvF and the membrane proteins FpvG, FpvH, and FpvK, but were unable to detect any interaction (data not shown). However, FpvC probably plays a role in bringing ferrous iron to the permease, FpvE, but further biochemical studies will be necessary to demonstrate this.

Finally, previous studies have demonstrated that FpvF dimers can bind apo-PVDI and apo-PVDI recycling is partially abolished in a  $\Delta fpvF$  mutant<sup>25,28</sup>. We thus investigated whether FpvF can interact with the PvdRT-OpmQ efflux pump involved in PVDI recycling. We found that FpvF interacts with PvdT, the inner-membrane protein of the efflux pump. This result strongly supports the hypothesis that FpvF or FpvF<sub>2</sub> binds apo-PVDI in a FpvF-PVDI or FpvF<sub>2</sub>-PVDI<sub>2</sub> complex and brings the apo-siderophore to PvdT for its recycling into the extracellular medium.



**Figure 7.** Interaction between the periplasmic FpvF protein and the inner-membrane PvdT protein of the efflux pump PvdRT-OpmQ. Bacterial-two hybrid assays were quantified by measuring the  $\beta$ -galactosidase activity, as described in Materials and Methods. The experiment was repeated three times independently. Error bars represent the standard errors of the means.



**Figure 8.** Model of the multi-protein machinery involved in iron acquisition via PVDI in *P. aeruginosa*. (A) Interacting network observed between inner membrane FpvG and FpvH proteins. (B) Interacting network between periplasmic proteins FpvF, FpvC and FpvJ. (C) Interacting network between inner membrane and periplasmic proteins. (D) Model of PVDI- $\text{Fe}^{3+}$  uptake by *P. aeruginosa* with the protein complexes highlighted. For details, see the Discussion section. EM: extracellular medium; P: periplasm; C: cytoplasm.

In conclusion, this study provides new insights about the possible interacting network of the various proteins involved in iron release from PVDI in the periplasm of *P. aeruginosa* (Fig. 8). These interactions have been highlighted using a two-hybrid approach and confirmed *in vitro* using purified or pulldown experiments; but

they existence still need to be confirmed in *P. aeruginosa* cells. This complex interacting network strongly suggests a multi-protein complex at the inner membrane, allowing iron to be removed from PVDI. Consequently, the molecular mechanisms for iron acquisition via PVDI involves the following steps (Fig. 8D). As detailed in the introduction, PVDI-Fe<sup>3+</sup> is imported across the outer membrane into the bacterial periplasm by FpvAI and FpvB. In the periplasm, PVDI forms a FpvC-FpvF-PVDI-Fe complex with the two periplasmic-binding proteins. As FpvJ was found to interact with both periplasmic and membrane proteins, it may help in the interaction of this periplasmic complex with the inner-membrane FpvG-FpvH complex. Iron reduction by FpvG decreases the affinity of PVDI for the metal and a transfer of iron to the periplasmic-binding protein FpvC, which likely brings iron to the FpvDE ABC transporter. Apo-PVDI is most likely bound to FpvF, which is able to interact with PvdT, allowing the recycling of apo-PVDI to the extracellular medium by the efflux pump PvdRTOpmQ. Moreover, this FpvGHJCF complex is the first example to be described of a complex between an inner-membrane reductase and two periplasmic-binding proteins associated with an ABC transporter.

Deciphering and understanding the protein-protein interacting network is an important piece in the understanding of the PVDI-Fe<sup>3+</sup> uptake pathway puzzle. Our work will undoubtedly initiate a number of future directions like chemical crosslinking experiments in *P. aeruginosa* cells with tagged proteins to assess the existence of this interacting network in the pathogen. Electron microscopy approaches are planned to obtain structural information on these different protein complexes. At last, further studies are also needed to understand the exact role of FpvH, FpvJ, and FpvK within the complexes and PVDI-Fe dissociation.

## Materials and Methods

**Chemicals, bacterial strains and growth medium.** Medium culture Lysogeny Broth (LB) and LB-agar were purchased from Difco. Detergent n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) was purchased from Anatrace, N-Lauroylsarcosine sodium (SLS) and Tween 20 from Sigma. The strains used in this study are listed in the Supplementary Table S1. Briefly, TOP10 and DH5α strains were used for cloning procedures, TOP10 and BL21 strains for protein production and DHM1 strains for bacterial two-hybrid assays. *E. coli* strains were routinely grown in LB medium at 37 °C and on LB-agar for solid culture. Plasmids were maintained by the addition of antibiotics such as ampicillin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), chloramphenicol (50 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml).

**Plasmid construction.** Plasmids used in this study are listed in Supplementary Table S1. All the PCRs were performed with DNA Phusion high-fidelity polymerase (ThermoFischer Scientific). DNA sequences from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 were taken from Pseudomonas Genome DataBank ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Oligonucleotides were purchased from Sigma and are listed in Supplementary Table S2. All primers used introduced restriction sites.

**Bacterial two-hybrid vectors.** pKT25 and pUT18C vectors were used for the expression of membrane proteins, whereas pKTM25-*zip* and pUTM18C vectors were used for the periplasmic proteins. Coding regions of *fpvG*, *fpvH*, *fpvK*, *fpvE*, *fpvD* and *pvdT* were amplified by PCR with primer pairs 1159/1160, 1161/1162, 1177/1178, 1199/1200, 1197/1198 and 1420/1411 respectively. The PCR products were digested with *KpnI/XbaI* and inserted into the same sites of pKT25 or pUT18C vectors to create pKT25-FpvG, pKT25-FpvH, pKT25-FpvK, pKT25-FpvD, pKT25-FpvE, pUT18C-FpvG, pUT18C-FpvH, pUT18C-FpvK, pUT18C-FpvD, pUT18C-FpvE and pKT25-PvdT. Coding regions of *fpvJ* and *fpvC* were amplified with primer pairs 1397/1201 and 1408/1202 respectively, and the relevant PCR products were digested with *XbaI/KpnI* or *XbaI/SacI* and cloned into the same sites of pKTM25-*zip* to create pKTM25-FpvJ and pKTM25-FpvC. To clone into the pUTM18C vector, *fpvJ*, *fpvC* and *fpvF* genes were amplified with primer pairs 1397/1212, 1408/1400 and 1399/1203 respectively, and then digested with *XbaI/KpnI* to be inserted into the same restriction sites of pUTM18C to create pUTM18C-FpvJ, pUTM18C-FpvC and pUTM18C-FpvF.

**Protein production vectors.** To construct pBAD24-FpvG<sub>His6</sub> and pBAD33-FpvH<sub>Strep</sub> vectors, coding regions of *fpvG* and *fpvH* were amplified with primer pairs 1185/1186 and 1189/1190, respectively. PCR products of *fpvG* and *fpvH* were digested with *NcoI/HindIII* and *EcoRI/HindIII* and inserted into the same sites of pBAD24 or pBAD33. To clone into the pRSF and pCDF vectors, primer pairs 1404/1405, 1408/1409 and 1406/1407 were used to amplify *fpvJ*, *fpvC* and *fpvF*, respectively. PCR products were digested by *EcoRI/HindIII* for *fpvJ* and *fpvC*, and *BglIII/KpnI* for *fpvF* and were cloned into the same restriction sites of pRSF or pCDF vectors to create pCDF-FpvJ<sub>His6</sub>, pCDF-FpvJ<sub>His6</sub>-FpvF<sub>Flag</sub>, pRSF-FpvC<sub>HA</sub> and pCDF-FpvF<sub>Flag</sub>.

All constructs were screened with colony PCR and plasmids were purified with the Macherey Nagel Nucleospin Plasmid kit in accordance with the manufacturer's instructions. All constructions were verified by DNA sequencing (Eurofins).

**Bacterial two-hybrid assay.** For plate-BACTH assay, two compatible vectors producing proteins fused to T18 or T25 domain were co-transformed into DHM1 cells that were incubated at 30 °C for 16 h. Ten independent colonies of each transformation were inoculated together into 2 ml of LB medium supplemented with ampicillin, kanamycin and 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) and incubated at 30 °C for 16 h. 5 µl of each culture was spotted onto LB-agar plate supplemented with appropriate antibiotics, 0.5 mM IPTG and 40 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, Sigma). The plate was incubated for 16 h at 30 °C.

For liquid medium assay, two compatible vectors producing proteins fused to T18 or T25 domain were co-transformed into DHM1 cells that were incubated at 37 °C for 16 h. Ten independent colonies of each transformation were inoculated into 2 ml of LB-medium supplemented with appropriate antibiotics and were



incubated at 37 °C during 24 h. The next day, 20 µl of each culture were inoculated in 2 ml of LB supplemented with appropriate antibiotics and 0.5 mM IPTG and incubated at 37 °C for 16 h. 100 µl of each culture was used for the β-galactosidase assay using Miller Protocol<sup>36</sup>.

**β-galactosidase dosage.** 100 µl of bacterial culture were added to 900 µl of Z Buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0, 0.2% β-mercaptoethanol). 1 µl of 0.1% sodium dodecylsulfate and 50 µl of chloroform were added to the suspension that was mixed vigorously for 10 seconds. The suspension was then incubated for 5 min at 28 °C. 200 µl of 4 mg/ml 2-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG, Sigma) were added to the cells. Reaction was stopped by adding 500 µl of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The suspension was centrifuged at 14,000 g for 3 min and the optical density of the supernatant was read at 420 and 550 nm. The β-galactosidase activity was then calculated in Miller Unit (MU) according to the following equation:

$$\text{MU} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420\text{nm}} - 1.75 \times \text{OD}_{550\text{nm}})}{\text{Time (min)} \times \text{Volume (mL)} \times \text{OD}_{600\text{nm}}}$$

**Expression and purification of the FpvG-FpvH inner membrane complex.** *E. coli* TOP10 strain was co-transformed with pBAD24-FpvG<sub>His6</sub> and pBAD33-FpvH<sub>Strep</sub>. Overnight culture was inoculated into LB medium supplemented with ampicillin and chloramphenicol and grown at 37 °C until OD<sub>600nm</sub> reached 0.6. Then, protein production was induced by addition of 0.01% L-arabinose for 4 h at 30 °C. Cell pellet was re-suspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and one protease inhibitor tablet (complete EDTA-Free protease inhibitor, Roche). After sonication, unbroken cells were removed by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was ultracentrifuged during 40 min at 100,000 g at 4 °C. The pellet was re-suspended into 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1% DDM and solubilized overnight at 4 °C. Membranes were collected by ultracentrifugation at 100,000 g for 40 min at 4 °C and loaded onto a StrepTrap Column (GE Healthcare) equilibrated with Buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.1% DDM). The FpvG-FpvH complex was eluted with Buffer A supplemented with 2.5 mM D-Desthiobiotin (Sigma). Fractions of interest were then concentrated using a 10,000 kDa molecular weight cut off (Amicon, Millipore) and loaded onto a Superdex 200 10/300 GL column equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.025% DDM. Fractions containing FpvH<sub>Strep</sub> and FpvG<sub>His6</sub> were collected for further analysis.

**Expression of the FpvJ-FpvF-FpvC periplasmic complex.** BL21(DE3) cells were transformed with pCDF-FpvJ<sub>His6</sub>-FpvF<sub>Flag</sub> and pRSF-FpvC<sub>HA</sub>. Overnight culture was inoculated into LB medium with streptomycin and kanamycin and grown at 37 °C until OD<sub>600</sub> reached 0.6. Then, protein production was induced by adding 0.4 mM IPTG at 22 °C for 16 h. Cells were subjected to cellular fractionation as described below for further analysis.

**Immunoblot analysis.** Nitrocellulose membranes were used for protein transfer by electroblotting. After saturation with blocking buffer (5% dried-milk powder, PBS 1X, 0.1% Tween 20), the membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibody: anti-Strep (1/2000, IBA), anti-HA (1/2000, Sigma), anti-FpvC (laboratory collection), anti-His<sub>6</sub> (1/3000, GeneTex), anti-OmpC (Biorbyt), anti-LepB (Biorbyt), anti-Ef-Tu (LSBio) or anti-MBP (Bioss antibodies). Immunoblots were developed by using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1/10000, GE Healthcare) followed by chemiluminescence detection. Molecular mass marker was purchased from ThermoFischer Scientific.

**Cellular fractionation.** *Periplasm and cytoplasm isolation.* *E. coli* strains overproducing proteins of interest were pelleted, washed with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and re-suspended into Tris-Sucrose EDTA Buffer (0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 20% sucrose and 1 mM EDTA). 200 µg/ml of lysozyme were added to the suspension, incubated for 1 h at 4 °C and the cells were centrifuged at 6,700 g for 10 min at 4 °C to remove unbroken cells and insoluble fraction (like insoluble proteins). The supernatant corresponding to the periplasm was ultracentrifuged at 100,000 g for 40 min at 4 °C. Spheroplasts were washed three times with Tris-Sucrose buffer and re-suspended into chill water and treated with benzonase (Sigma, 250U/µl). After incubation for 1 h at 37 °C, suspension was centrifuged for 40 min at 100,000 g at 4 °C to collect the cytoplasm (supernatant). The pellet, corresponding to the total membranes, was re-suspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0.

*Membrane isolation.* *E. coli* strains overproducing proteins of interest were pelleted, re-suspended in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and lysed by sonication. Unbroken cells were removed by centrifugation at 12,000 g for 15 min. Supernatant was centrifuged at 100,000 g for 40 min. The membranes (pellet) were solubilized in 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1% SLS for 16 h at 4 °C and ultracentrifuged at 100,000 g for 40 min at 4 °C. The pellet corresponds to the outer membranes and the supernatant to the inner membranes.

**Pulldown experiments.** *Periplasmic proteins.* BL21 (DE3) cells were transformed with pCDF-FpvJ<sub>His6</sub>-FpvF<sub>Flag</sub> and pRSF-FpvC<sub>HA</sub> or with pCDF-FpvF<sub>Flag</sub> or pRSF-FpvC<sub>HA</sub> only. Overnight culture was inoculated into LB medium with appropriate antibiotics and grown at 37 °C until OD<sub>600</sub> reached 0.6. Then protein production was induced by adding 0.4 mM IPTG at 22 °C for 16 h. Cells were re-suspended in buffer A (50 mM Tris pH 8.0, 250 µM EDTA, 20% sucrose), subjected to cellular fractionation and the periplasmic fraction was recovered. 100 µl of the periplasmic fraction were mixed with 50 µl agarose beads charged with nickel (Sigma) and incubated on a rotating wheel for 1 h at room temperature. The mixture was then centrifuged 2 min at 2,000 rpm

to remove the unbound proteins. Beads were washed twice with 50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl before being recovered by centrifugation for further analysis.

**Periplasmic and membrane proteins.** Periplasmic fractions containing FpvJ<sub>His6</sub>, FpvF<sub>Flag</sub>, FpvC<sub>HA</sub> were incubated with solubilized membranes isolated from TOP10 cells producing FpvG<sub>His6</sub> and FpvH<sub>Strep</sub> proteins and submitted to anti-Flag resin (Sigma). The next steps were performed as described above. When the experiment has been carried out in the presence of PVDI-Fe, 10 μM of the ferri-siderophore complex have been added during incubation with the anti-Flag resin.

Received: 5 June 2019; Accepted: 18 December 2019;

Published online: 10 January 2020

## References

- Tommasi, R., Brown, D. G., Walkup, G. K., Manchester, J. I. & Miller, A. A. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 529–542 (2015).
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection/Institut Pasteur* **2**, 1051–60 (2000).
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7072–7 (2002).
- Hider, R. Siderophore mediated absorption of iron. *Struct Bonding* **58**, 28 (1984).
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**, 518–23 (1996).
- Xiong, Y. Q., Vasil, M. L., Johnson, Z., Ochsner, U. A. & Bayer, A. S. The oxygen- and iron-dependent sigma factor *pvdS* of *Pseudomonas aeruginosa* is an important virulence factor in experimental infective endocarditis. *J. Infect. Dis.* **181**, 1020–1026 (2000).
- Imperi, F. *et al.* Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 7458–7463 (2013).
- Minandri, F. *et al.* Role of Iron Uptake Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Airway Infection. *Infect. Immun.* **84**, 2324–2335 (2016).
- Wilderman, P. J. *et al.* Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**, 5385–94 (2001).
- Demange, P. *et al.* Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Metals* **3**, 155–170 (1990).
- Budzikiewicz, H. Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z Naturforsch [C]* **52**, 713–20 (1997).
- Budzikiewicz, H. Siderophores of the *Pseudomonadaceae sensu stricto* (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products* **87**, 81–237 (2004).
- Budzikiewicz, H., Schafer, M., Fernandez, D. U., Matthijs, S. & Cornelis, P. Characterization of the chromophores of pyoverdins and related siderophores by electrospray tandem mass spectrometry. *Biomaterials* **20**, 135–44 (2007).
- Fuchs, R., Schafer, M., Geoffroy, V. & Meyer, J. M. Siderotyping—a powerful tool for the characterization of pyoverdins. *Curr Top Med Chem* **1**, 31–57 (2001).
- Meyer, J. M. *et al.* Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143**(Pt 1), 35–43 (1997).
- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I. L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in microbiology* **15**, 22–30 (2007).
- Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O. & Schalk, I. J. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *Journal of inorganic biochemistry* **148**, 27–34 (2015).
- Yeterian, E. *et al.* Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids* **38**, 1447–59 (2010).
- Hannauer, M., Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L. & Schalk, I. J. Secretion of newly synthesized pyoverdine by *Pseudomonas aeruginosa* involves an efflux pump. *FEBS Lett* **584**, 4751–5 (2010).
- Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A. Z. & Abdallah, M. A. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* **33**, 6391–6402 (1994).
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K. & Heinrichs, D. E. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**, 4597–604 (1993).
- Ghysels, B. *et al.* FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 1671–80 (2004).
- Brillet, K. *et al.* A β-strand lock-exchange for signal transduction in TonB-dependent transducers on the basis of a common structural motif. *Structure* **15**, 1383–91 (2007).
- Poole, K., Neshat, S., Krebs, K. & Heinrichs, D. E. Cloning and nucleotide sequence analysis of the ferripyoverdine receptor gene *fpvA* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **175**, 4597–4604 (1993).
- Brillet, K. *et al.* An ABC transporter with two periplasmic binding proteins involved in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS chemical biology* **7**, 2036–45 (2012).
- Schalk, I. J., Abdallah, M. A. & Pattus, F. Recycling of Pyoverdine on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdine Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **41**, 1663–1671 (2002).
- Greenwald, J. *et al.* Real-time FRET visualization of ferric-pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for ferrous iron. *J Biol Chem* **282**, 2987–2995 (2007).
- Ganne, G. *et al.* Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1056–1065 (2017).
- Imperi, F., Tiburzi, F. & Visca, P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20440–5 (2009).
- Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L. & Schalk, I. J. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Report* **2**, 412–418 (2010).
- Gao, L. *et al.* The Two-Operon-Coded ABC Transporter Complex FpvWXYZCDEF is Required for *Pseudomonas aeruginosa* Growth and Virulence Under Iron-Limiting Conditions. *J. Membr. Biol.* **251**, 91–104 (2018).
- Teichmann, S. A. & Babu, M. M. Conservation of gene co-regulation in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Biotechnol.* **20**, 407–410; discussion 410 (2002).
- Perraud, Q. *et al.* A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2603–2614 (2018).
- Schalk, I. J. & Guillon, L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **44**, 1267–1277 (2013).

35. Battesti, A. & Bouveret, E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods* **58**, 325–334 (2012).
36. Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1972).
37. Vincent, F. *et al.* Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environ. Microbiol.* **12**, 1775–1786 (2010).
38. Ouellette, S. P., Gaudiard, E., Antosová, Z. & Ladant, D. A Gateway<sup>®</sup>-compatible bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system. *Environ Microbiol Rep* **6**, 259–267 (2014).

### Acknowledgements

Authors acknowledge the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Strasbourg for general financial support. We would like to thank Roche Pharmaceutical Research and Early Development Basel for their financial support via the Roche Postdoctoral Fellowship (RPF) Program. BR held a fellowship from Roche Postdoctoral Fellowship and AB from the French *Ministère de la Recherche et de la Technologie* (3 years). We thank Christophe Bordi (LISM, Marseille) and Daniel Ladant (Institut Pasteur, Paris) for kindly providing the two-hybrid vectors.

### Author contributions

Anne Bonneau: Investigation, Writing- Original draft preparation. Béatrice Roche: Conceptualization, Methodology, Writing- Original draft preparation, Supervision, Validation. Isabelle J. Schalk: Conceptualization, Validation, Writing – Review & Editing, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.R. or I.J.S.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins

Anne Bonneau<sup>a,b</sup>, Béatrice Roche<sup>a,b\*</sup>, and Isabelle Schalk<sup>a,b\*</sup>

Strains		Characteristics	Reference
<i>E. coli</i> TOP10		F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), φ80 <i>lacZ</i> , Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>mup</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)		F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), λ(DE3 [ <i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7p07</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i> ]), [ <i>malB<sup>+</sup></i> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )	Novagen
<i>E. coli</i> DH5α		F- Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Laboratory collection
<i>E. coli</i> DHM1		F-, <i>cya-</i> , <i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>spoT1</i> , <i>rfbD1</i> , <i>cya-854</i>	1
Plasmids	ID collection	Characteristics	Reference
pKT25	283	P15 origin, Plac, N-terminal T25 cyclase fragment, Kan <sup>R</sup>	1
pUT18C	282	ColE1 origin, Plac, N-terminal T18 cyclase fragment, Ap <sup>R</sup>	1
pUTM18C	304	Modified pUT18C with the first TM domain of OppB ( <i>E. coli</i> ) inserted downstream T18	2
pUTM18C-zip	305	Modified pUT18C with the first TM domain of OppB ( <i>E. coli</i> ) inserted downstream T18, encoding a fragment of leucine zipper protein	2
pKTM25-zip	306	Modified pKT25 with the first TM domain OppB ( <i>E. coli</i> ) inserted downstream T25, encoding a fragment of leucine zipper protein	2
pKT25-FpvG	pAB9	FpvG cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-FpvH	pAB10	FpvH cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-FpvK	pAB11	FpvK cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-pvdT	pAB24	pvdT cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-FpvD	pAB25	FpvD cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-FpvE	pAB26	FpvE cloned into pKT25, downstream T25 sequence	This study
pKT25-RetS	285	RetS cloned into pKT25, downstream T25 sequence	3
pUT18C-FpvG	pAB12	FpvG cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	This study
pUT18C-FpvH	pAB13	FpvH cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	This study
pUT18C-FpvK	pAB14	FpvK cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	This study
pUT18C-FpvD	pAB27	FpvD cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	This study
pUT18C-FpvE	pAB28	FpvE cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	This study
pUT18C-RetS	284	RetS cloned into pUT18C, downstream T18 sequence	3
pKTM25-FpvJ	pAB19	FpvJ cloned into pKTM25-zip vector	This study
pKTM25-FpvC	pAB20	FpvC cloned into pKTM25-zip vector	This study
pUTM18C-FpvC	pAB22	FpvC cloned into pUTM18C	This study
pUTM18C-FpvF	pAB23	FpvF cloned into pUTM18C	This study
pUTM18C-FpvJ	pAB21	FpvJ cloned into pUTM18C	This study
pBAD24	348	pBR322 origin, Para, <i>araC</i> , Ap <sup>R</sup>	4
pBAD33	349	pACYC184 origin, Para, <i>araC</i> , Cm <sup>R</sup>	4
pRSFDuet-1	253	RSF origin, pT7, Kan <sup>R</sup>	Novagen
pCDFDuet-1	357	CDF origin, pITG, <i>lacI</i> , Strep <sup>R</sup>	Novagen

pBAD24-FpvG <sub>His6</sub>	pAB2	FpvG cloned into pBAD24 with C-terminal His <sub>6</sub> sequence	This study
pBAD33-FpvH <sub>Strep</sub>	pAB3	FpvH cloned into pBAD33 with C-terminal Strep sequence	This study
pCDF-FpvJ <sub>His6</sub> FpvF <sub>Flag</sub>	pAB6	FpvJ and FpvF cloned into MCS1 of pCDFDuet-1 with C-terminal His <sub>6</sub> and Flag sequence, respectively.	This study
pCDF-FpvJ <sub>His6</sub>	pAB5	FpvJ cloned into MCS1 of pCDFDuet-1 with C-terminal His <sub>6</sub> sequence	This study
pRSF-FpvC <sub>HA</sub>	pAB7	FpvC cloned into MCS2 of pRSFDuet-1 with C-terminal HA sequence	This study
pCDF-FpvF <sub>Flag</sub>	pAB8	FpvF cloned into MCS1 of pCDFDuet-1 with C-terminal Flag sequence	This study

**Table S1 Strains and plasmids used in this study**

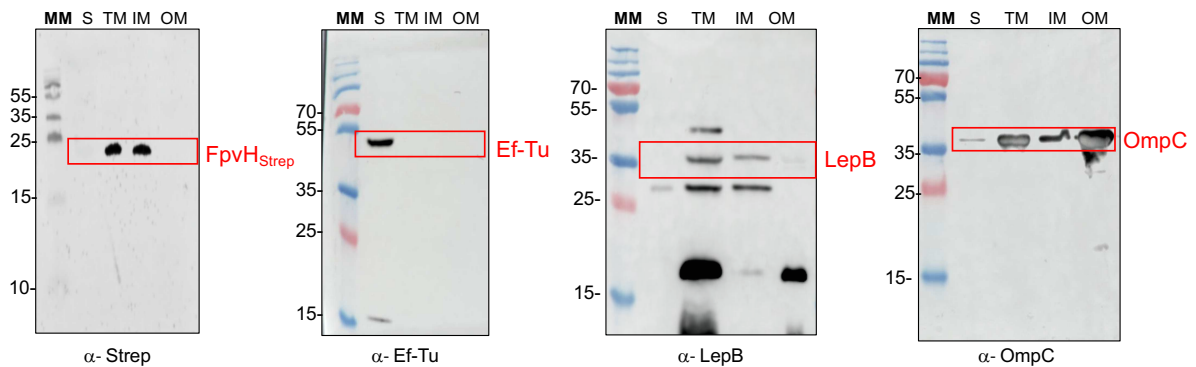
Two-hybrid plasmids	ID collection	Sequence (5' → 3')
pKT25-FpvGUP	1159	CCGGTCTAGAGATGTCGAAAAAGTCCCCTCCAGA
pKT25-FpvGDO	1160	CCGGGGTACCCGTGGCTGTCCCTCCGCGGTCTGGTT
pKT25-FpvHUP	1161	CCGGTCTAGAGATGAGCAAGGCCGCCGTTGCCAG
pKT25-FpvHDO	1162	CCGGGGTACCCGTTGCTTACCTCGTTTGTTCAGCCA
pKT25-FpvKUP	1177	CCGGTCTAGAGATGAGCGTCGAAACCGTCCGCCCG
pKT25-FpvKDO	1178	CCGGGTACCCGATGGCGGTGCTGACGGGTACAGCC
pKT25-FpvDUP	1197	CCGGTCTAGAGATGAGCATCCACACCCGCCCTGG
pKT25-FpvDDO	1198	CCGGGGTACCCGTGGCGCGGCGATGTCGGCGTGGTC
pKT25-FpvEUP	1199	CCGGTCTAGAGATGAACGACGCCTACGAACAACCTG
pKT25-FpvEDO	1200	CCGGTCTAGAGATGAACGACGCCTACGAACAACCTG
pKT25-pvdTUP	1410	CCGGTCTAGAGATGAAAAACGCCACGCAACCCGTC
pKT25-pvdTDO	1411	CCGGGGTACCCGTTGGCTGGCCAGGGCGGCCACCGG
pKTM25-FpvCUP	1408	CCGGTCTAGAGGAAGACGGCAAACGCCTGCGCATC
pKTM25-FpvCDO	1202	CCGGGAGCTCTCATGCGCCGACTCCTGGATGGC
pUTM18C-FpvCDO	1400	CCGGGGTACCCGTGCGCCGACTCCTGGATGGCGCG
pKTM25-FpvJUP	1397	CCGGTCTAGAGCACAAACCGATGCGAATGCGAG
pKTM25-FpvJDO	1201	CCGGGAATTCTCATGGCGCGGCGATGTCGGCGTGG
pUTM18C-FpvJDO	1212	CCGGGGTACCCGTGGCGCGGCGATGTCGGCGTGGTC
pUTM18C-FpvFUP	1399	CCGGTCTAGAGGCGACGCCGCGCGGCCAGTCC
pUTM18C-FpvFDO	1203	CCGGGGTACCCGTCAGCCCTTACCGCCAGCAGCCC
<b>Proteins production plasmids</b>		<b>Sequence (5' → 3')</b>
FpvG-p24HisCter F	1185	CCGGCCATGGCCTCGAAAAAGTCCCCTCCAGACTC
FpvG-p24HisCter R	1186	CCGGAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGGCTAGCTGGCTGTCCCTCCGCGGTCTGGTT
FpvH-p33StrepCter F	1189	CCGGGAATTC AAGGAGATATACATATGAGCAAGGCCGCCGTTGCCAGCCC
FpvH-p33StrepCter_R	1190	CCGGAAGCTTCAATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGCTTGTACCTCGTTTGTTCAGCCA
FpvJ-pCDFHisCter F	1404	CCGGCCATGGGACGATCCACACCCGCCCTGGCGC
FpvJ-pCDFHisCter R	1405	CCGGGAATTC AATGATGATGATGATGATGGCTAGCTGGCGCGGCGATGTCGGCGTGGTC
FpvF-pCDFFlagCter F	1406	CCGGGAATTC AAGGAGATATACATATGAACCTGAAACCCATTGCCTC
FpvF-pCDFFlagCter R	1407	CCGGAAGCTTCACTTGTGTCATCGTCTTTGTAGTCGCTAGCGCGCCCTTCGACTATCGCTTTCTGT
FpvC-pRSFHA Cter F	1408	CCGGAGATCTAAGGAGATATACATATGCTGTTCTCCCGTCGCTCATCC
FpvC-pRSFHA Cter R	1409	CCGGGGTACCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGCTAGCTGCGCCGACTCCTGGATGGCGCG

**Table S2: Oligonucleotides used in this study**

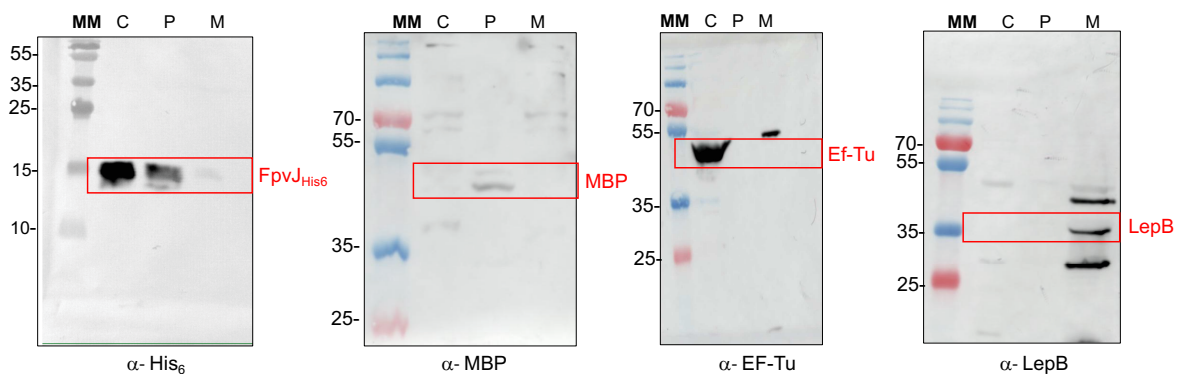
Protein	Theoretical MW (KDa)	Theoretical MW with tag (KDa)
FpvG	45	46
FpvH	20	21
FpvJ	11	15
FpvF	32	33
FpvC	34	36

**Table S3: Theoretical MW of the proteins tested for protein interactions in this study with and without tag.**

**A.**



**B.**

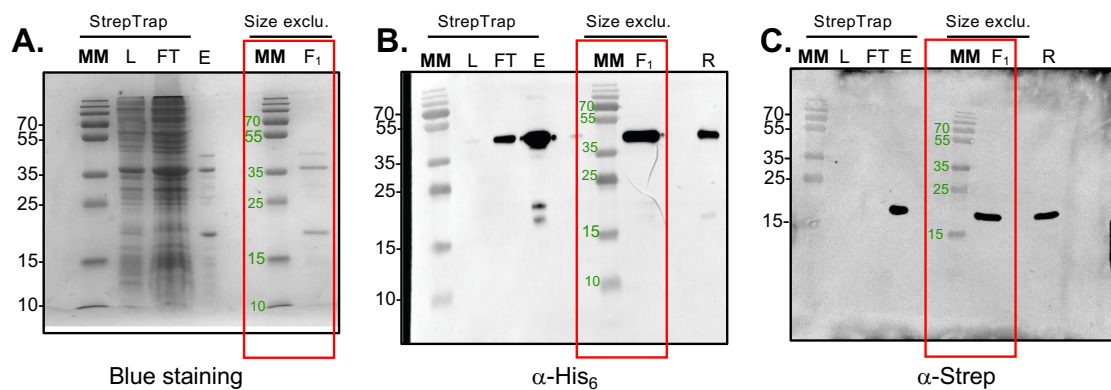


**Fig. S1. (A)** TOP10 cells producing FpvH<sub>Strep</sub> were harvested and membrane fractions were collected as described in Materials and Methods procedures. Samples were loaded onto a 12 % SDS-PAGE gel for immunodetection analysis. MM, molecular marker; S, soluble fraction; TM, Total membrane; IM, Inner membranes; OM, Outer membranes. To check for correct cell fraction antibody against specific cytoplasmic, inner and outer membrane proteins were used: anti-Ef-Tu for the soluble fraction (Ef-Tu

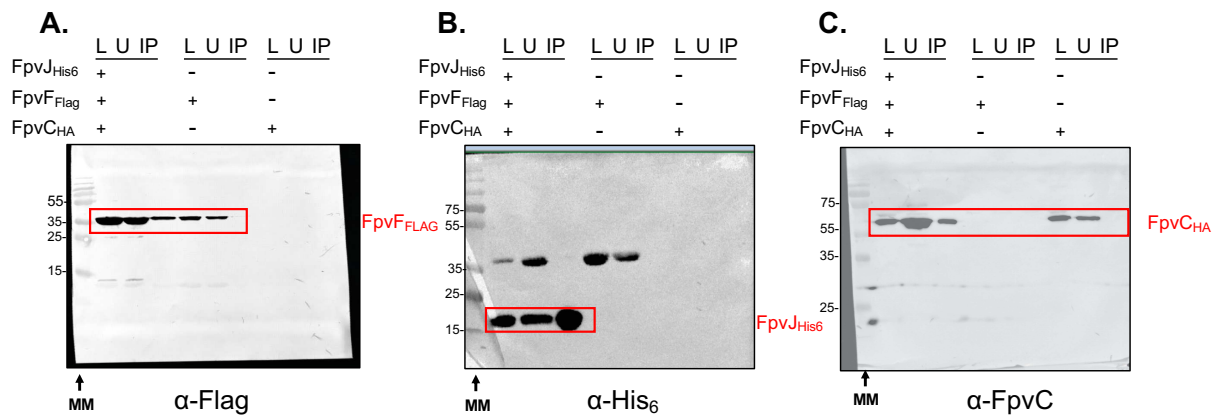
being a cytoplasmic protein); anti-LepB for the inner membrane fraction and anti-OmpC for the outer membrane fraction. Anti-Strep was used to detect FpvH<sub>Strep</sub>.

(B) BL21 (DE3) cells producing FpvJ<sub>His6</sub> were submitted to cellular fractionation. MM, molecular marker; P, periplasm, C, cytoplasm, TM, total membranes were collected and loaded onto a 15 % SDS-PAGE gel for immunodetection analysis. The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. To check for correct cell fractionation antibody against specific cytoplasmic, periplasmic and membrane proteins were used: anti-Ef-Tu for the cytoplasmic fraction; anti-MBP for the periplasmic fraction and anti-LepB for the membrane fraction. Anti-His was used to detect FpvJ<sub>His</sub>.

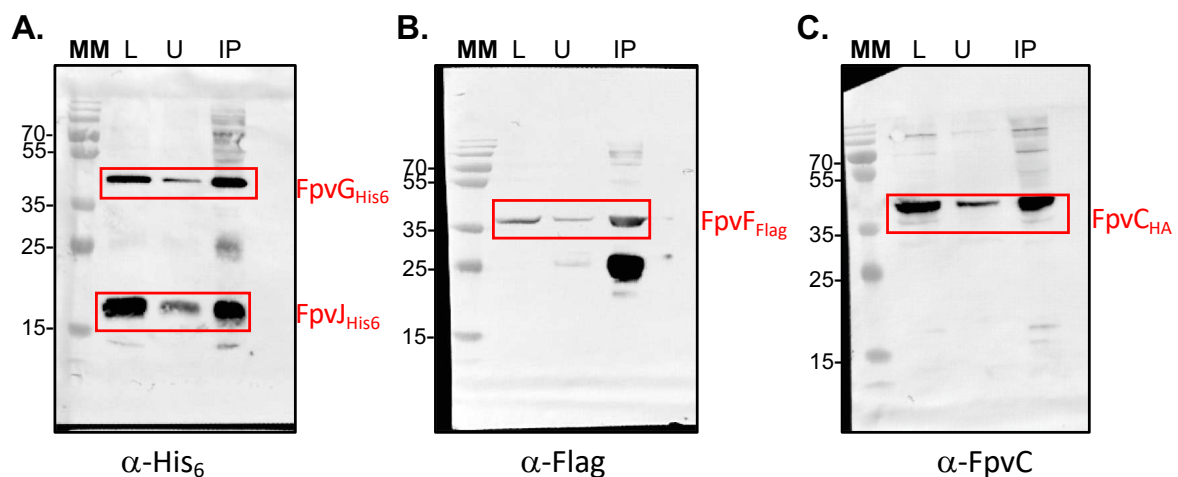
Ef-Tu is a cytoplasmic elongation factor, MBP (maltose binding protein) is a periplasmic binding protein involved in the uptake of maltodextrins, LepB an inner membrane peptidase, OmpC an outer membrane porin.



**Fig. S2: Original gels of SDS-PAGE and blots presented in Fig. 3.** FpvG-FpvH was first purified on a StrepTrap column and afterwards on a Size exclusion chromatography (Superdex 200 10/300 GL column). (A) SDS-PAGE of the purified complex analyzed by Coomassie blue staining. (B-C) Immunoblot analysis using specific anti-His (B) and anti-Strep antibodies (C). The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. MM, Molecular Marker (KDa); L, Load fraction loaded on the affinity Strep column; FT, Flow-through; E: Elution (containing FpvG and FpvH); GF: Fraction of the size-exclusion chromatography containing FpvG and FpvH; R, Positive control with bacteria expressing His-tagged FpvG (panel B) and Strep tag FpvH (panel C). In red are the fractions of SDS-PAGE and blots presented in Fig. 3. The predicted size of FpvG<sub>His6</sub> and FpvH<sub>Strep</sub> are 46 kDa and 21 kDa respectively.

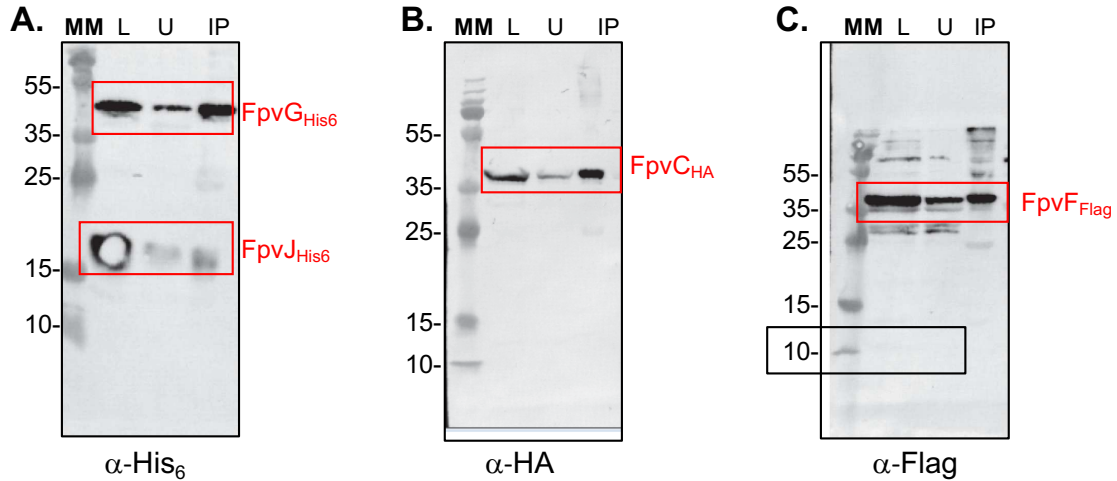


**Fig. S3: Original gels of blots presented in Figure 5.** Periplasmic fractions of BL21(DE3) cells co-expressing the indicated proteins FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, or FpvF<sub>Flag</sub> were incubated with anti-His beads. The loading (L), unbound (U), and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunodetection using anti-Flag, anti-His<sub>6</sub> and anti-FpvC antibodies. The molecular mass markers (MM) are indicated on the left (kDa). In red are the fractions of blots presented in Figure 5. The predicted size of FpvJ<sub>His6</sub>, FpvF<sub>Flag</sub> and FpvC<sub>HA</sub> are 15 kDa, 33 kDa and 36 kDa respectively. FpvJ<sub>His6</sub> expressed in BL21(DE3) cells, copurifies with a unknown protein of around 37 kDa.

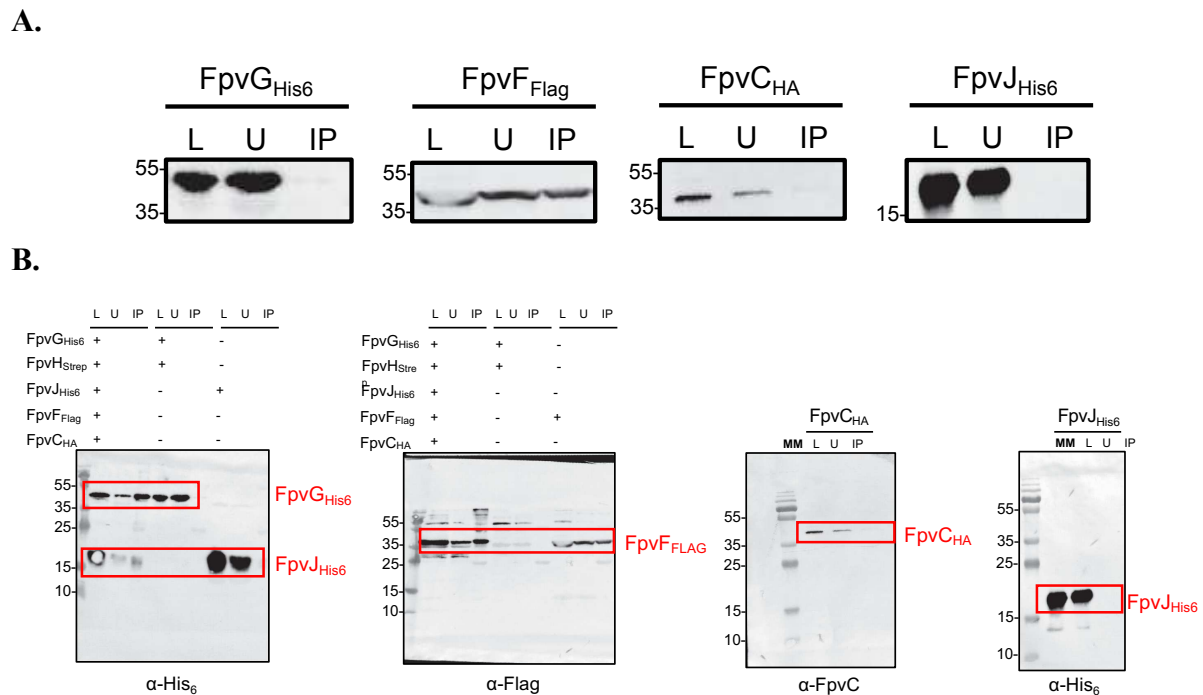


**Fig. S4: Original gels of blots presented in Figure 6.** Periplasmic fraction of BL21(DE3) cells and membrane fractions of TOP10 cells producing the indicated proteins FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, FpvF<sub>Flag</sub>, FpvG<sub>His6</sub>, and FpvH<sub>Strep</sub> were incubated with anti-Flag beads. The loading (L), unbound (U), and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunodetection using anti-His<sub>6</sub> (panel A), anti-Flag (panel B) and anti-FpvC (panel C) antibodies. The molecular mass markers (MM) are indicated on the left (kDa). The predicted size are for FpvG<sub>His6</sub> 46 kDa, FpvH<sub>Strep</sub> 21 kDa, FpvJ<sub>His6</sub> 15 kDa, FpvF<sub>Flag</sub> 33 kDa and FpvC<sub>HA</sub> 36 kDa. In red are the fractions of blots presented in Figure 6.





**Fig. S5. Pull-down assay of the FpvG-FpvJ-FpvC-FpvF complex in the presence of 10  $\mu$ M PVDI-Fe.** Periplasmic fractions of BL21(DE3) cells and membranes fractions of TOP10 cells producing the indicated proteins FpvJ<sub>His6</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, FpvF<sub>Flag</sub>, FpvG<sub>His6</sub>, and FpvH<sub>Strep</sub> were incubated with anti-Flag beads as in Figure 6 except that 10  $\mu$ M PVDI-Fe was added. The loading (L), unbound (U), and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed by immunodetection using anti-His<sub>6</sub>, anti-FpvC, and anti-Flag antibodies. The molecular mass markers (kDa) are indicated on the left. The predicted size are for FpvG<sub>His6</sub> 46 kDa, FpvH<sub>Strep</sub> 21 kDa, FpvJ<sub>His6</sub> 15 kDa, FpvF<sub>Flag</sub> 33 kDa and FpvC<sub>HA</sub> 36 kDa.



**Fig. S6:** (A) Negatives controls of the pull down assay presented in Fig. 6: periplasmic fractions of BL21(DE3) cells and membranes fractions of TOP10 cells producing the indicated proteins FpvF<sub>Flag</sub>, FpvC<sub>HA</sub>, FpvJ<sub>His6</sub> or FpvG<sub>His6</sub> were incubated with anti-Flag resin. The load (L), unbound (U) and immunoprecipitated (IP) fractions were separated by SDS-PAGE and analyzed in immunodetection by using anti-His<sub>6</sub>, anti-FpvC and anti-Flag antibodies. (B)

Originals gels presented in panel A and in the Fig S5. For both panels, the molecular mass markers (MM) are indicated on the left in kDa. The predicted size are for FpvG<sub>His6</sub> 46 kDa, FpvJ<sub>His6</sub> 15 kDa, FpvF<sub>Flag</sub> 33 kDa and FpvC<sub>HA</sub> 36 kDa.

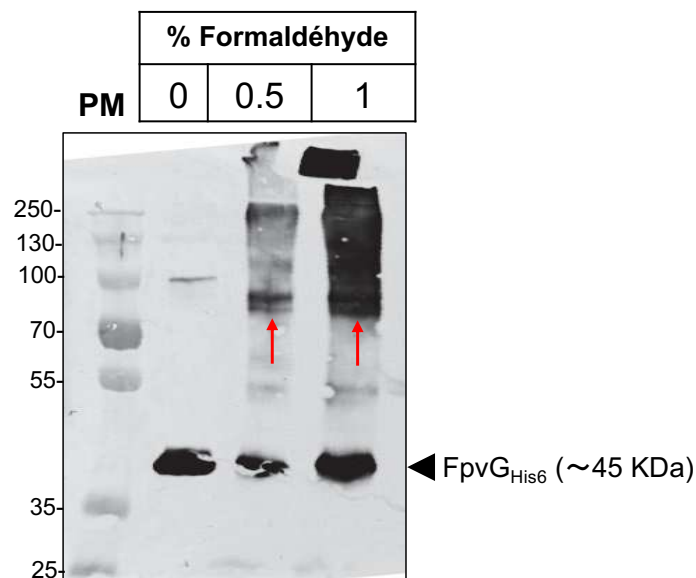
### References

1. Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* **187**, 2233–2243 (2005).
2. Ouellette, S. P., Gaudiard, E., Antosová, Z. & Ladant, D. A Gateway(®) -compatible bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system. *Environ Microbiol Rep* **6**, 259–267 (2014).
3. Vincent, F. *et al.* Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environ. Microbiol.* **12**, 1775–1786 (2010).
4. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121–4130 (1995).

### III) Résultats complémentaires (non publiés)

#### a. Multimérisation de FpvG

L'expérience en double hybride bactérien a montré que FpvG pouvait interagir avec elle-même. La multimérisation de FpvG a également été étudiée avec une expérience de cross-linking *in vivo* chez *E. coli*. Brièvement, la souche d'*E. coli* exprimant FpvG<sub>His6</sub> a été incubée avec un agent pontant, le formaldéhyde, à différentes concentrations. Ensuite, les membranes solubilisées dans du n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside (DDM) ont été récupérées et analysées par immunodétection. FpvG est une protéine dont la taille est estimée à 45 KDa. Une bande à environ 90 kDa a été observée en présence de formaldéhyde correspondant certainement à un dimère de FpvG<sub>His6</sub> (Figure n°37, flèche rouge). Le haut du gel est moins visible, notamment avec 1% de formaldéhyde, et laisse une sorte de « smear », ce qui pourrait suggérer que FpvG<sub>His6</sub> forme aussi des multimères.



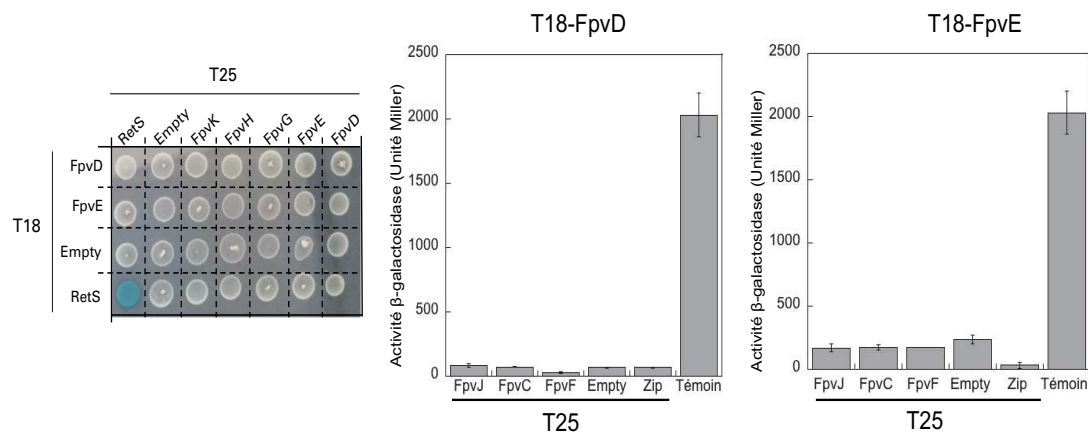
**Figure n°37: Cross-linking sur FpvG.** La souche TOP10 d'*E. coli* surexprimant FpvG<sub>His6</sub> a été incubée avec différentes concentrations en formaldéhyde (0%, 0.5% et 1% (v/v)) pendant une heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite isolées et solubilisées dans du DDM avant d'être analysées sur gel SDS-PAGE en Western blot. La flèche rouge correspond à la bande d'environ 90 KDa. La correspondance en poids moléculaire (PM) est en KDa à gauche de la photo de la membrane.

#### b. Interactions des protéines FpvD et FpvE.

Les interactions de FpvD et FpvE avec les protéines périplasmiques (FpvC, FpvJ et FpvF) et membranaires (FpvG, FpvH et FpvK) ont été testées en double hybride bactérien (Figure n°38). Étonnamment, aucune interaction n'a été détectée pour toutes les combinaisons

testées. FpvD et FpvE font partie du transporteur ABC couplé à FpvC et FpvF (Brillet *et al.*, 2012). Nous nous attendions au moins à observer une interaction entre la perméase FpvE avec elle-même et/ou avec l'ATPase FpvD. En effet, chacune de ces deux protéines forme certainement un dimère dans la membrane interne comme la majorité des perméases et ATPases de transporteurs ABC.

Nous avons également émis l'hypothèse que la perméase FpvE puisse interagir avec la protéine périplasmique FpvC. En effet, FpvC chélate le fer ferreux après dissociation du complexe PvdI-Fe et FpvDE serait le transporteur du fer ferreux à travers la membrane interne pour l'internalisation du nutriment dans le cytoplasme. Dans ce scénario FpvC amène le Fe<sup>2+</sup> directement à FpvE, avec probablement une interaction protéique avec la perméase. Malheureusement nous n'avons observé aucune interaction en double hybride entre FpvE et FpvC (**Figure n°38B**)



**Figure n°38 : Interactions des protéines FpvD et FpvE en double hybride bactérien. A. Double hybride bactérien avec les protéines de membrane interne FpvG, FpvK et FpvH.** Les cellules DHM1 produisant les protéines d'intérêts fusionnées aux domaines T18 et T25 ont été déposées sur milieu LB gélosé contenant du X-Gal. Pour contrôle, les protéines ont été testées contre les plasmides vides et une protéine non reliée à la voie PvdI (RetS). La couleur bleue signifie que les deux partenaires interagissent. L'expérience a été répétée 3 fois et nous avons choisi une image représentative. **B. Double hybride bactérien avec les protéines périplasmiques.** Les interactions entre les protéines d'intérêts ont été quantifiées en mesurant l'activité bêta-galactosidase. Le témoin correspond à l'interaction du domaine Zip avec lui-même portés respectivement sur le pKTM25-zip et pUTM18C-zip. Les barres d'erreur correspondent à la l'écart-type des moyennes (n=3).

#### IV) Conclusions et perspectives

La première partie de cette thèse a permis de mettre en évidence les interactions entre les protéines membranaires, FpvG et FpvH et périplasmiques FpvC, FpvF et FpvJ et de suggérer la présence d'un complexe constitué de ces 5 protéines. Ce complexe doit jouer un rôle dans la dissociation du complexe PvdI-Fe. À ce jour, aucun complexe de ce type n'a été décrit comme étant impliqué dans une voie d'import du fer chez les bactéries. Nous avons également pu mettre en évidence que FpvF interagissait avec la protéine PvdT, appartenant à la pompe d'efflux PvdRTOpmQ. Ce résultat montre qu'après dissociation de PvdI-Fe, FpvF

apporte à la pompe d'efflux l'apo-PvdI à recycler en interagissant directement avec la protéine périplasmique PvdT. FpvF participe donc au recyclage de la PvdI. Cependant, le mécanisme permettant le transfert de l'apo-PvdI de FpvF à PvdT reste à déterminer.

Dans cette étude, nous avons opté pour une reconstitution de ces interactions protéiques chez *E. coli*. En effet, en l'absence d'anticorps anti-FpvG, anti-FpvH ou encore anti-FpvJ, nous n'avons pas pu vérifier directement ces interactions chez *P. aeruginosa* avec des expériences de cross-linking, comme cela avait été réalisé avec FpvC et FpvF à l'aide d'anticorps anti-FpvF et anti-FpvC (Brillet *et al.*, 2012). Comme alternative, nous aurions aimé utiliser une souche de *P. aeruginosa* exprimant FpvG marquée par la protéine fluorescente eGFP que nous avons au laboratoire (PAO1-FpvG-eGFP) et insérer un tag mCherry en N ou C-terminal de FpvH, FpvJ, FpvC ou FpvF. En combinant des approches de cross-linking *in vivo* ainsi que de microscopie de fluorescence à haute résolution et de FRET (transfert d'énergie entre molécules fluorescentes), les interactions pourraient être confirmées deux à deux, *in vivo*. La présence des tags nous permettrait également de visualiser la dynamique des protéines et des interactions au sein de la cellule en *single- molecule tracking*. Cette technique a déjà permis l'étude de la répartition spatiale de l'enzyme PvdA dans les cellules de *P. aeruginosa* (Gasser *et al.*, 2020) en collaboration avec Julien Godet (laboratoire de Bioimagerie et Pathologie, Illkirch). Durant cette thèse, nous avons tenté la construction de ces souches fluorescentes mais sans succès pour certaines.

L'approche de double hybride bactérien ne nous a pas permis de déterminer les potentielles interactions de FpvK, FpvD ou FpvE avec d'autres protéines. Le double hybride bactérien possède en effet plusieurs désavantages qui peuvent expliquer ces résultats (Battesti & Bouveret, 2012). La fusion des domaines T18 ou T25 pourrait déstabiliser la structure de la protéine, la rendre instable, ou même empêcher les interactions des deux partenaires. Le fait d'utiliser différents plasmides permettant de fusionner le T18 et le T25 soit en C-terminal ou en N-terminal permet d'optimiser les chances de détecter les interactions, mais n'évite pas le problème. De plus, il n'y a aucun moyen de vérifier la bonne production de la protéine. Enfin, nous pouvons supposer que certaines interactions ne se font qu'en présence d'un troisième partenaire, que ce soit une protéine ou la présence de molécules ou d'ion tel que le  $Fe^{2+}$ . L'absence d'interaction détectée pour les protéines FpvK, FpvE et FpvD avec n'importe quelle autre protéine ne permet donc pas de conclure à l'absence d'interactions. Il faudrait envisager d'autres approches pour étudier ces interactions.

En effet, il serait tout de même intéressant de se pencher sur les interactions de FpvD et FpvE car elles constitueraient la dernière porte d'entrée du  $\text{Fe}^{2+}$  jusqu'au cytoplasme. D'abord, il faudrait construire un mutant  $\Delta fpvD\Delta fpvE$  et vérifier que le fer reste bloqué dans le périplasme. Cela permettrait de valider le rôle exact de FpvD et FpvE. Au laboratoire, des expériences combinant du transport de  $^{55}\text{Fe}$  et du fractionnement cellulaire pourraient être réalisées. D'autres expériences d'interactions protéine-protéine pourront ensuite être envisagées.

Le double hybride bactérien ne permet pas non plus de déterminer l'état oligomérique des interactions. Ainsi, déterminer la stoechiométrie du complexe FpvG-FpvH-FpvC-FpvF-FpvJ reste une perspective importante. Nous avons essayé, en vain, de purifier les 5 protéines FpvGHJFC sous forme d'un complexe, en incubant des membranes d'*E. coli* surexprimant FpvG et FpvH avec la fraction périplasmique de cellules d'*E. coli* surexprimant FpvC, FpvF et FpvJ. Purifier ce complexe reste un challenge étant donné la présence de protéines membranaires et l'utilisation de détergent pour les extractions des membranes. Cependant, il s'agit d'une étape importante pour mieux comprendre le mécanisme d'action et la physiologie du complexe.

**Chapitre VII :**  
**Étude du mécanisme de  
dissociation du complexe PvdI-Fe**

## I) Introduction

Beaucoup de questions restent en suspens concernant le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI et ce, malgré l'identification des différents partenaires protéiques y participant et leurs interactions. L'équipe a montré qu'une réduction du fer est nécessaire (Greenwald *et al.*, 2007) et qu'elle impliquait la protéine de membrane interne FpvG. L'exact mécanisme biochimique et chimique de cette réduction du fer par FpvG n'est pas connu ainsi que les potentiels cofacteurs permettant le transfert d'électrons nécessaires à la réaction. Il a été montré dans une expérience de dissociation de PvdI-Fe *in vitro* que FpvG pouvait activer cette dissociation en ayant une activité réductase (Ganne *et al.*, 2017). En effet, le complexe PvdI-Fe se dissocie efficacement en présence du réducteur 1,4-Dithiothreitol (DTT) et de ferrozine (chélateur du fer ferreux). Une dissociation équivalente a été observée avec FpvG permettant de supposer une activité réductase de cette protéine. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au mécanisme de réduction du fer par la réductase FpvG et son partenaire FpvH.

## II) Résultats

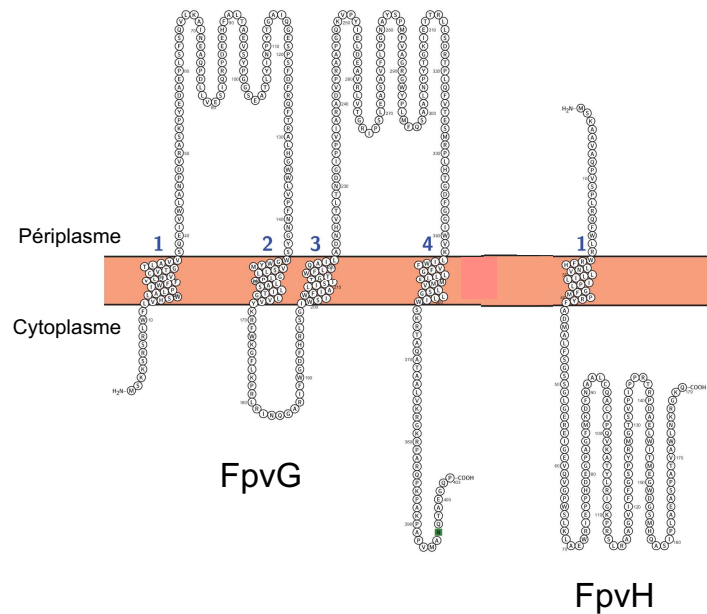
### a. Étude structurale par microscopie électronique du complexe FpvG-FpvH

Dans un premier temps, nous avons initié des études structurales du complexe FpvG-FpvH. Les études structurales concernant les protéines membranaires ont toujours été un challenge pour différentes raisons. La première difficulté est de réussir à surexprimer les protéines membranaires qui sont naturellement peu produites dans les cellules. Cette surexpression peut d'ailleurs entraîner des problèmes de toxicité pour les cellules, de repliement et de stabilité des protéines. La seconde difficulté réside en l'extraction à l'aide de détergents des protéines des membranes. La présence de détergents limite fortement les chances d'obtenir des données structurales de protéines membranaires en cristallographie à rayons X ou encore en spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) (Seddon *et al.*, 2004). Ces dernières années, les études structurales utilisant la microscopie électronique se sont de plus en plus développées. Pour cause, la présence de détergent n'est plus un facteur limitant et une petite quantité (de l'ordre du  $\mu\text{g}$ ) de protéines est requise. L'utilisation de la microscopie électronique est devenue une alternative réelle même s'il est rare que la résolution soit supérieure à 2 Å à cause des dommages causés par les radiations sur l'échantillon (Rawson *et al.*, 2016; Seddon *et al.*, 2004).

FpvG est une protéine de membrane interne et d'après les prédictions de structures secondaires, elle posséderait 4 domaines transmembranaires (TM) organisés en hélice alpha (TM1 résidues 12-36, TM2 résidues 146-167, TM3 résidues 187-217 et TM4 résidues 336-



363) et deux domaines périplasmiques composés tous deux d'une hélice alpha et de 4 feuillets  $\beta$  (le premier domaine allant des résidus 37 à 145 et le second des résidus 218 à 335) (Ganne *et al.*, 2017) (**Figure n°39**). Notre approche de double hybride a montré que FpvG interagissait avec une autre protéine de membrane interne, FpvH (Bonneau *et al.*, 2020). La structure secondaire prédite pour FpvH suggère la présence d'un segment transmembranaire en hélice alpha (résidus 21-41) et un domaine cytoplasmique (résidus 42-179) (**Figure n°39**) (Ganne *et al.*, 2017).

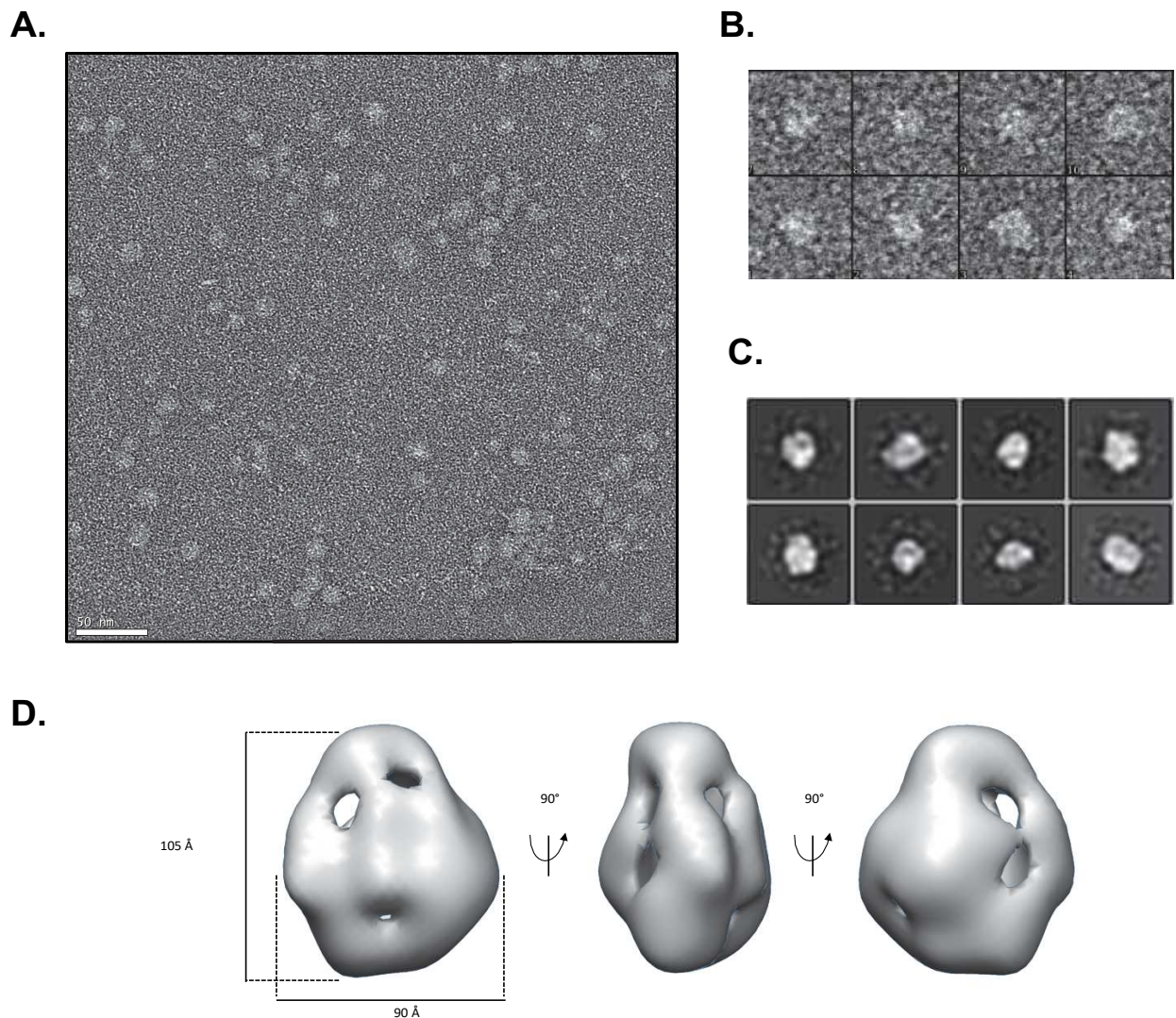


**Figure n°39** : Topologies des structures prédites pour FpvG et FpvH. D'après Protter-visualize proteoforms (Omasits *et al.*, 2014).

Notre premier objectif était de cristalliser et de résoudre la structure de FpvG seule. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir cette protéine avec un degré de pureté suffisant pour permettre de lancer des essais de cristallisations. En revanche, il est apparu plus simple de purifier le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> et de l'obtenir avec un degré de pureté et des quantités permettant des études structurales par microscopie électronique à coloration négative (EM). Ces manipulations furent réalisées en collaboration avec la plateforme de biologie et génomique structurale de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGMBC à Illkirch).

Pour cette étude structurale, le complexe a été surexprimé dans des cellules d'*E. coli* TOP10 et extrait des membranes bactériennes grâce au détergent N-dodécyle- $\beta$ -maltoside (DDM). Après purification du complexe sur colonne d'affinité StrepTrap puis sur Gel Filtration (Bonneau *et al.*, 2020), 15 ng de protéines sont repris dans du tampon contenant du DDM puis

ont été déposés sur des grilles de microscopie électronique. L'échantillon a été coloré à l'acétate d'uranyle et des milliers d'images ont été acquises (**Figure n°40A**). L'ensemble des données EM a été collecté, et la classe bidimensionnelle a révélé des vues caractéristiques du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> (**Figure n°40A, B, C**). L'ensemble des données a été utilisé pour reconstruire un modèle tridimensionnel à 21 Å de résolution (**Figure n°40D**). Le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> a une hauteur de ~105 Å et un diamètre de ~90 Å. À ce stade de résolution, il est impossible de savoir quelle partie de cette structure correspond à FpvG<sub>His6</sub> et laquelle à FpvH<sub>Strep</sub>.



**Figure n°40 : Caractérisation structurale du complexe membranaire FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> par microscopie électronique à coloration négative. A. Micrographe représentatif des particules du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. Échelle, 50 nm. B. Différentes vues du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. C. Moyenne des classes 2D. D. Reconstruction 3D à 21-Å du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>, sans contrainte de symétrie.**

## **b. Implication du complexe FpvG-FpvH dans la dissociation du fer de la PvdI**

Pour mieux caractériser les fonctions de FpvG et FpvH au sein du complexe FpvG-FpvH, nous avons testé sa capacité à dissocier le fer de la PvdI *in vitro* (Ganne *et al.*, 2017). Comme mentionné précédemment, l'apo PvdI est fluorescente à 447 nm et son apparition peut être suivie lors de la dissociation du fer de la PvdI *in vitro* en fonction du temps.

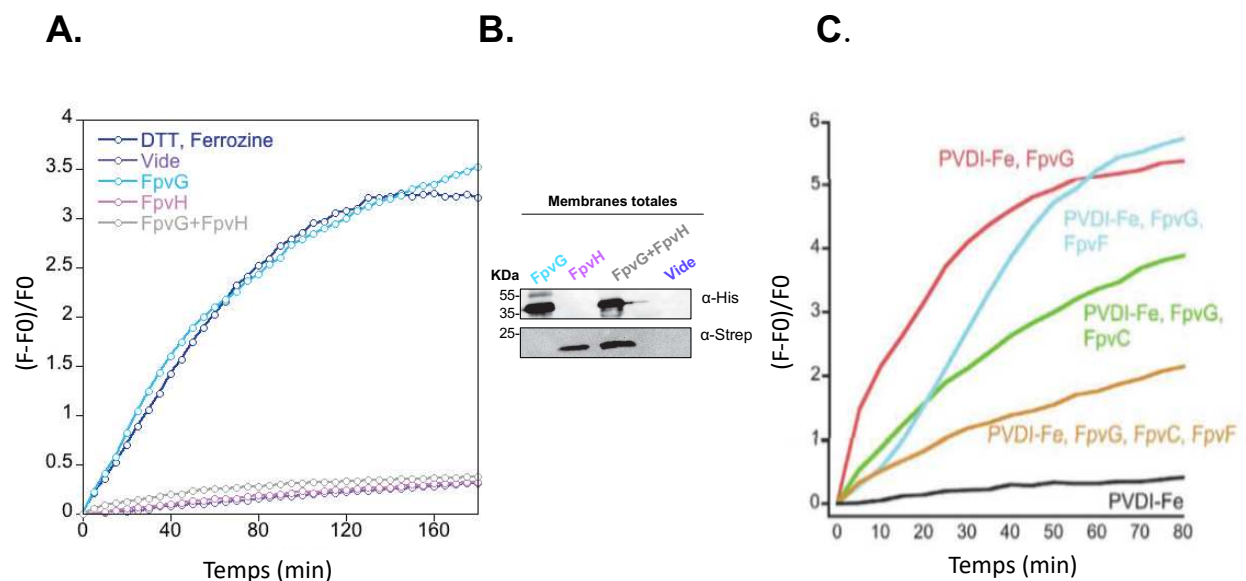
Le complexe PvdI-Fe a d'abord été incubé en présence du réducteur 1,4-Dithiothreitol (DTT) et de la ferrozine (chélateur spécifique du fer ferreux). Une augmentation de la fluorescence liée à l'apparition d'apo PvdI a été observée ce qui indique une dissociation du complexe PvdI-Fe (**Figure n°41A**). Comme nous n'avons pas réussi à purifier les protéines FpvG et FpvH séparément, nous avons utilisé dans nos essais des préparations de membranes de bactéries exprimant ces protéines. Ces membranes ont été obtenues par fractionnement cellulaire de cellules d'*E. coli* exprimant soit FpvG<sub>His6</sub>, soit FpvH<sub>Strep</sub> ou le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. Le fractionnement cellulaire consiste à lyser les cellules et à séparer les protéines solubles des protéines membranaires par ultracentrifugation pour récupérer la fraction des membranes totales. Nous avons vérifié et confirmé la présence dans les membranes des protéines d'intérêts afin de s'assurer de leur expression (**Figure n°41B**).

Les fractions membranaires des souches d'*E. coli* exprimant les protéines FpvG<sub>His6</sub>, FpvH<sub>Strep</sub>, le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> ou contenant un plasmide vide ont été incubées avec le complexe PvdI-Fe et la fluorescence à 447 nm a été mesurée en fonction du temps (**Figure n°41A**).

Nous avons observé une augmentation de la fluorescence équivalente à celle de la condition avec DTT et ferrozine lorsque les membranes contenant FpvG<sub>His6</sub> ont été incubées avec PvdI-Fe. Cette observation signifie que FpvG<sub>His6</sub> est capable de dissocier le complexe PvdI-Fe et confirme les résultats déjà obtenus précédemment (Ganne *et al.*, 2017).

Aucune dissociation n'a été observée avec les membranes portant le plasmide vide, ce qui confirme que les protéines membranaires d'*E. coli* ne dissocient pas le complexe PvdI-Fe. FpvH<sub>Strep</sub> seule ne semble pas dissocier le complexe car aucune dissociation n'a été obtenue avec les membranes contenant uniquement FpvH<sub>Strep</sub>. De manière surprenante, nous n'avons pas observé d'augmentation de fluorescence en présence des membranes contenant le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. FpvH<sub>Strep</sub> semble dans cette expérience neutraliser d'une certaine façon l'activité de FpvG<sub>His6</sub>. Une perte partielle d'activité avait déjà été observée par K. Brillet au laboratoire en effectuant cette même expérience en présence de FpvG<sub>His6</sub> et de FpvC purifiée ou en présence de FpvG<sub>His6</sub> et des protéines FpvC et FpvF purifiées (Ganne *et al.*, 2017) (**Figure n°41C**). Il semblerait que la protéine FpvG<sub>His6</sub> soit très active seule pour dissocier le complexe PvdI-Fe, mais que lorsque l'un de ses partenaire protéique FpvH, FpvC ou FpvF est présent, son activité est partiellement ou totalement inhibée. Il est peut-être

nécessaire d'avoir le complexe protéique dans son ensemble pour que FpvG<sub>His6</sub> garde toute son activité. Durant cette thèse, nous n'avons malheureusement pas pu tester l'activité de FpvG en présence de FpvH, FpvC et FpvF ou au sein du complexe FpvGHJCF. La présence des tags, plus particulièrement celui sur FpvH<sub>Strep</sub>, peut aussi affecter l'activité du complexe. La question du devenir du fer ferreux dans cette réaction peut être soulevée. En effet, FpvG<sub>His6</sub> seule arrive à dissocier PvdI-Fe aussi efficacement que le mélange DTT et ferrozine. Cela suggère qu'il y a peut-être un site de liaison du fer ferreux sur FpvG<sub>His6</sub> pour éviter la réversibilité de la réaction. K. Brillet a montré au laboratoire que l'addition de FpvC inhibe partiellement FpvG<sub>His6</sub> (Ganne *et al.*, 2017) (**Figure n°41C**). Ce résultat suggère que FpvC ne peut pas récupérer le fer libéré par la PvdI après réduction du fer. Il aurait été intéressant de suivre également la dissociation du complexe PvdI-Fe en présence de FpvG<sub>His6</sub> et ferrozine pour vérifier si le fer ferreux reste associé à FpvG<sub>His6</sub> ou s'il peut être capté par la ferrozine. Ces résultats indiquent également que FpvG<sub>His6</sub> seule est capable de dissocier le complexe PvdI-Fe mais que les autres partenaires FpvH et FpvJ n'interviennent pas directement dans la réaction enzymatique. Ces protéines auraient plus un rôle dans le transfert du fer ferreux sur FpvC et de l'apo PvdI sur FpvF en maintenant le complexe FpvGHJFC ensemble.



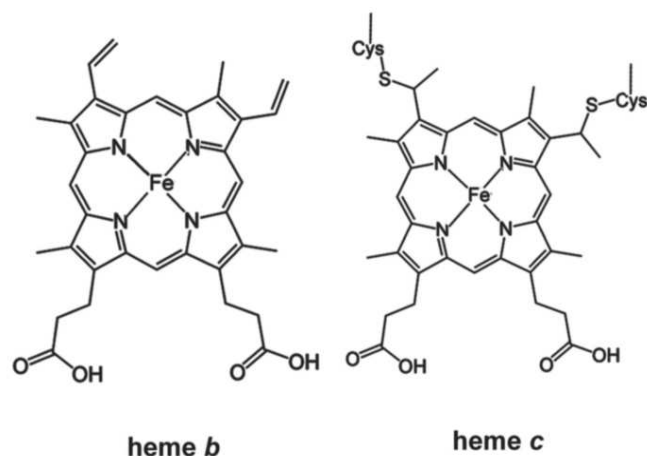
**Figure n°41 : Dissociation *in vitro* du complexe PvdI-Fe. A. Suivi de la dissociation du complexe PvdI-Fe *in vitro*.** 20  $\mu$ M du complexe PvdI-Fe ont été incubés dans 100 mM de tampon d'acétate d'ammonium, pH 6.5, en présence soit de 100  $\mu$ g de membranes de cellules d'*E. coli* surexprimant FpvG<sub>His6</sub>, FpvH<sub>Strep</sub> ou FpvG<sub>His6</sub> et FpvH<sub>Strep</sub> ou portant le plasmide vide, ou de 100 mM de DTT et 200  $\mu$ M de ferrozine. La fluorescence a été suivie à 447 nm (excitation à 400 nm) pendant 3 h. F<sub>0</sub> représente la fluorescence au t=0 min et F représente la fluorescence au temps t (min). L'expérience a été répétée 3 fois et des résultats équivalents ont été obtenus. **B. Western blot des préparations de membranes de bactéries exprimant FpvG<sub>His6</sub>, FpvH<sub>Strep</sub> ou le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>.** La présence des protéines dans les extraits membranaires a été révélée à l'aide d'anticorps primaires de lapin anti-His<sub>6</sub> et de souris anti-Strep suivie d'une incubation avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase de raifort. Les bandes sont ensuite révélées avec le kit Pierce ECL chimiluminescence de ThermoFisher Scientific. **C. Figure de suivi de la dissociation du complexe PvdI-Fe *in vitro* provenant de l'article (Ganne *et al.*, 2017).** 10  $\mu$ g de membranes totales contenant

FpvG<sub>His6</sub> sont incubés en présence de 20 µM de PvdI-Fe et 10 µM de protéines purifiées FpvC (courbe verte), FpvF (courbe bleue), ou avec FpvF et FpvC (courbe orange) ou sans protéines purifiées (courbe rouge). La fluorescence a été suivie à 447 nm (excitation à 400 nm) pendant 3 h. F0 représente la fluorescence au t=0 min et F représente la fluorescence au temps t (min). Figure directement copiée de l'article Ganne *et al.*, 2017.

### c. De l'hème est associé au complexe FpvG-FpvH

Le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> purifié ayant une pigmentation de couleur rose, nous avons émis l'hypothèse qu'une molécule d'hème pouvait être associée à au moins une des protéines de ce complexe (**Figure n°43**). De plus, notre équipe a montré que FpvG présentait des similarités de séquence avec une ascorbate ferri-reductase appartenant à la famille des cytochromes b561 chez *Arabidopsis thaliana* (Ganne *et al.*, 2017). Cette famille est composée de protéines coordonnant deux molécules d'hèmes par 4 résidus d'histidine hautement conservés. Elles utilisent soit du NAD(P)H soit de l'ascorbate comme donneur d'électrons afin de permettre la réduction du fer ferrique en fer ferreux (Su & Asard, 2006). L'hème est un groupement prosthétique majeur retrouvé dans des hémoprotéines aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Ses fonctions peuvent être très diverses : transport de l'oxygène, activité catalytique, transport d'électrons, régulation, etc. La capacité de l'hème à interagir avec différentes protéines provient de la versatilité de sa structure : l'hème comprend un anneau porphyrine avec en son centre un ion fer (sous forme Fe<sup>2+</sup> la plupart du temps). Il existe plusieurs molécules d'hème dont l'hème *b* et *c* qui sont les formes les plus abondantes (**Figure n°42**) (Li *et al.*, 2011). L'hème *b* est attaché à la protéine de manière non covalente tandis que l'hème *c* forme des liaisons covalentes entre les groupements vinyle de l'hème et deux résidus cystéines de la protéine. Ainsi, le motif CxxCH (x étant n'importe quel autre acide aminé) est retrouvé chez les protéines portant un hème *c* (Bowman & Bren, 2008).

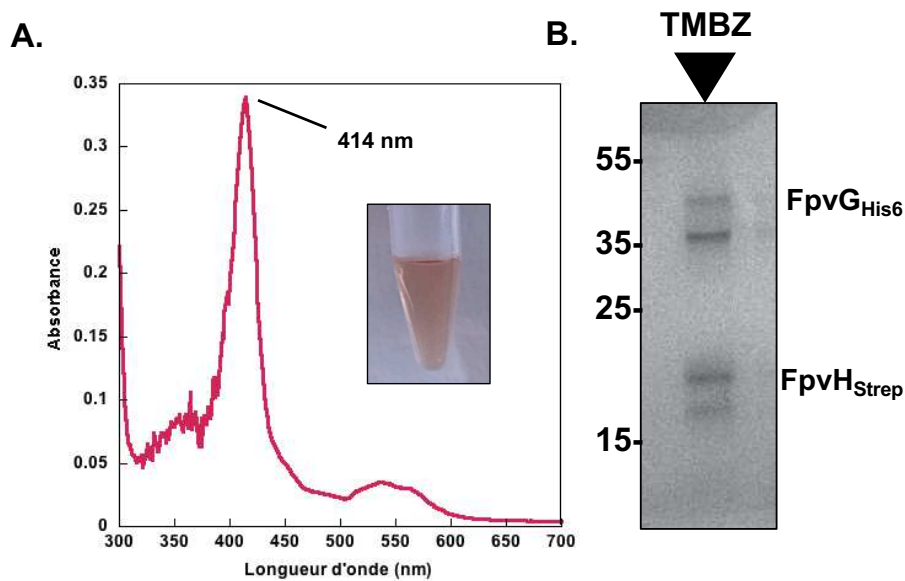
Les principaux résidus impliqués dans la coordination de l'hème sont : la cystéine, l'histidine et la tyrosine. La méthionine et la lysine sont également retrouvées mais moins fréquemment. Différents autres types d'interactions vont contribuer à la fixation de l'hème et son affinité pour les protéines. On retrouve ainsi des liaisons hydrophobes et des liaisons π provenant de l'anneau porphyrine ainsi que des interactions électrostatiques et des ponts hydrogènes provenant de la chaîne propionate. Les acides aminés environnants ceux directement impliqués dans la coordination vont aussi être importants pour l'interaction de l'hème sur une protéine spécifique (Li *et al.*, 2011; Wißbrock *et al.*, 2019).



**Figure n°42 : Structure de l'hème b et de l'hème c.** D'après (Li *et al.*, 2011).

Le spectre d'absorption des protéines FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> montre un maximum d'absorbance à 414 nm ainsi qu'un second pic d'absorbance à 550nm (**Figure n°43A**). Le pic à 414 nm est caractéristique de la bande de Soret, spécifique aux porphyrines et donc aux hémoprotéines et indique la présence d'hème dans l'échantillon (Soret, 1883). Il aurait été intéressant de réduire le complexe, avec du sodium dithionite par exemple. Cette expérience permet de visualiser le spectre d'absorption des hémoprotéines réduites. Classiquement, deux pics aux alentours de 520 nm et 550 nm, communément appelées les bandes alpha et beta, sont visibles sous la forme réduite. Sous forme oxydée, comme dans nos conditions, ces deux bandes caractéristiques aux cytochromes ne sont pas très visibles (Koch & Schneider, 2007).

Lorsque l'hème est associé de manière covalente aux protéines, il reste attaché à la protéine lors de la migration sur gel de polyacrylamide contenant du SDS. Le complexe protéine-hème peut alors être détecté grâce à l'activité peroxydase de l'hème en utilisant le 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMBZ) comme oxydant (Goodhew *et al.*, 1986). Cela permet en règle générale de détecter des protéines contenant de l'hème c qui est lié de manière covalente. Dans une moindre mesure, une petite quantité d'hème b peut rester fixée aux protéines et ainsi être révélée par cette méthode (Goodhew *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1976). Nous avons réalisé un test au TMBZ sur le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> (**Figure n°43B**). Le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> a été déposé sur gel de polyacrylamide contenant du SDS et après migration, le gel a été incubé en présence de TMBZ-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une activité peroxydase a été détectée pour les bandes correspondant à FpvG<sub>His6</sub> et à FpvH<sub>Strep</sub>, indiquant que les deux protéines lient de l'hème. Cependant, aucun motif CxxCH n'a été retrouvé dans la séquence de FpvG. L'activité peroxydase détectée pour les bandes correspondantes à FpvG<sub>His6</sub> et à FpvH<sub>Strep</sub>, est probablement liée à de petites quantités d'hème b restées liées aux protéines FpvG<sub>His6</sub> et FpvH<sub>Strep</sub>.



**Figure n°43 : A. Spectre d'absorption du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>.** La photo dans l'encadré du graphique correspond à la fraction récupérée après purification sur colonne StrepTrap. **B. Test TMBZ sur le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>.** La fraction correspondante au complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> est déposée sur gel de polyacrylamide 12 % en présence de SDS. Après migration des protéines, le gel est incubé avec 0.25 M d'acétate de sodium pH 5.0 pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante. Le mélange est ensuite incubé avec une solution TMBZ/Méthanol pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. 0,3 % v/v d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont ensuite ajoutés au mélange. Le poids moléculaire (KDa) est inscrit à gauche de la photo.

#### **d. Implication de 4 résidus d'histidine conservés de FpvG dans la dissociation de fer de la PvdI**

##### **1. Parallèle avec d'autres voies d'import du fer par des sidérophores**

A ce jour, aucune réductase impliquée dans la dissociation d'un complexe sidérophore-fer autre que le complexe PvdI-Fe n'a été identifiée chez *P. aeruginosa*. Quelques gènes candidats ont été proposés du fait de leur localisation à proximité des autres gènes impliqués dans les voies d'import correspondantes : *foxB*, *ampO*, *piuB* et PA1909. Les analyses de domaine *in silico* ont indiqué des fonctions de type « oxydo-réduction ». Le gène *foxB* code pour une probable protéine de membrane interne impliquée dans la voie d'import du fer par la nocardamine/ferrioxamine B et dont la fonction était pour l'instant attribuée à l'import du complexe ferrisidérophore au travers de la membrane interne. Le gène *ampO* est situé à côté de *fptX* et *fptA*, transporteurs de la membrane interne et externe de la voie pyochéline. Le gène *piuB* est localisé à côté de *piuA*, un gène codant pour un TBDT dont le sidérophore transporté n'est pas connu mais qui peut intervenir dans l'import des complexes entérobactine-fer. Enfin, PA1909 serait impliqué dans la voie d'import du fer par la mycobactine.

La topologie probable des protéines codées par ces différents gènes a été prédite en utilisant une combinaison des logiciels de prédictions de segments transmembranaires et de topologie (TMpred, Phyre2, XtalPredRef, CCTOP). Selon les prédictions obtenues, les deux protéines PA1909 et FoxB auraient une topologie tout à fait similaire à celle de FpvG, avec 4 segments transmembranaires (TM) en hélice alpha et deux boucles périplasmiques. De plus, les longueurs de ces segments TM et des boucles sont équivalentes à celles de FpvG. La protéine AmpO posséderait 7 segments TM tandis que la protéine PiuB en posséderait 5 avec deux larges boucles cytoplasmiques et la partie C-terminale de la protéine dans le cytoplasme (Figure n°44A).

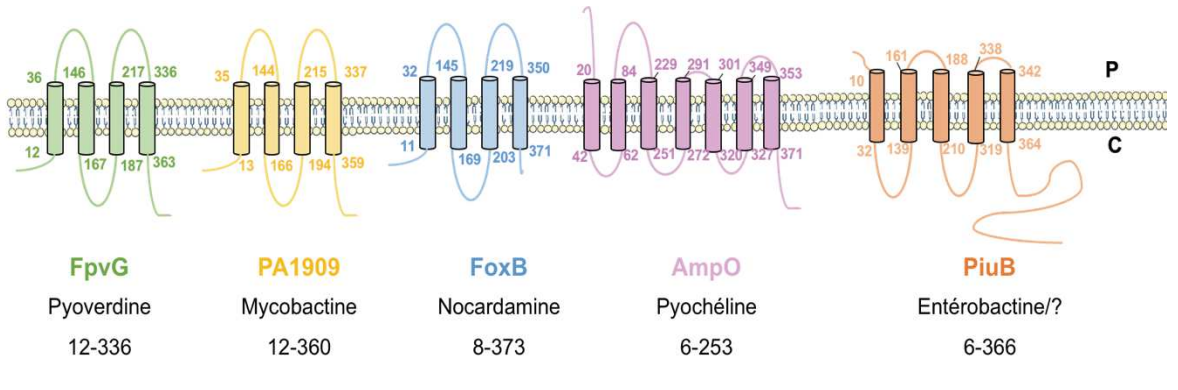
Toutes ces protéines possèdent un *PepSY associated TM domain* (Figure n°44A). Les domaines PepSY sont généralement des domaines retrouvés chez la famille M4 des metallopeptidases. Ils jouent un rôle dans le contrôle des pro-peptides et de la régulation de l'activité peptidase (Yeats *et al.*, 2004). Les protéines annotées avec une région *PepSY associated TM* ont en général plusieurs segments transmembranaires en hélice alpha mais n'ont pas forcément d'activité peptidases.

Les séquences de FpvG, FoxB, AmpO, PA1909 et PiuB ont été soumises à un alignement multiple (Figure n°44B). Ces protéines possèdent des séquences relativement différentes à l'exception de certains acides aminés conservés, notamment 4 résidus d'histidine (His) retrouvés chez FpvG, PA1909, FoxB et PiuB. Seule la protéine AmpO ne possède que 3 de ces His. Les régions entourant ces résidus sont par ailleurs des régions où l'on retrouve des acides aminés conservés pour leurs propriétés biochimiques.

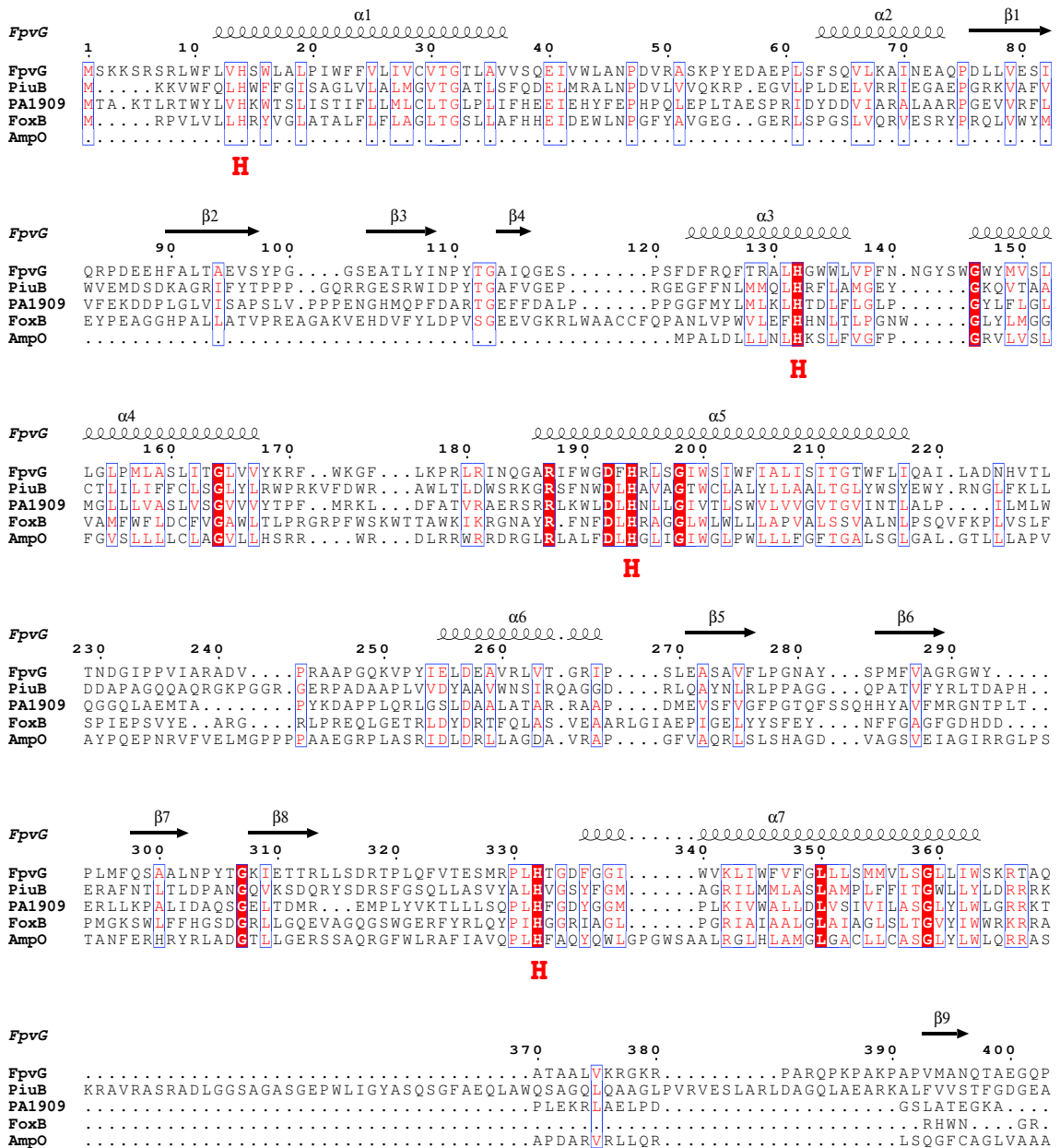
En conclusion, ces analyses montrent que ces 5 protéines possèdent des résidus His conservés. Les molécules d'hèmes pouvant être fixées sur les protéines par des résidus His, on peut supposer que FpvG, PA1909, FoxB, AmpO et PiuB sont aussi capables de lier de l'hème par ces acides aminés. De plus, FoxB et PA1909 ont des structures secondaires prédites très similaires à FpvG. Elles pourraient donc avoir une fonction biologique similaire, l'une étant impliquée dans l'import du fer par la nocardamine et la ferrioxamine B et la seconde par la mycobactine. Il est intéressant de noter également que ni *foxB* ni *PA1909* ne sont localisés à côté de gènes codant pour des protéines ayant des homologies de séquences avec FpvH, FpvJ et FpvK. Ces trois protéines ne semblent donc pas nécessaires à l'activité de la réductase FpvG, mais pourrait intervenir plutôt dans le transfert de fer de la PvdI sur FpvC et de l'apo-PvdI sur FpvF.



**A.**



**B.**



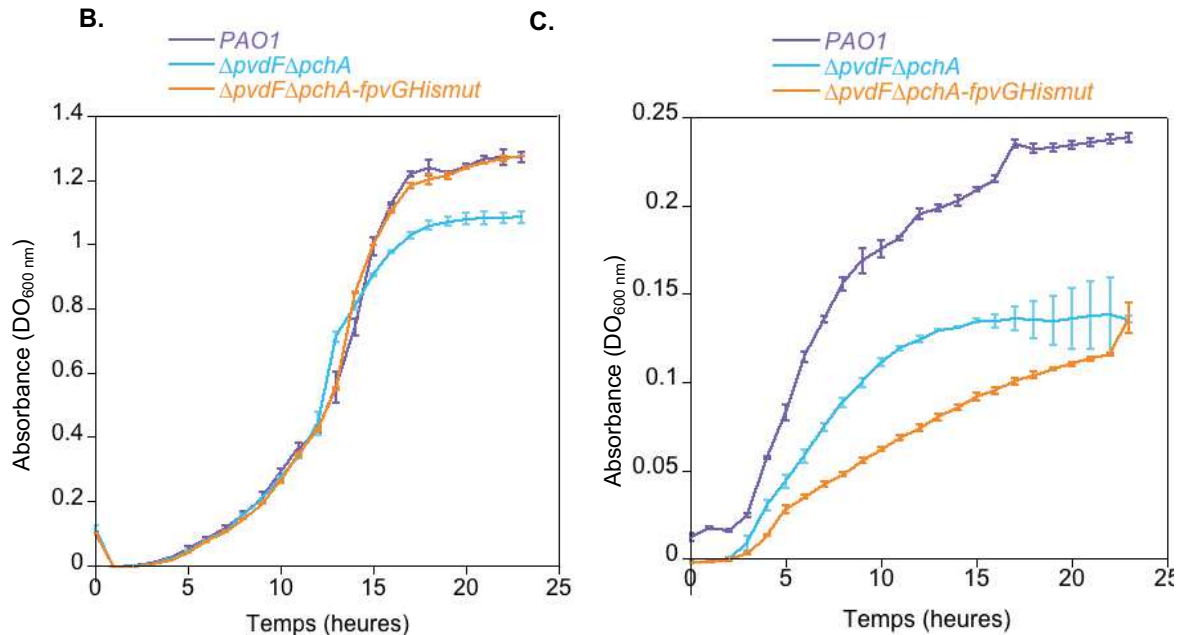
**Figure n°44 : Comparaison de la structure primaire et secondaire de FpvG avec de potentielles réductases impliquées dans des dissociations de fer d'autres sidérophores que la PvdI chez *P. aeruginosa*.** **A. Prédiction de topologie des protéines potentiellement liées à la réduction du fer de complexe sidérophore-fer.** Les résidues annotés concernent le début et la fin de chaque segment transmembranaire (à lire de gauche à droite), P : Périplasma, C : Cytoplasme. **B. Alignement de séquence de FpvG, PiuB, PA1909, FoxB et AmpO.** L'alignement a été réalisé via PROMALS3D (Pei *et al.*, 2008) et visualisé avec ESPript (Robert & Gouet, 2014). La structure secondaire prédite pour FpvG a été ajoutée au-dessus et les résidus His d'intérêts ont été ré-annotés avec un H rouge en dessous des séquences. Les acides aminés écrits en blanc sur fond rouge représentent des acides aminés conservés entre les 5 séquences testées, ceux écrits en rouge sur fond blanc représentent une conservation pour les propriétés biochimiques des acide-aminés (hydrophobe, polaire, etc.).

## 2. Implication des 4 résidus histidine.

L'alignement de séquence de FpvG avec les autres potentielles réductases a permis de révéler 4 résidus His conservés : His14, His132, His194 et His332. Afin de tester le rôle et l'importance de ces His dans l'activité de FpvG, nous avons construit une souche de *P. aeruginosa* mutée au niveau du chromosome dans la séquence de *fpvG*. Ces quatre résidus ont été remplacés par des résidus d'alanine dans la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  incapable de produire de la PvdI et de la Pch ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ -*fpvG*His<sub>mut</sub>) (Figure n°45A). En effet, nous effectuons nos tests de dissociation du complexe PvdI-Fe *in vivo* dans un mutant incapable de produire la PvdI et la Pch. De cette manière, nos expérimentations ne sont pas affectées par la fluorescence de la PvdI produite par la bactérie. La croissance du mutant  $\Delta pvdF\Delta pchA$ -*fpvG*His<sub>mut</sub> a été vérifiée en milieu LB (considéré comme riche en fer) et en milieu CAA (carencé en fer). En milieu riche en fer, la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$ -*fpvG*His<sub>mut</sub> exprimant FpvGHis<sub>mut</sub> a une vitesse de croissance équivalente à la souche sauvage et à la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  (Figure n°45B). En revanche en milieu CAA,  $\Delta pvdF\Delta pchA$  possède un retard de croissance comparé à la souche sauvage (PAO1) qui s'explique par l'incapacité de ce mutant à utiliser ses sidérophores PvdI et Pch pour acquérir le fer. De manière surprenante, la souche exprimant FpvGHis<sub>mut</sub> possède un retard de croissance supplémentaire comparé à la souche non productrice de PvdI et Pch. On s'attendait à une vitesse de croissance équivalente entre la souche incapable de produire le PvdI ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) et la souche incapable de produire la PvdI et d'exprimer l'enzyme FpvG sauvage ( $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fpvGHis<sub>mut</sub>). Vu qu'aucune des deux souches ne produit la PvdI, les mutations apportées dans *fpvG* n'auraient pas dû apporter de phénotype supplémentaire. Ce ralentissement de croissance supplémentaire pour le mutant *fpvG* laisse supposer que cette protéine peut avoir un rôle dans une autre fonction biologique autre que la dissociation de PvdI-Fe.$

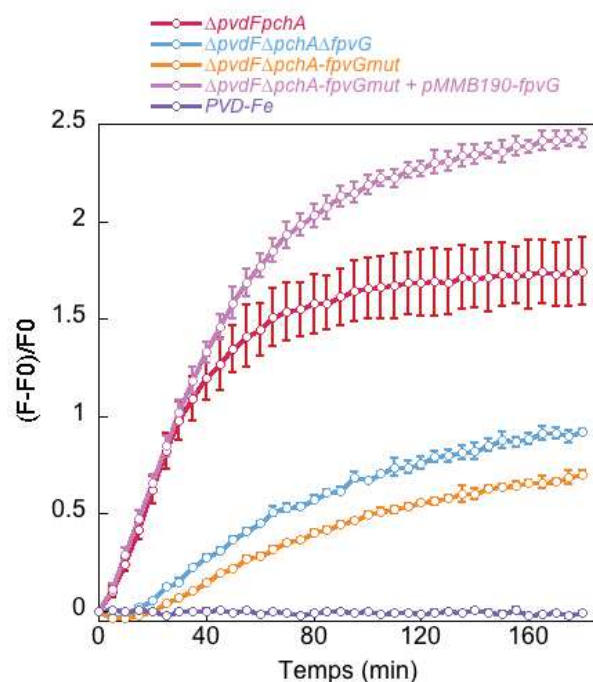
**A.** MSKKSRSRLWFLVH<sup>H</sup>SWLALPIWFFVLIVCVTGTLAVVSQEIWLANPDVRSKPYEDAEP<sup>L</sup>SFSQVLKAINAQPDL<sup>L</sup>VESIQRPD  
 EEHFALTAEVSYPGGSEATLYINPYTGAIQGESPSDFRQFTRALH<sup>H</sup>GWVLPFNNGYSWG<sup>W</sup>YMVSVLLGLPMLASLITGLV<sup>V</sup>YKR  
 FWKGLK<sup>P</sup>RRLRINQGARIFW<sup>G</sup>DFH<sup>H</sup>RLSGIWSIWFIALISITGTWFLIQAILADNHVTLTNDGIPPVIARADV<sup>P</sup>RAAPGQKV<sup>P</sup>YIELDE  
 AVRLVTGRIPSLEASAVFLPGNAYS<sup>P</sup>MFVAGRWYPLMFQSAALN<sup>P</sup>YTGKIET<sup>R</sup>RLSDRTPLQFVTESMR<sup>L</sup>HT<sup>H</sup>GD<sup>F</sup>GGI<sup>W</sup>VKLI  
 W<sup>F</sup>VFGLLS<sup>M</sup>MVLSGLLI<sup>W</sup>SKRTAQATAALV<sup>K</sup>RGRPAR<sup>Q</sup>PKPAK<sup>P</sup>APV<sup>M</sup>ANQTAEG<sup>Q</sup>P

*fpvGHismut* H14A – H132A – H194A – H332A



**Figure n°45 : A. Séquence primaire de FpvG.** En rouge, les 4 résidus His conservés ont été mutés en alanine. **B. Croissance des souches en milieu LB.** Les cellules ont été cultivées en milieu LB puis déposées en plaque 96 puits à DO à 600 nm de 0,01. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la DO à 600 nm en fonction du temps à 37°C dans un lecteur de microplaques TECAN. **C. Croissance des souches en milieu CAA.** Les cellules ont été carencées en milieu CAA puis déposées en plaque 96 puits à DO à 600 nm de 0,01. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la DO à 600 nm en fonction du temps à 37°C en lecteur microplaques TECAN. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des moyennes (n=3).

La dissociation du fer de la PvdI a été suivie *in vivo* dans les souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA-fpvGHismut$  et  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta fpvG$  (Figure n°46). Pour cela, les différents mutants de *P. aeruginosa* ont été cultivés en milieu CAA, puis incubés avec le complexe PvdI-Fe. La fluorescence a été mesurée pendant 3 heures à 447 nm (excitation à 400 nm). Une dissociation du fer de la PvdI a été observée pour la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  comme décrite précédemment (Ganne *et al.*, 2017). La mutation des 4 résidus histidine (souche  $\Delta pvdF\Delta pchA-fpvGHismut$ ) entraîne une inhibition de la dissociation du même ordre que celle observée par la délétion totale du gène *fpvG*. Lorsqu'on complémente la souche PAO1 $\Delta pvdF\Delta pchA-fpvGHismut$  avec un plasmide exprimant FpvG sous le contrôle de son propre promoteur (pMMB190-FpvG), le phénotype de dissociation est restauré et est encore plus fort qu'avec la souche témoin  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , probablement parce que FpvG est surexprimée dans cette condition.



**Figure n°46 : Dissociation *in vivo* du complexe PvdI-Fe.** Les différents mutants ont été cultivés en milieu carencé en fer, avant d'être repris dans du tampon 50 mM Tris, pH 8.0 à DO de 600 nm de 0,4. Les cellules sont déposées dans une plaque 96 puits et 120 nM de complexe PvdI-Fe sont ajoutés aux cellules. Le complexe PvdI-Fe est également incubé seul dans du tampon Tris. La fluorescence (Exc. 400 nm et Em. 447 nm) a été suivie dans un lecteur de microplaques TECAN pendant 3 h à 30°C. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des moyennes (n=3).

#### e. Fixation de l'hème sur FpvG, FpvH et FpvG<sub>mut</sub>

Afin de vérifier que FpvG, FpvG<sub>mut</sub> et le complexe FpvG-FpvH sont capables de lier l'hème, nous avons entrepris des expériences de co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à de l'hémine (hème de chlorure ferrique). Un plasmide exprimant FpvG avec les 4 résidus d'histidine conservés et remplacés par des résidus d'alanine a été construit avec un marquage 6xHistidines en C-terminal (pRSF-FpvG<sub>mutHis6</sub>) pour faciliter la détection en immunodétection. Nous avons isolé les membranes de cellules TOP10 d'*E. coli* exprimant FpvG<sub>His6</sub>, FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> ou FpvG<sub>mutHis6</sub>. Les protéines ont été solubilisées avec du DDM et incubées avec des billes d'agarose couplées à l'hémine. La même expérience a été réalisée avec des billes d'agarose sans hémine pour vérifier que les protéines ne se fixaient pas de manière aspécifique sur les billes. Cette expérience n'a pas pu être réalisée pour FpvH<sub>Strep</sub> car nous n'avons pas réussi à solubiliser la protéine seule.

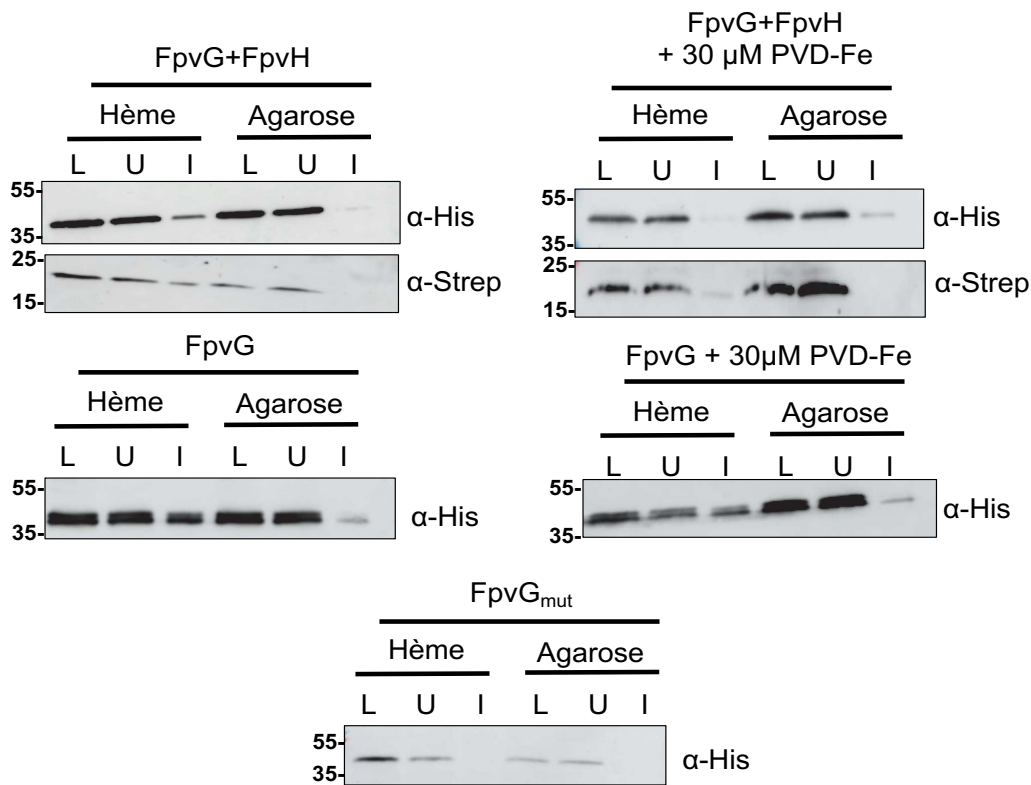
Après incubation des protéines solubilisées avec les billes, plusieurs lavages ont été réalisés, puis les billes ont été récupérées et analysées en immunodétection (**Figure n°47**). Lorsque FpvG<sub>His6</sub> est incubée seule avec les billes, avec ou sans le complexe PvdI-Fe, elle est dans

les deux conditions retenues sur les billes d'hèmes. Cela indique que FpvG<sub>His6</sub> peut lier de l'hème en présence ou en absence de PvdI-Fe. En revanche, aucune interaction n'est observée avec les billes d'agarose sans hème. Ce résultat démontre donc que l'interaction observée est spécifique et liée à une interaction avec l'hème. L'hème déjà présent sur FpvG peut être apparemment déplacé par l'hème lié aux billes d'agarose. Ceci conforte l'idée que l'hème associé à FpvG est labile et non lié de manière covalente.

La présence de FpvG<sub>mutHis6</sub> dans les membranes solubilisées nous a d'abord indiqué que FpvG<sub>mutHis6</sub> se localise dans les membranes. Cependant nous avons observé une faible expression de cette protéine avec beaucoup de produits de dégradation. L'expérience de co-immunoprécipitation avec les billes d'hèmes a montré que FpvG<sub>mutHis6</sub> n'est pas retenue sur les billes d'hèmes. Par conséquent, au moins un ou deux de ces résidus d'histidine est impliqué(s) dans l'interaction de FpvG<sub>His6</sub> avec les billes chargées en hème.

Le complexe FpvG<sub>His6</sub>FpvH<sub>Strep</sub> a été retenu sur les billes couplées à l'hème. Comme nous n'avons pas pu réaliser cette expérience avec FpvH<sub>Strep</sub> seule, nous ne pouvons pas conclure si l'interaction observée entre FpvH<sub>Strep</sub> et les billes est due à une capacité de cette protéine à lier de l'hème, ou si cette interaction avec les billes se fait via FpvG<sub>His6</sub>. Lorsque le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> a été pré-incubé en présence de PvdI-Fe, il n'est plus retenu sur les billes couplées à l'hème contrairement à la protéine FpvG<sub>His6</sub> seule. Cette observation suggère un changement de conformation de FpvG<sub>His6</sub> après fixation de PvdI-Fe au sein du complexe FpvG<sub>His6</sub>FpvH<sub>Strep</sub> rendant le site de liaison de l'hème inaccessible. Les deux protéines portant des étiquettes His<sub>6</sub> pour l'une et Strep pour la seconde, on ne peut pas exclure que ces groupements dans le complexe FpvG<sub>His6</sub>FpvH<sub>Strep</sub> affectent l'interaction avec l'hème des billes d'agarose en présence de PvdI-Fe.

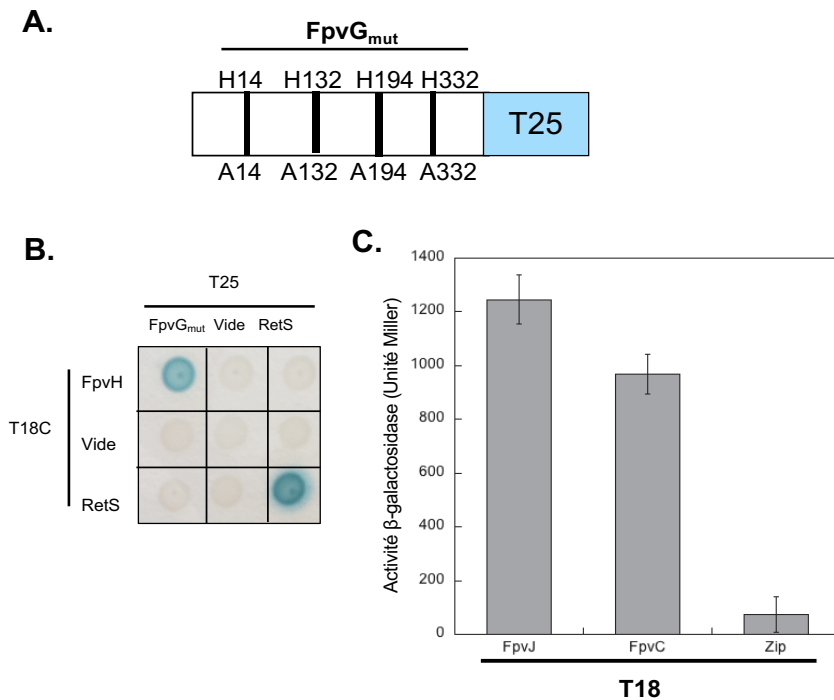
En conclusion, ces données montrent que FpvG<sub>His6</sub> peut lier de l'hème en présence et en absence de PvdI-Fe et que cette interaction se fait par au moins 2 des résidus d'histidine mutés. Cette interaction avec l'hème est possible avec le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> mais seulement en absence de PvdI-Fe.



**Figure n°47 : Pull down avec billes d'hèmes.** Les différentes membranes solubilisées dans du détergent (DDM) des cellules d'*E. coli* produisant FpvG<sub>His6</sub>, FpvG<sub>His6</sub>FpvH<sub>Strep</sub> ou FpvG<sub>mutHis6</sub> ont été incubées avec 20 µl de billes d'agarose couplées ou non à de l'hémimine, en présence ou en absence de 30 µM de complexe PvdI-Fe. Les fractions « Load » (L, correspondant aux membranes solubilisées), non liées (Unbound, U) et co-immunoprécipitées (I) ont été séparées sur gel de polyacrylamide et analysées en immunodétection. Le poids moléculaire en kDa est indiqué sur la gauche des photos.

#### f. Interaction du mutant FpvG<sub>mut</sub> avec FpvH, FpvC et FpvJ

Afin de regarder l'impact de la substitution des résidus His conservés en Ala chez FpvG sur les interactions précédemment décrites dans le **Chapitre VI**, la séquence FpvG<sub>mut</sub> a été clonée dans le vecteur de double hybride pKT25 afin d'obtenir le plasmide pKT25-FpvG<sub>mut</sub> (**Figure n°48A**). Les différentes interactions ont été testées en double hybride bactérien, sur milieu solide pour le test avec la protéine membranaire FpvH et en milieu liquide pour les protéines périplasmiques. Les données montrent que FpvG<sub>mut</sub> est toujours capable d'interagir avec FpvH (**Figure 48B**) ainsi qu'avec les protéines périplasmiques FpvC et FpvJ (**Figure 48C**). L'interaction de FpvG<sub>mut</sub> avec la protéine FpvF sera également à vérifier mais n'a pour le moment pas été testée. Néanmoins, ces premiers résultats avec FpvH, FpvJ et FpvC suggèrent que le mutant FpvG est toujours capable d'interagir avec ses partenaires malgré les mutations apportées.



**Figure n°48 : Interactions du mutant FpvG<sub>mut</sub>.** **A. Construction du plasmide pKT25-FpvG<sub>mut</sub>.** **B. Double hybride bactérien avec les protéines membranaires.** Les cellules de DHM1 produisant la protéine FpvG<sub>mut</sub> et FpvH fusionnées aux domaines T18 et T25 ont été déposées sur milieu LB gélosé contenant du X-Gal. Pour contrôle, les protéines ont été testées contre les plasmides vides et une protéine non reliée à la voie PvdI (RetS). La couleur bleue signifie que les deux partenaires interagissent. L'expérience a été répétée 3 fois et nous avons choisi une image représentative. **C. Double hybride avec les protéines périplasmiques.** Les interactions entre le mutant FpvG<sub>mut</sub> et les différentes protéines périplasmiques ont été quantifiées en mesurant l'activité bêta-galactosidase. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des moyennes (n=3).

### III) Discussion et perspectives

Si les résultats présentés dans ce chapitre semblent prometteurs, ils sont encore incomplets et des analyses plus poussées devront être mises en œuvre afin de valider les différents résultats obtenus.

Le premier modèle obtenu pour FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> est bien entendu d'une faible résolution et ne permet pas de résoudre la structure du complexe. Nous avons plutôt obtenu une sorte d'enveloppe représentative de sa surface. Cela reste un premier modèle encourageant pour la prochaine étape qui sera de faire de la cryo-EM afin d'augmenter la résolution. Dans le modèle obtenu, on ne peut pas discriminer FpvG<sub>His6</sub> de FpvH<sub>Strep</sub>. Il serait intéressant de purifier les deux protéines séparément pour pouvoir les superposer au modèle. Cependant, FpvG et FpvH sont des petites protéines (45 kDa et 19.9 kDa, respectivement) et elles ne pourraient pas être visualisées en EM séparément. Pour pallier cela, le complexe purifié pourrait être

incubé avec des anticorps anti-Strep (pour FpvH<sub>Strep</sub>) ou des billes de Nickel/Acide nitrilotriacétique (Ni-Nta) (pour FpvG<sub>His6</sub>) recouverts de particules d'or qui sont visibles sur les micrographes afin de pouvoir localiser FpvG<sub>His6</sub> ou FpvH<sub>Strep</sub> au sein du complexe. La position du complexe par rapport à la membrane n'est pas connue et la représentation du modèle 3D de nos résultats est totalement arbitraire. L'utilisation des anticorps anti-Strep et des billes de Ni-Nta permettraient de visualiser les positions des domaines C-terminaux (car les tags ont été clonés en C-terminal des protéines). En combinant les prédictions de topologie que nous avons des deux protéines et des données de l'EM, le complexe pourrait ainsi être mieux orienté.

Résoudre la structure du complexe permettrait de visualiser les potentiels sites de fixation de l'hème et l'importance de l'interaction de FpvH avec FpvG. En effet, des données structurales du complexe protéique pourraient expliquer l'absence de dissociation du fer de la PvdI lorsque le complexe PvdI-Fe est incubé avec des préparations membranaires de cellules TOP10 d'*E. coli* exprimant le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. Cette absence d'activité du complexe peut avoir plusieurs explications :

- On peut émettre l'hypothèse que la protéine FpvG<sub>His6</sub> n'est pas active lorsqu'elle est en complexe avec FpvH<sub>Strep</sub>. Mais cette hypothèse est quelque peu en contradiction avec des études de cinétiques de dissociation de PvdI-Fe réalisées *in vivo* chez *P. aeruginosa*. Ces études montrent qu'une délétion du gène *fpvH* affecte négativement la cinétique de dissociation de PvdI-Fe *in vivo* (Ganne *et al.*, 2017). Dans ces conditions, FpvH doit être exprimée pour que FpvG soit pleinement active *in vivo*.
- FpvG<sub>His6</sub> n'est pas active dans le complexe avec FpvH<sub>Strep</sub> car il manque les autres partenaires protéiques FpvJ, FpvC et FpvF.
- Cette dissociation du complexe PvdI-Fe *in vitro* en présence de FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> peut sembler moins efficace car elle est réversible, le fer ferreux non piégé se réoxyde et est à nouveau chélaté par la PvdI. Une réversibilité qui n'existerait pas avec FpvG<sub>His6</sub> seule.
- Le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> n'est pas fonctionnel car exprimé dans *E. coli* ou parce qu'une des étiquettes (His<sub>6</sub> ou Strep) affecte l'activité de FpvG<sub>His6</sub> au sein du complexe.

A ce stade, il est difficile de conclure concernant cette absence d'activité *in vitro* du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. Il faudrait dans un premier temps pouvoir tester l'activité d'un complexe FpvG-FpvH exprimé dans *P. aeruginosa* et sans étiquettes His<sub>6</sub> et Strep.



Nous avons mis en évidence avec le test au TMBZ, la présence d'au moins une molécule d'hème sur le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub>. Ceci est confirmé par le spectre d'absorption du complexe montrant un maximum d'absorbance à 414 nm, caractéristique de la bande de Soret spécifique aux hémoprotéines ainsi qu'un second pic d'absorbance à 550 nm. Cela conforte l'hypothèse de la présence d'hème associé au complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> (Soret, 1883).

La bande révélée sur le gel par le test au TMBZ à la taille de FpvH<sub>Strep</sub> suggère que cette dernière peut fixer de l'hème. Cependant, cette bande peut aussi se révéler être un artéfact de l'expérience. Une protéine ne fixant pas de l'hème mais interagissant avec le TMBZ a déjà été révélée par cette technique (Miller & Nicholas', 1984). De plus, l'analyse de la séquence peptidique de FpvH à l'aide de différentes banques de données (HHPred, Pfam, NCBI-CDD, PROSITE) montre qu'il n'y a aucun motif ou résidu conservé qui pourraient être impliqués dans la fixation d'une molécule d'hème. La bande révélée par le test au TMBZ à la taille de FpvG<sub>His6</sub> fait plus de sens.

De plus, les expériences de co-immunoprécipitation avec des billes d'agarose couplées à de l'hémine ont montré une liaison de FpvG<sub>His6</sub> et du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> sur ces billes. FpvG<sub>His6</sub> est donc capable de s'accrocher à l'hémine et le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> se lie certainement sur les billes via l'interaction FpvG<sub>His6</sub>-hème, avec FpvH<sub>Strep</sub> interagissant uniquement avec FpvG<sub>His6</sub> et non avec les billes. Pour confirmer tout ceci, il faudrait purifier la protéine FpvG seule et vérifier la présence d'hème par le test au TMBZ, et par un spectre d'absorption sous forme réduit et oxydé. Il serait intéressant également de pouvoir extraire l'hème de FpvG afin de le quantifier et déterminer le nombre de molécules d'hème attachées à FpvG, l'affinité ainsi que le type (hème de type b ou c). La présence de 4 résidus d'histidine conservés chez FpvG nous permet de suggérer la fixation de deux molécules d'hèmes, fixées chacune par deux résidus d'histidines. L'absence du motif spécifique CxxCH de l'hème c suggère qu'un autre type d'hème est lié à FpvG.

La mutation de ces 4 résidus d'histidine conservés de FpvG confirme qu'au moins deux d'entre eux sont impliqués dans la liaison de l'hème (co-immunoprécipitation) et jouent un rôle clé pour l'activité de l'enzyme dans la dissociation du fer de la PvdI. Il serait intéressant de construire plusieurs mutants de FpvG avec un seul des résidus mutés à la fois. Ces gènes mutés pourraient être introduits dans un plasmide d'expression (avec un tag en C-terminal pour l'immunodétection) pour vérifier (i) la qualité d'expression des mutants et (ii) la dissociation du complexe PvdI-Fe en présence de fractions membranaires préparées à partir de souches exprimant ces mutants. De cette façon, nous pourrions déterminer quels sont les résidus les plus importants et si les 4 His sont nécessaires pour que FpvG conserve son

activité. Ces mutations pourront aussi être générées au niveau du gène *fpvG* directement dans le chromosome de *P. aeruginosa*, afin d'évaluer l'impact de ces mutations sur la dissociation du fer de la PvdI *in vivo*. Les résidus d'histidine pourraient également être remplacés par d'autres résidus connus pour lier l'hème (comme des résidus de cystéine et de tyrosine) pour déterminer si la fonction de FpvG est restaurée lorsqu'elle peut de nouveau fixer de l'hème.

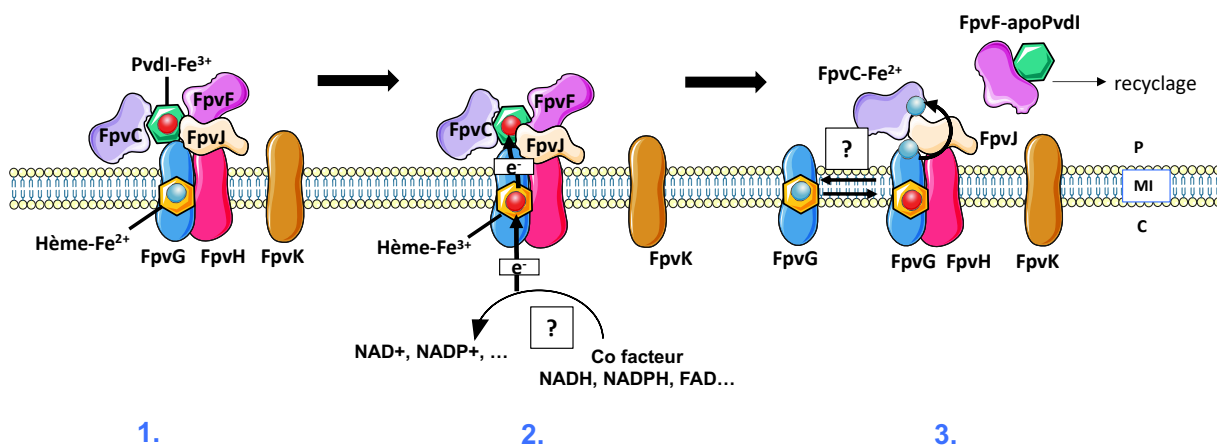
En présence du complexe PvdI-Fe, le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> ne s'accroche plus aux billes d'agarose couplées à des molécules d'hème. La présence simultanée de PvdI-Fe et FpvH peut empêcher l'exposition du site d'interaction de l'hème du complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> aux billes. Cela suggère que PvdI-Fe interagit avec le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> même si aucune dissociation du fer de la PvdI n'est observée en fluorescence à 447 nm lorsque le complexe FpvG<sub>His6</sub>-FpvH<sub>Strep</sub> est incubé avec PvdI-Fe (voir [Figure n°41](#)).

Nous avons également observé qu'en exprimant le mutant FpvG<sub>mut</sub> dans une souche d'*E. coli*, nous avons, pour les mêmes conditions, moins d'expression qu'avec la protéine FpvG sauvage et beaucoup de produits de dégradation. La ou les molécule(s) d'hème(s) fixée(s) sur FpvG semblent importantes pour le repliement et la stabilité de cette protéine. Le remplacement des 4 résidus His conservés par des résidus Ala ne semble toutefois pas impacter ni la localisation cellulaire de la protéine puisque le mutant est retrouvé dans les membranes solubilisées, ni les interactions avec FpvH, FpvJ et FpvC testées en double hybride bactérien. Ces derniers résultats nous indiquent que les histidines ne sont pas impliquées dans les interactions protéiques de FpvG et que FpvG<sub>mut</sub> adopte sûrement une conformation qui doit être semblable à la protéine FpvG sauvage. Il serait intéressant de vérifier l'importance de la présence d'hème sur la stabilité de FpvG et son niveau d'expression, en exprimant la protéine dans une souche d'*E. coli* S905 (Leong *et al.*, 1982). Cette souche a la caractéristique d'avoir une délétion du gène *hemA* codant pour une enzyme de biosynthèse de l'hème. Nous pourrions ainsi suivre l'expression de FpvG et des différents mutants de FpvG dans une telle souche (Small & O'Brian, 2011). La dissociation *in vivo* du complexe PvdI-Fe pourra également être suivie dans une souche de *P. aeruginosa* délétée pour un gène de biosynthèse de l'hème.

En conclusion, les différents résultats que nous avons obtenus, indiquent que la réductase FpvG est une hémoprotéine possédant au moins une molécule d'hème fixée par deux histidines. Le fer qui est lié à l'hème peut changer d'état d'oxydation entre Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>. Ainsi, les protéines fixant de l'hème fonctionnent comme transporteur d'un seul électron. L'hème lié à FpvG permet certainement de fournir l'électron nécessaire à la réaction de réduction du fer permettant la dissociation du fer de la PvdI ([Figure n°49](#)). Dans ce scénario, un cofacteur

apporté par une autre protéine d'une chaîne de transport d'électrons est nécessaire pour la transition d'état d'oxydation du fer au sein de la molécule d'hème. On peut supposer que les protéines FpvH, FpvJ ou FpvK fonctionnent comme une chaîne de transport d'électrons, capable de fixer différents cofacteurs comme par exemple le NAD ou le NADP avec l'hème de FpvG comme accepteur final d'électron. On peut aussi imaginer que les protéines FpvH, FpvJ et FpvK sont là pour permettre la formation du complexe FpvGHJCF et permettre ainsi au sein de ce complexe le passage du fer de la PvdI à FpvC après réduction.

D'après les résultats obtenus, FpvG est capable de lier le complexe PvdI-Fe, tout comme le complexe formé par les deux protéines périplasmiques FpvC-FpvF (Brillet *et al.*, 2012). A ce stade, il est impossible de savoir avec quelle protéine le complexe PvdI-Fe interagit en premier après son entrée dans le périplasma de la bactérie, FpvG ou le complexe FpvC-FpvF ou directement le complexe multi-protéique FpvGHJFC.



Après son transport dans le périplasma, PvdI-Fe est capté sur le complexe FpvC/F/G/H/J très probablement grâce à FpvC, FpvF et FpvG qui peuvent lier le complexe PvdI-Fe.

Réduction du fer ferrique de la PvdI par l'action de FpvG. Probablement l'hème comme donneur d'électron grâce au changement d'oxydation du fer en son centre, qui pourrait être médiée par la réduction de cofacteurs

Après réduction du fer, le fer ferreux nouvellement formé pourrait dans un premier temps rester sur FpvG avant d'être fixé sur FpvC. Notre hypothèse est que les protéines FpvH et FpvJ maintiennent le complexe et permettent la transition du Fe<sup>2+</sup> depuis FpvG jusqu'à FpvC. L'apo-PvdI est quant à elle fixée par FpvF pour être ensuite recyclée.

**Figure n°49 : Mécanisme de dissociation du fer de la PvdI proposé.** P : Périplasma, MI : Membrane Interne et C : Cytoplasme. Fe<sup>3+</sup> est représenté en rouge et Fe<sup>2+</sup> en bleu.

Un autre aspect à étudier dans l'avenir est la présence de réductases potentielles dans d'autres voies d'import du fer dépendantes de sidérophores. Il pourrait être intéressant de déterminer la présence de molécules d'hèmes fixées sur les protéines PiuB, FoxB, AmpO et PA1909 et leur rôle dans la réduction du fer au sein des complexes sidérophore-fer. Des études sont en cours au laboratoire concernant PiuB et FoxB. Le mécanisme « conservé » de dissociation de ces complexes sidérophore-fer pourrait en effet faire intervenir une réduction

par des hémoprotéines comme pour la voie PvdI avec FpvG. L'existence de ferri-reductase portant de l'hème a été montrée chez la bactérie symbiotique des légumineuses *Bradyrhizobium japonicum* (Small & O'Brian, 2011). Cette bactérie possède le gène *fcrB* qui code pour la protéine membranaire FcrB contenant deux groupements hèmes par monomère et est capable de réduire le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$ . Des résidus d'histidine sont probablement responsables de la fixation des groupements hème, toutefois les séquences de FcrB et FpvG ne s'alignent pas. L'existence de ferri-reductase portant des groupements hème est répandue dans le monde procaryote, mais n'avait encore jamais été décrit comme impliquée dans les mécanismes de dissociation des complexes sidérophores-fer.

## **Chapitre VIII :** **Sécrétion de la PvdI**

Dans ce Chapitre, nous nous sommes intéressés à la sécrétion du sidérophore PvdI. Nous savons que ce sidérophore est sécrété partiellement par la pompe à efflux PvdRTOpMq, dont les gènes sont situés sur le locus Pvd. Cette pompe à efflux sécrète de la PvdI nouvellement synthétisée, celle qui vient de transporter du fer dans le périplasme et tout complexe PvdI-métal autre que le complexe PvdI-Fe et ne pouvant pas se dissocier dans le périplasme de la bactérie (Hannauer *et al.*, 2012a; Hannauer *et al.*, 2010b; Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2009). Nous savons également que d'autres transporteurs non identifiés sont impliqués dans la sécrétion de la PvdI, particulièrement dans la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée. En effet, une délétion de la pompe à efflux PvdRTOpMq n'affecte que légèrement la sécrétion de PvdI. En utilisant une approche de criblage des interactions protéiques de la réductase FpvG avec le génome de *P. aeruginosa*, nous avons identifié un potentiel nouveau système de sécrétion de la PvdI.

## I) Protéines interagissant avec FpvG

### a. Recherche de potentiels partenaires de la réductase FpvG

Dans le but d'étudier plus en détails les fonctions et les interactions protéiques de la réductase FpvG, nous avons utilisé 4 banques de double hybride bactérien construites par Houot *et al.* à partir de l'ADN génomique de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Houot *et al.*, 2012). Cette banque est constituée de plasmides appelés « proies » qui contiennent des fragments du génome de *P. aeruginosa* PAO1 qui a été digéré de manière aléatoire. Ces fragments ont été fusionnés au domaine T18 de l'adénylate cyclase pour construire les plasmides pUT18lib, pUT18+1lib (cadre de lecture décalé de +1), pUT18+2lib (cadre de lecture décalé de +2) et pUT18Clib (domaine T18 cloné en amont des fragments). Ces plasmides ont été co-transformés dans les cellules DHM1 d'*E. coli* avec les plasmides « appâts », pKT25-FpvG ou pKNT25-FpvG. Les cellules transformées ont ensuite été étalées sur milieu indicateur contenant du X-Gal. Lorsqu'il y a une interaction entre deux partenaires protéiques exprimés à partir des plasmides « proies » et « appâts » présents dans une même cellule bactérienne, il y a reconstitution de l'activité  $\beta$ -galactosidase, dégradation du X-Gal et apparition de clones bleus. Après sélection de ces clones bleus, les plasmides « proies » ont été purifiés. Les séquences de chaque plasmide proie obtenu ont été identifiées par alignement contre la banque de données de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (NCBI-BlastP). Au total, 6 fragments protéiques ont ainsi pu être identifiés, correspondants aux protéines présentées dans le [Tableau n°8](#).

**Tableau n°8 : Liste des potentiels interactants de FpvG**

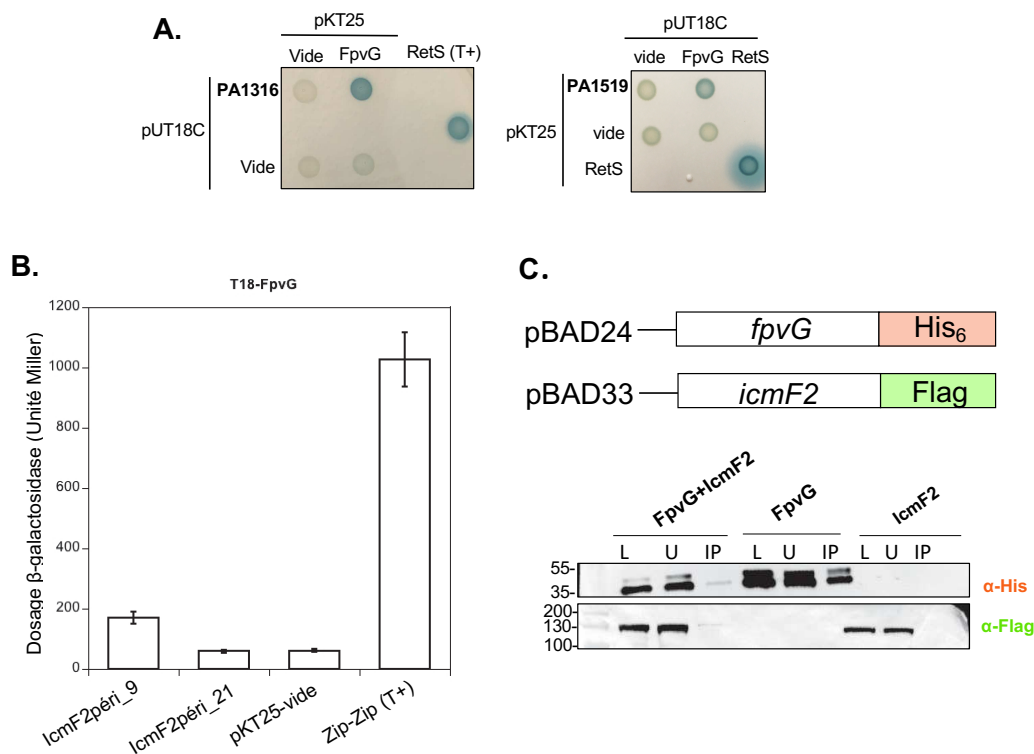
Partenaire potentiel	Fonction prédite
PA1669 : lcmF2	Structure du système de sécrétion de type VI (H2-T6SS)
PA1316	Transport MFS de membrane interne
PA1519	Transporteur de membrane interne
PA3747	Cytochrome assembly/Heme Binding FAD Binding
PA1447 : FliQ	Structure du flagelle
PA1832 : SohB	Protéase

Les interactants de FpvG identifiés par ce criblage de banque sont des protéines tronquées car les plasmides « proies » ne portent que des fragments de gènes. Il est donc nécessaire de valider l'interaction en clonant la protéine entière dans les vecteurs de double hybride. Les interactions avec les probables transporteurs de membrane interne PA1316 et PA1519 ont été validées par double hybride bactérien (Figure n°50A) et suggèrent une interaction entre ces deux protéines de fonction inconnue et FpvG. Les interactions détectées par le criblage double hybride entre FpvG et FliQ, PA1832 ou PA3747 n'ont à ce jour pas encore été validées.

Concernant la protéine lcmF2, qui est une protéine de structure appartenant au deuxième système de sécrétion de type VI (H2-T6SS), il nous a été impossible de cloner entièrement sa séquence dans les plasmides de double hybride bactérien pour valider l'interaction avec FpvG. Nous avons alors utilisé deux clones plasmidiques différents (clones 9 et 21) obtenus par l'intermédiaire d'Éric Durand (LISM, Marseille) et portant uniquement la partie périplasmique de lcmF2 clonée dans le vecteur pKTM25. Ces plasmides ont été co-transformés avec le plasmide pUT18C-FpvG et les interactions ont été suivies par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase, mais aucune interaction n'a été détectée (Figure n°50B). Nous avons alors cloné lcmF2 dans un vecteur d'expression pBAD33 afin de pouvoir le co-exprimer avec FpvG<sub>His6</sub> en lui ajoutant une étiquette Flag en C-terminal (pBAD33-lcmF2<sub>Flag</sub>). Les conditions d'expression optimale de la protéine lcmF2<sub>Flag</sub> ont été déterminées à partir de la souche TOP10 *E. coli* afin de pouvoir la co-exprimer avec FpvG<sub>His6</sub>. Les fractions membranaires de bactéries exprimant FpvG<sub>His6</sub>, lcmF2<sub>Flag</sub> ou les deux protéines ont été incubées en présence de DDM pour solubiliser les protéines, puis incubées avec des billes de Nickel. Après plusieurs lavages, les billes ont été récupérées et analysées par immunodétection.

L'analyse des fractions co-immunoprécipitées montre que FpvG<sub>His6</sub> est retenue sur les billes de nickel lorsqu'elle est exprimée seule dans les bactéries mais de manière surprenante pas lorsque les deux protéines FpvG<sub>His6</sub> et lcmF2<sub>Flag</sub> sont exprimées ensemble dans les bactéries (Figure n°50C). Ces résultats suggèrent qu'un complexe FpvG<sub>His6</sub>-lcmF2<sub>Flag</sub> puisse se former

mais avec l'étiquette His6 de FpvG, la protéine n'est plus accessible pour l'interaction avec les billes de nickel. Ces résultats ne permettent pas de conclure de manière rigoureuse qu'une interaction protéique existe entre FpvG et IcmF2.



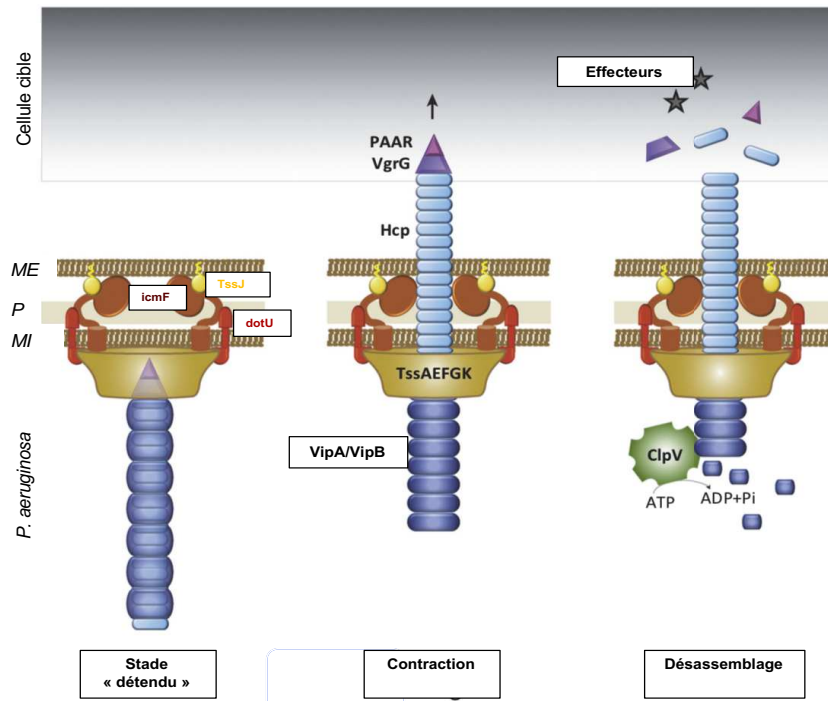
**Figure n°50 : Essais de validation des interactions protéiques détectées par le criblage en double hybride bactérien.** **A. Double hybride bactérien entre FpvG et les deux probables transporteurs PA1316 et PA1519.** Les cellules de DHM1 produisant la protéines FpvG, PA1519 ou PA1316 fusionnées aux domaines T18 et T25 ont été déposées sur milieu LB gélosé contenant du X-Gal. Pour contrôle, les protéines ont été testées contre les plasmides vides et une protéine non reliée à la voie Pvd (RetS). La couleur bleue signifie que les deux partenaires interagissent. L'expérience a été répétée 3 fois et nous avons choisi une image représentative **B. Double hybride bactérien entre FpvG et la partie périplasmique de IcmF2.** Les interactions entre FpvG et la partie périplasmique de icmF2 ont été quantifiées en mesurant l'activité β-galactosidase. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des moyennes (n = 3). **C. Vecteurs d'expression de FpvG<sub>His6</sub> et IcmF2<sub>Flag</sub> et expérience de pull down avec des billes de Nickel.** Les protéines des différentes membranes de cellules d'*E. coli* produisant FpvG<sub>His6</sub>, IcmF2<sub>Flag</sub> ou les deux protéines FpvG<sub>His6</sub> et IcmF2<sub>Flag</sub> simultanément ont été solubilisées à l'aide du détergent DDM et incubées avec 50 µl de billes de nickel. Les fractions « Load » (L, correspondant aux membranes solubilisées), non liées (Unbound, U) et co-immunoprécipitées (IP) ont été séparées sur gel de polyacrylamide et analysées en immunodétection. Le poids moléculaire, en KDa, est indiqué sur la gauche des photos.

## b. Le H2-T6SS

Le H2-T6SS est l'un des trois systèmes de sécrétion de type 6 encodé dans le génome de *P. aeruginosa*, possédant une activité anti-bactérienne et anti-eucaryote. Comme les autres T6SS, il fonctionne comme un nanotube contractile (Bönemann *et al.*, 2010). Il est composé d'un complexe de membrane interne composé de 3 protéines (dont IcmF2), d'un socle membranaire qui fait face au cytoplasme, d'une structure tubulaire composée de protéines



Hcp formée dans le cytoplasme, entourée par un « fourreau » composé des protéines de type VipA et VipB (Cherrak *et al.*, 2019; Cianfanelli *et al.*, 2016). Les protéines VgrG et PAAR forment à la pointe du tube Hcp une structure qui permet de perforer les membranes cibles (Cianfanelli *et al.*, 2016). Lorsque VipA et VipB se contractent, le tube Hcp est propulsé, la membrane cible perforée et les effecteurs sont ainsi sécrétés (Bönemann *et al.*, 2009). Le T6SS est ensuite désassemblé par l'action d'une ATPase (Bönemann *et al.*, 2009) (Figure n°51).



**Figure n°51 : Représentation du système de sécrétion de type VI.** Différents composants du T6SS ont été renommés pour correspondre aux annotations données dans la littérature pour *P. aeruginosa*. Modifié d'après (Cianfanelli *et al.*, 2016). ME : Milieu extracellulaire, P : Périplasma et C : Cytoplasme.

Même si nous n'avons pas réussi à confirmer de manière rigoureuse l'interaction entre IcmF2 et FpvG, plusieurs indices trouvés dans la littérature montrent que les T6SS sont étroitement reliés à l'homéostasie du fer. En effet, deux boîtes Fur ont été identifiées en amont des gènes du H2-T6SS chez *P. aeruginosa* (Sana *et al.*, 2012). Des expériences de fusion transcriptionnelle ont montré que ce système est exprimé en condition de carence en fer (Sana *et al.*, 2012). Chez *P. tawainensis*, dont le génome ne code que pour un seul T6SS, il a été montré que ce système était directement impliqué dans la sécrétion de la PvdI (Chen *et al.*, 2016). Chez *P. aeruginosa*, la délétion de IcmF3 (protéine de structure du H3-T6SS) entraîne une baisse de 50 % de la quantité de PvdI sécrétée par rapport à une souche sauvage (J. Lin *et al.*, 2015). Le rôle du H3-T6SS dans l'acquisition du fer a également été montré dans l'étude de Lin en 2017. Le H3-T6SS sécrète la protéine TseF dans le milieu extracellulaire qui est ensuite incorporée dans les Outer Membrane Vesicles (OMVs) contenant des complexes

PQS-Fe<sup>3+</sup>. Les complexes PQS-Fe<sup>3+</sup> seraient ensuite internalisés dans la cellule par reconnaissance de TseF avec les transporteurs de membrane externe FptA et OprF (J. Lin *et al.*, 2017).

Des études ont également montré un lien entre les T6SS chez les bactéries à Gram négatif et l'homéostasie des métaux en général. Par exemple, chez *Yersinia pseudotuberculosis*, en condition de stress cellulaire, le T6SS-4 permet la sécrétion d'une protéine chélatant le zinc, appelée zincophore. Cette protéine permet à la cellule de récupérer du zinc et de lutter contre le stress oxydatif par l'action protectrice de l'ion Zn<sup>2+</sup> sur la formation de ROS et d'autres mécanismes endommageant la cellule (T. Wang *et al.*, 2015). Le T6SS-4 de *Burkholderia thailandensis* est impliqué dans l'acquisition du manganèse en cas de stress oxydatif (Si *et al.*, 2017). Enfin, chez *P. aeruginosa*, le H2-T6SS est impliqué dans la sécrétion d'une protéine Azu chélatant le Cu<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire et permettant de le ramener à la cellule (Han *et al.*, 2019). Ces différentes données prouvent que les T6SS participent activement à l'homéostasie des métaux chez les bactéries à Gram négatif.

Le H3-T6SS semble être indiqué dans la sécrétion de PvdI (J. Lin *et al.*, 2015), mais les résultats de la banque de double hybride bactérien avec FpvG nous ont amené à émettre l'hypothèse que le H2-T6SS pouvait également être impliqué dans la sécrétion de la PvdI.

## II) [Le système H2-T6SS et sa possible implication dans la sécrétion de PvdI](#)

### a. Génération des mutants

Afin d'inactiver le H2-T6SS, nous avons décidé de cibler ClpV2, qui est une ATPase AAA+ dont l'activité est essentielle pour son fonctionnement (Bönemann *et al.*, 2009; Mougous, 2006).

Dans le but de visualiser différents mécanismes, la mutation du gène *clpV2* a été générée dans différentes souches de PAO1 dont certaines possèdent déjà des gènes délétés.

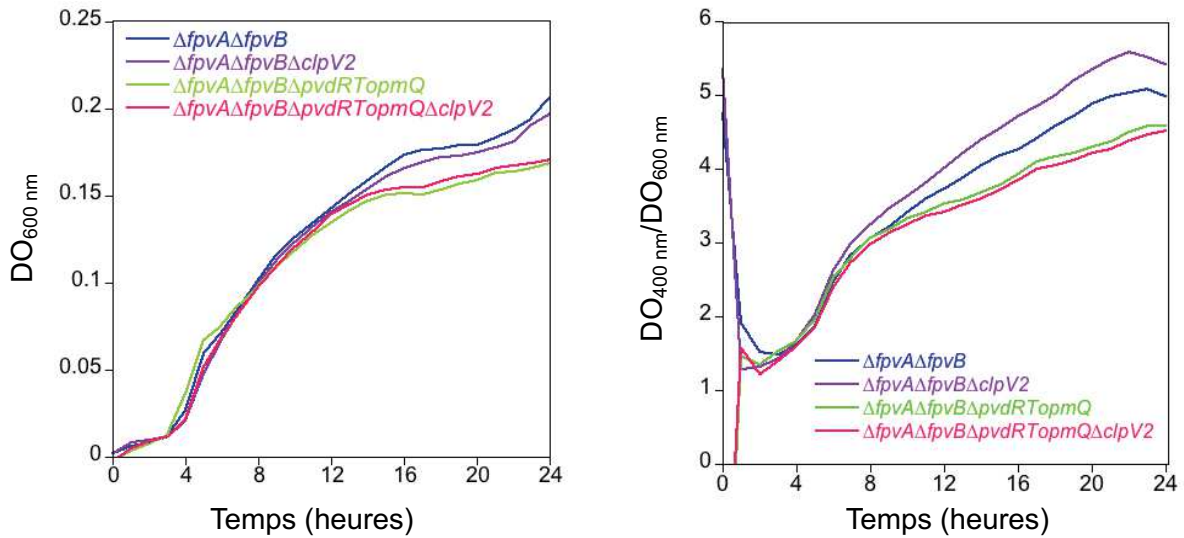
Ces mutants sont décrits dans le [Tableau n°9](#). Ainsi, les mutants où *fpvA* et *fpvB* sont délétés vont nous permettre de suivre spécifiquement la sécrétion de PvdI nouvellement synthétisée car l'import de PvdI-Fe a été inactivé. Les mutants délétés de *pvdF* et *pchA* vont nous permettre de suivre le recyclage de la PvdI car ces souches ne peuvent plus synthétiser le sidérophore. Enfin, l'effet additif de la délétion de ClpV2 et de la pompe PvdRTOpM sera suivi dans les mutants où les gènes *clpV2* et *pvdRTOpM* ont été délétés.

**Tableau n°9 : Souches construites pour l'étude du H2-T6SS dans la sécrétion de PvdI.**

Souches	Caractéristiques	Référence
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Sauvage	Collection du laboratoire
PAO1 $\Delta$ <i>clpV2</i>	Délétion du H2-T6SS	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	Délétion de la pompe d'efflux (PvdRTOpMq)	Collection du laboratoire
PAO1 $\Delta$ <i>clpV2</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	Délétion du H2-T6SS et de la pompe d'efflux	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i> $\Delta$ <i>fpvB</i>	Délétions des TBDTs de la Pvd FpvA et FpvB	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i> $\Delta$ <i>fpvB</i> $\Delta$ <i>clpV2</i>	Délétion des TBDTs et du H2-T6SS-	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i> $\Delta$ <i>fpvB</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	Délétion des TBDTs et de la pompe d'efflux	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>fpvA</i> $\Delta$ <i>fpvB</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i> $\Delta$ <i>clpV2</i>	Délétion des TBDTs, de la pompe d'efflux et du H2-T6SS	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>pvdF</i> $\Delta$ <i>pchA</i>	Délétion des gènes de biosynthèses de Pvd et Pch	Collection du laboratoire
PAO1 $\Delta$ <i>pvdF</i> $\Delta$ <i>pchA</i> $\Delta$ <i>clpV2</i>	Délétion des gènes de biosynthèses et H2-T6SS	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>pvdF</i> $\Delta$ <i>pchA</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	Délétion des gènes de biosynthèse et pompe d'efflux	Ce travail
PAO1 $\Delta$ <i>pvdF</i> $\Delta$ <i>pchA</i> $\Delta$ <i>clpV2</i> $\Delta$ <i>pvdRTopmQ</i>	Délétion des gènes de biosynthèses, du H2-T6SS et de la pompe d'efflux	Ce travail

**b. Effet de la mutation *clpV2* sur la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée**

Nous avons utilisé les souches PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *clpV2*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* et PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *clpV2* afin d'étudier l'effet de la mutation de *clpV2* sur la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée tout en s'affranchissant de la PvdI recyclée. Ces souches sont encore capables de produire la PvdI mais ne peuvent plus importer le complexe PvdI-Fe car les gènes *fpvA* et *fpvB* codant pour les TBDTs sont délétés. Ces différentes mutations n'affectent pas significativement la croissance dans un milieu carencé en fer (milieu CAA) (Figure 52). La production de PvdI a également été suivie durant la croissance en mesurant son absorbance à 400 nm et en la rapportant à la DO à 600 nm. D'une manière assez surprenante, l'absorbance à 400 nm du mutant  $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *clpV2* est légèrement plus élevée que les autres. La production de PvdI des souches  $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* et  $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB*  $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *clpV2* est quant à elle légèrement plus faible que celle de  $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB*. D'après ces premiers résultats, la mutation de *clpV2* n'affecte pas la production de la PvdI.

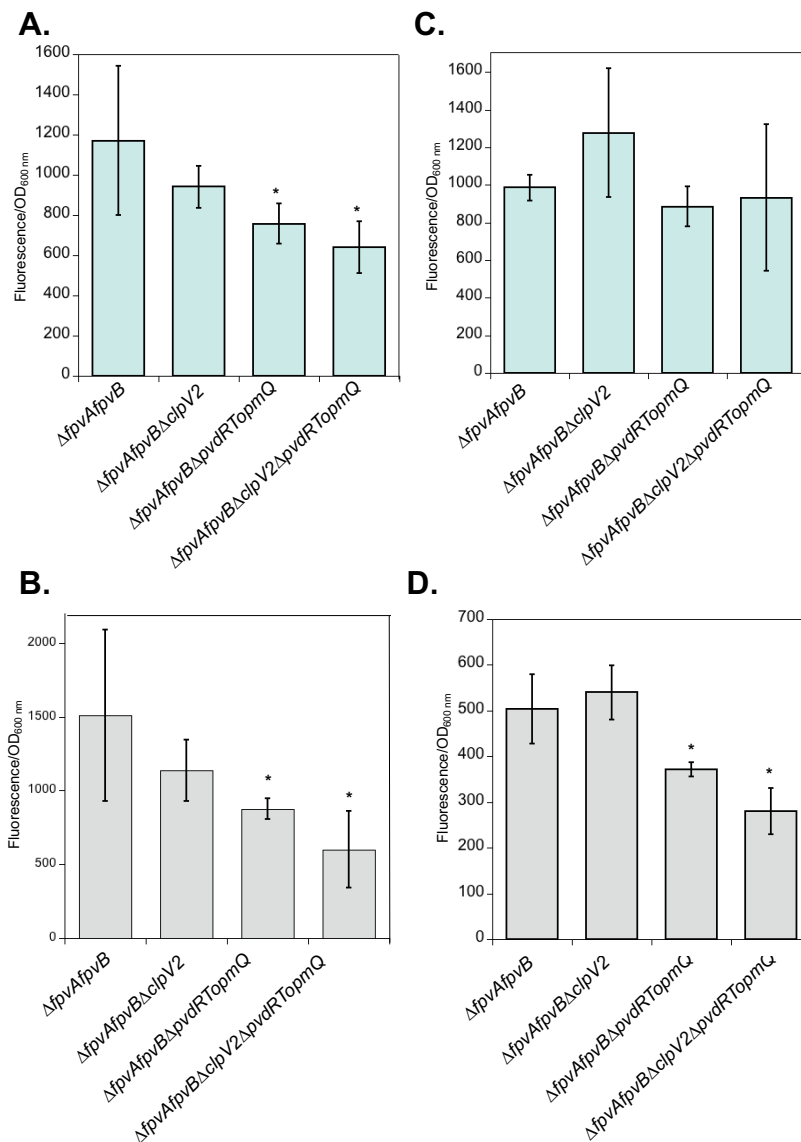


**Figure n°52 :** Croissance et production de la PvdI des souches PAO1 $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB, PAO1 $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ clpV2, PAO1 $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ pvdRTopmQ et PAO1 $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ pvdRTopmQ $\Delta$ clpV2. Les cellules ont été cultivées et carencées en milieu CAA puis déposées en plaque 96 puits à une DO<sub>600 nm</sub> de 0,01. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la DO à 600 nm sur 24 h à 30°C en lecteur microplaque (graphique de gauche). La production de la PvdI a été suivie en mesurant l'absorbance à 400 nm qui caractérise ce sidérophore et rapportée à la DO<sub>600 nm</sub> (graphique de droite).

Nous avons également mesuré la fluorescence dans le surnageant de culture après croissance en milieu carencé en fer (CAA) à 30°C ou 37°C dans des Falcon de 50 mL afin d'y détecter la PvdI. Après 5 h, 7 h et 15 h de culture, les bactéries ont été culotées et la fluorescence à 447 nm a été mesurée dans le surnageant cellulaire (**Figure n°53**). Dans les deux conditions, 30°C ou 37°C, après 5 h de croissance, la fluorescence dans le surnageant de la culture de  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ clpV2 n'est pas significativement différente de celle mesurée dans le surnageant de la souche  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB. La fluorescence mesurée dans le surnageant de la souche  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ pvdRTopmQ est significativement plus faible que celle mesurée dans la souche  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB et  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ clpV2. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet additif avec le mutant  $\Delta$ fvpA $\Delta$ fvpB $\Delta$ pvdRTopmQ $\Delta$ clpV2 délété pour la pompe *pvdRTopmQ* et *clpV2*. Ainsi, la baisse de fluorescence observée pour ces souches est due uniquement à la délétion de la pompe à efflux *pvdRTopmQ* et non à la délétion *clpV2*.

Après 7 h de culture, plus aucune baisse de fluorescence n'est observée pour aucune des deux délétions à 30°C. Par contre, on observe encore une diminution de la fluorescence à 37°C (**Figure n°53**). Après 15 h de culture, les cellules comportant la mutation *pvdRTopmQ* présentaient en culture liquide des valeurs de croissance beaucoup trop faibles et les mesures de PvdI n'ont de ce fait pas été réalisées. La délétion de *pvdRTopmQ* pourrait devenir toxique après un certain temps pour les bactéries lors d'une culture en Falcon 50 mL.

Ces données indiquent que la délétion de *clpV2* n'a aucun effet sur la quantité de PvdI sécrétée dans le milieu extracellulaire des souches PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *clpV2* et PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *clpV2*. Le H2-T6SS ne semble pas être impliqué dans la sécrétion de la PvdI.

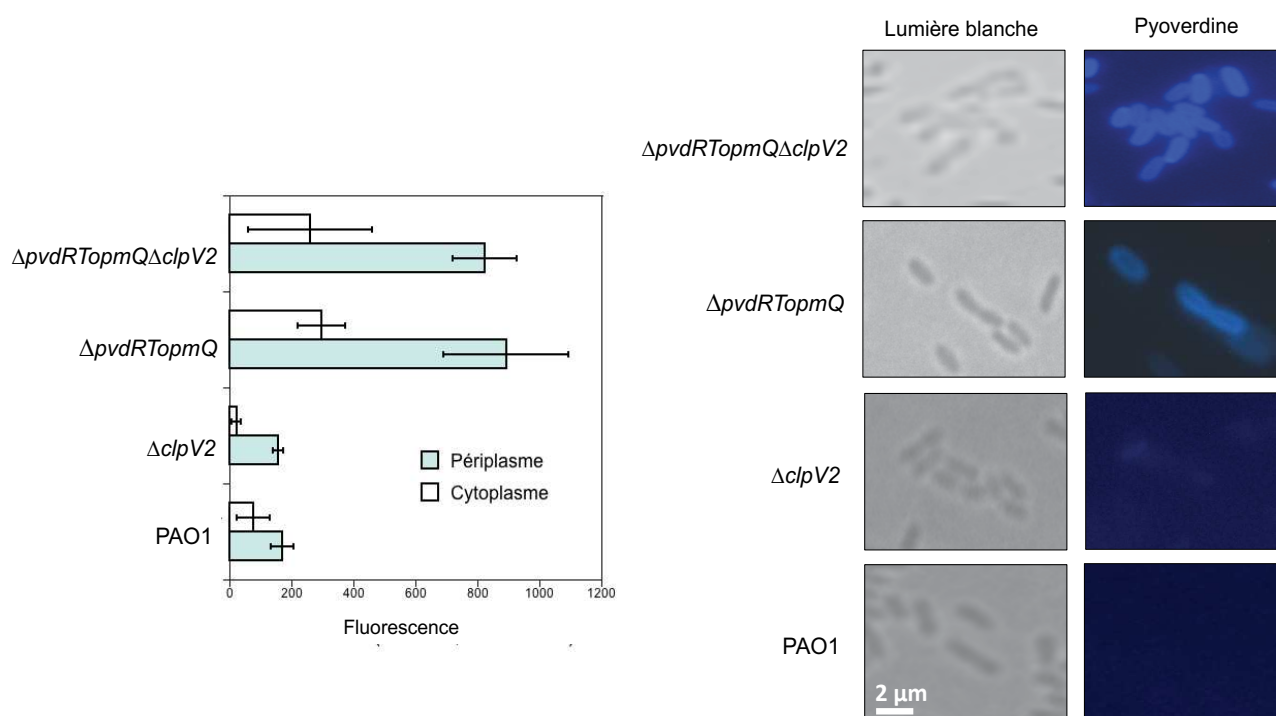


**Figure n°53 : Sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée.** Les souches PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *clpV2*, PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* et PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* $\Delta$ *pvdRTopmQ* $\Delta$ *clpV2* ont été cultivées en milieu CAA, reprises dans ce même milieu à une DO à 600 nm de 0,1. Après 5 h de culture à 30°C (A) ou 37°C (B) les bactéries ont été centrifugées et la fluorescence de la PvdI à 447 nm mesurée au lecteur de microplaques TECAN (excitation 400 nm). Après 7 h de culture à 30°C (C) ou 37°C (D) les bactéries ont été centrifugées et la fluorescence de la PvdI à 447 nm mesurée au lecteur de microplaque TECAN (excitation 400 nm). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des moyennes (n = 4). L'astérisque indique une différence statistiquement significative (\*p < 0,05) par rapport à la souche PAO1 $\Delta$ *fpvA* $\Delta$ *fpvB* déterminée avec le test Kruskal-Wallis ajusté avec la méthode Bonferroni.

**c. Effet de la mutation *clpV2* sur l'accumulation de fluorescence dans le périplasma de *P. aeruginosa***

L'article d'Hannauer *et al.*, a montré l'implication de la pompe à efflux PvdRTOpMq dans la sécrétion de la PvdI. En effet, ils ont démontré une forte accumulation de PvdI dans le périplasma de leur mutant (Hannauer *et al.*, 2010b). Nous avons répété cette expérience avec le mutant *clpV2*. Des sphéroplastes ont été préparés à partir des souches PAO1 (souche sauvage),  $\Delta pvdRTOpMq$ ,  $\Delta clpV2$  et  $\Delta clpV2\Delta pvdRTOpMq$  cultivées en milieu CAA durant 5 h à 30°C. Les fractions périplasmiques et cytoplasmiques ont ensuite été isolées. La fluorescence à 447 nm a été mesurée dans les deux compartiments cellulaires des mutants (Figure n°54).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la délétion de *clpV2* n'entraînait pas d'accumulation de fluorescence dans le périplasma comme observée pour le mutant  $\Delta pvdRTOpMq$ . De plus, la fluorescence dans le périplasma du double mutant  $\Delta clpV2\Delta pvdRTOpMq$  est la même que dans le simple mutant  $\Delta pvdRTOpMq$ . Aucun effet additif n'a été observé avec la mutation de *clpV2*. Nous avons ensuite visualisé les cellules en microscopie de fluorescence avec un filtre permettant l'excitation de la PvdI. Nous avons observé les cellules dont le contour est fluorescent (correspondant à la PvdI accumulée dans le périplasma) uniquement pour les souches délétées de la pompe d'efflux. Le simple mutant  $\Delta clpV2$  et la souche PAO1 sont difficilement visibles en fluorescence puisqu'il n'y a pas suffisamment de PvdI accumulée dans le périplasma. Ces données de microscopie confirment les résultats de fractionnement cellulaire.

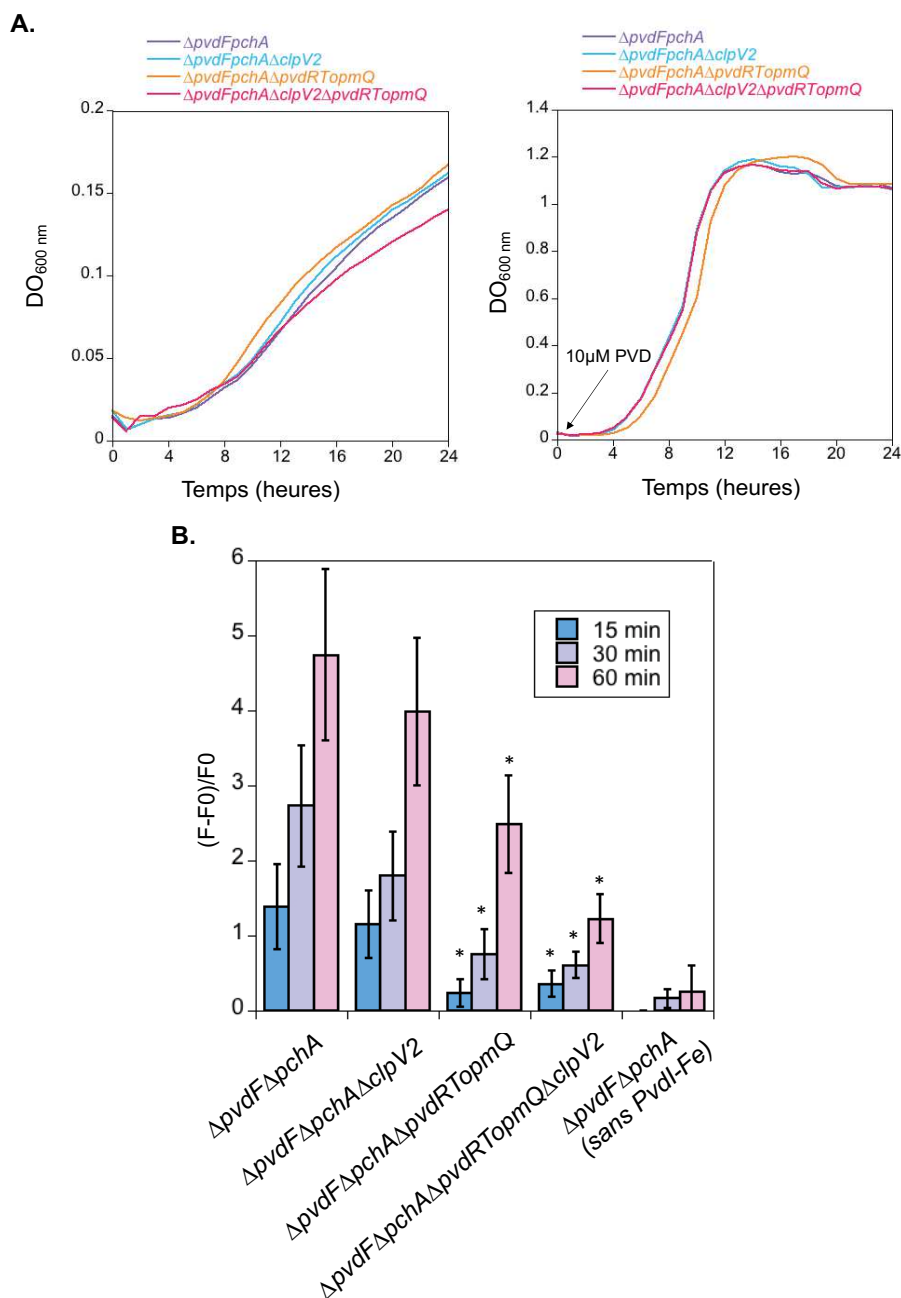


**Figure n°54 : Accumulation de PvdI dans le périplasma bactérien. A. Fractionnement cellulaire.** Après 5 h de croissance en milieu CAA, les cellules (PAO1 (souche sauvage),  $\Delta pvdRTopmQ$ ,  $\Delta clpV2$  et  $\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$ ) sont récupérées par centrifugation et les fractions périplasmiques et cytoplasmiques sont isolées comme décrit dans le Matériel et Méthodes. La fluorescence des différentes fractions est mesurée au lecteur de microplaque (Excitation à 400 nm, Émission à 447 nm). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de la moyenne (n = 3). **B. Microscopie de fluorescence.** Les cellules ont été déposées sur lame de CAA-Agarose et observées au grossissement X100. Le filtre d'excitation de la fluorescence BV-2A (Excitation 400-440 nm) a été utilisé pour visualiser la fluorescence liée à la PvdI. La barre blanche représente environ 2  $\mu$ m.

#### **d. Effet de la mutation *clpV2* sur le recyclage de la PvdI.**

Nous avons utilisé des souches incapables de synthétiser les sidérophores PvdI et Pch ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ) afin de suivre le recyclage de la PvdI. Ces mutations affectent deux gènes codant pour les enzymes de biosynthèse de ces sidérophores. La croissance des souches n'est pas impactée par les mutations apportées (**Figure n°55A**).

Nous avons ensuite utilisé un protocole décrit par notre équipe pour visualiser le recyclage de la PvdI ayant transporté du fer à l'intérieur de la bactérie (Schalk *et al.*, 2002; Yeterian *et al.*, 2009). Les souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta clpV2$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pvdRTopmQ$  et  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pvdRTopmQ\Delta clpV2$  ont été cultivées en milieu CAA, centrifugées puis diluées à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 1 en présence de 1  $\mu$ M de complexe PvdI-Fe. A différents temps, un aliquot a été récupéré, les cellules ont été culotées et la fluorescence correspondant à la PvdI mesurée dans le surnageant (**Figure n°55B**). On observe, pour le mutant  $\Delta pvdF\Delta pchA$ , une augmentation de fluorescence en fonction du temps, c'est-à-dire un recyclage de la PvdI (Yeterian *et al.*, 2009). Ce recyclage est affecté négativement chez le mutant  $pvdRTopmQ$  car on observe une fluorescence amoindrie dans le milieu extracellulaire. Ce résultat confirme le rôle clé de la pompe PvdRTOpMq dans le recyclage de la PvdI observé précédemment (Yeterian *et al.*, 2009). La délétion de *clpV2* entraîne une faible inhibition de la fluorescence retrouvée dans le milieu extracellulaire pour les souches  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta clpV2$  et  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$  comparé aux souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$  et  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pvdRTopmQ$ . Cependant, les tests statistiques réalisés indiquent malheureusement que cette différence n'est pas significative. En conséquence, il est difficile de conclure de manière positive quant à l'implication du H2-T6SS dans le recyclage de la PvdI ayant transporté du fer chez *P. aeruginosa*.



**Figure n°55 : Recyclage de la PvdI ayant transporté du fer dans les cellules bactériennes. A. Croissance des souches  $\Delta pvdF\Delta pchA$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta clpV2$ ,  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pvdRTopmQ$  et  $\Delta pvdF\Delta pchA\Delta pvdRTopmQ\Delta clpV2$ .** Les cellules ont été cultivées en milieu CAA puis déposées en plaque 96 puits à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,01 avec ou sans incubation de 10  $\mu\text{M}$  de PvdI. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la DO à 600 nm sur 24 h à 30°C en lecteur microplaques. **B. Recyclage de la PvdI après transport du fer dans la bactérie.** Les cellules ont été cultivées en milieu CAA puis reprises dans du tampon Tris-HCl, pH 8.0 et incubées en présence de 1  $\mu\text{M}$  de PvdI-Fe à 30°C. Après 15, 30 ou 60 min d'incubation, un aliquot est récupéré, les cellules sont culotées et la fluorescence à 447 nm mesurée. Les tests statistiques à t = 15 min et t = 30 min ont été réalisés avec le test t de Welch ( $p < 0.05$ ) en comparant les données obtenues avec les mutants à la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$  et à t = 60 min avec le test de Kruskal-Wallis ajusté avec la méthode Bonferroni ( $p < 0.01$ ), en comparant les données des mutants à la souche  $\Delta pvdF\Delta pchA$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des moyennes (n = 4).



#### **e. Tests de sécrétion de Pvd dans des cellules cibles.**

Le H2-T6SS est un système permettant l'injection d'effecteurs directement dans des cellules cibles, aussi bien procaryotes qu'eucaryotes. Ainsi, l'expression du H2-T6SS n'est peut-être pas aussi forte en culture planctonique qu'en conditions d'infection, où les cellules cibles sont présentes et induisent l'expression du système. De ce fait, nous avons essayé de mesurer une éventuelle accumulation de PvdI d'une part dans des cellules épithéliales dans le cadre d'un système d'infection et d'autre part dans des cellules d'*E. coli* lorsque les deux espèces bactériennes sont incubées ensemble.

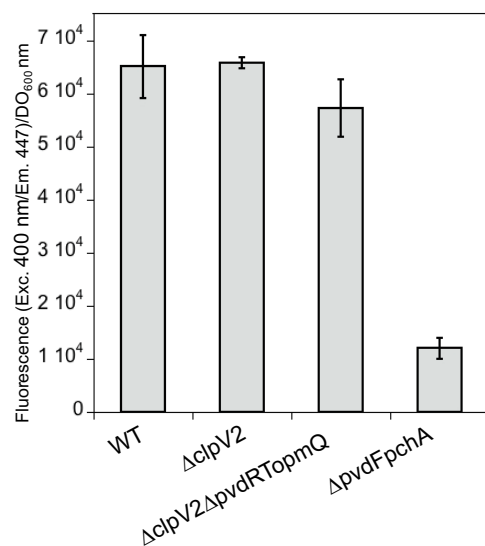
##### **1. Test d'infection avec les cellules épithéliales A549**

Les tests d'infection que nous utilisons au laboratoire sont réalisés avec la lignée cellulaire épithéliales humaine de carcinome pulmonaire A549. Ces cellules sont notamment sélectionnées car elles ont les mêmes caractéristiques morphologiques et biochimiques que les pneumocytes de poumons humains non endommagés. Ces cellules A549 ont été infectées par les souches de *P. aeruginosa* PAO1,  $\Delta clpV2$ ,  $\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$  ainsi que la souche non productrice de sidérophores  $\Delta pvdFpchA$ . Les bactéries ont été cultivées au préalable en milieu carencées en fer (CAA), récupérées en phase exponentielle de croissance et incubées en présence des cellules A549 (*Multiplicity Of Infection* de 50) en milieu RPMI. Après 3 h d'infection à 37°C sous 5 % CO<sub>2</sub>, les cellules eucaryotes ont été récupérées par centrifugation à très basse vitesse, et la fluorescence mesurée à 447 nm (excitation à 400 nm) (**Figure n°56**). Il est intéressant de remarquer qu'une forte fluorescence est associée aux cellules épithéliales en présence de bactéries produisant de la PvdI (PAO1,  $\Delta clpV2$  et  $\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$ ). Cette fluorescence est absente lorsque les cellules eucaryotes sont en présence de bactéries non productrices de PvdI ( $\Delta pvdF\Delta pchA$ ). Ce résultat permet de conclure que la fluorescence observée et associée aux cellules A549 est effectivement liée à la production de PvdI.

Il est cependant impossible dans nos conditions expérimentales de distinguer la provenance de cette fluorescence. En effet, les observations pourraient provenir de molécules de PvdI associées aux membranes des cellules épithéliales ou ayant directement pénétré dans ces cellules. De plus la fluorescence pourrait être corrélée également à la présence de bactéries productrices de PvdI liées aux cellules épithéliales.

Cette fluorescence n'est pas diminuée en présence de bactéries dont le gène *clpV2* a été délété, indiquant qu'elle n'est pas le résultat d'une injection de PvdI par le H2-T6SS dans les cellules A549. En revanche, la délétion de la pompe *pvdRTopmQ* affecte légèrement cette fluorescence (baisse de 12 %). Sachant que des bactéries mutées pour la pompe *pvdRTopmQ* sont nettement plus fluorescentes que les bactéries PAO1 (**Figure n°54**), l'absence d'augmentation de fluorescence des cellules A549 en présence de  $\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$

indique que cette fluorescence associée aux cellules A549 est au moins partiellement due à de la PvdI sécrétée. En effet, une variation de fluorescence qui serait la conséquence de bactéries associées aux cellules épithéliales aurait dû donner une augmentation de fluorescence pour un mutant de la pompe *pvdRTopmQ*. Cette baisse de fluorescence indique que la fluorescence associée aux cellules A549 est corrélée à la PvdI sécrétée partiellement par PvdRTOpMq, mais que d'autres systèmes de sécrétion interviennent aussi.



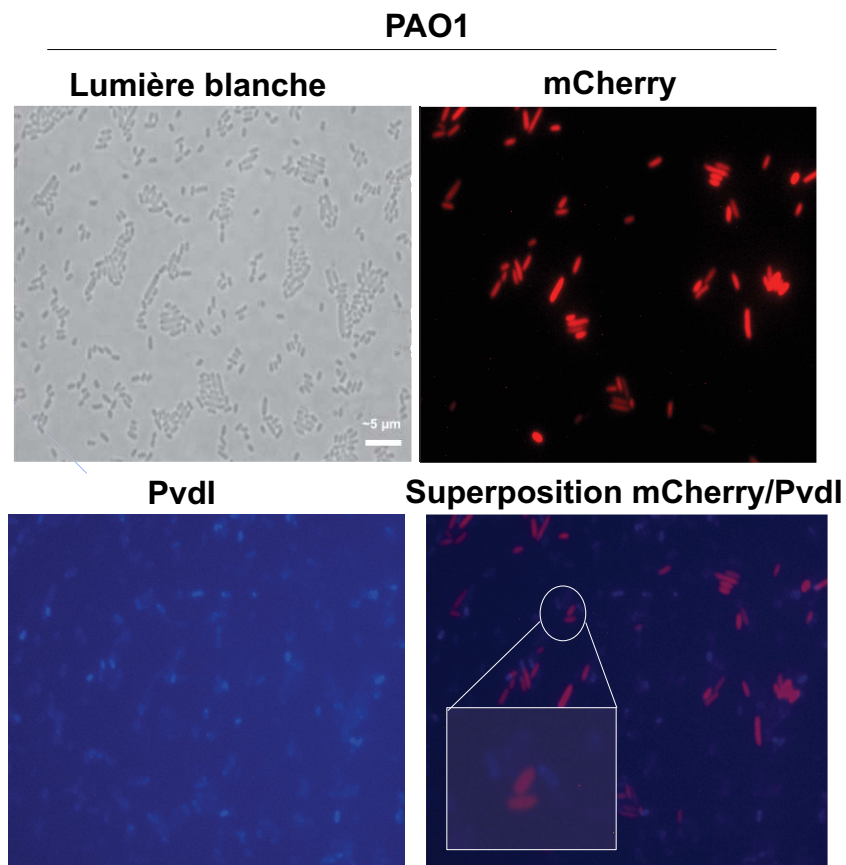
**Figure n°56 : Fluorescence associée aux cellules A549 après infection par des mutants de *P. aeruginosa*.** Les cellules de *P. aeruginosa* (PAO1,  $\Delta clpV2$ ,  $\Delta clpV2\Delta pvdRTopmQ$  et  $\Delta pvdFpchA$ ) ont été cultivées en milieu CAA jusqu'à OD à 600 nm de 0,4 - 0,6. Les suspensions bactériennes à  $5 \times 10^6$  CFU sont ensuite incubées avec les cellules A549 durant 3 h à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite lavées et centrifugées à basse vitesse. Les culots de cellules épithéliales sont récupérés et repris dans du PBS. La fluorescence est ensuite mesurée en lecteur de microplaques à 447 nm (excitation à 400 nm). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type des moyennes (n = 3).

## 2. *P. aeruginosa* incubée avec des cellules d'*E. coli*

Nous avons également essayé de voir, lorsque *P. aeruginosa* PAO1 était en présence d'*E. coli*, si de la fluorescence liée à la PvdI s'accumulait dans cette dernière. Afin de pouvoir distinguer les cellules d'*E. coli* de celles de *P. aeruginosa*, nous avons utilisé une souche d'*E. coli* exprimant à partir d'un plasmide la protéine mCherry de manière constitutionnelle (*E. coli*-mCherry). L'émission de fluorescence de la PvdI à 447 nm ne devrait pas être masquée car le maximum d'émission de fluorescence de la protéine mCherry est à 610 nm. Les souches de *P. aeruginosa* ont été cultivées dans du milieu CAA, et la souche d'*E. coli* dans le milieu CAA additionné de glycérol afin d'améliorer sa croissance. Les cellules de *P. aeruginosa* et *E. coli*-mCherry ont ensuite été mélangées pendant 30 minutes pour permettre le contact entre les deux espèces bactériennes. Le mélange a été déposé sur lame d'agarose et analysé en microscopie de fluorescence (Figure n°56). La localisation des cellules d'*E. coli* a été visualisée avec un filtre TRITC-A (Excitation 543 nm / Emission 569.5-730 nm). Afin de bien

visualiser la fluorescence de la PvdI dans la souche PAO1 qui est très peu visible car il y a peu d'accumulation de la PvdI (voir [Figure n°54](#)), le contraste de l'image a été retouchée via le logiciel imageJ ce qui rend le fond de l'image très bleutée avec une moins bonne qualité ([Figure n°56](#))

Lorsque les deux images sont superposées, nous n'avons pas observé de colocalisation évidente de fluorescence liée à la PvdI et de fluorescence liée à la présence d'une souche d'*E. coli* (hormis certaines cellules de *P. aeruginosa* et d'*E. coli* qui se chevauchent à certains endroits). Soit aucune PvdI n'est injectée dans les cellules d'*E. coli* soit la quantité injectée ne permet pas de la visualiser par cette approche de microscopie de fluorescence. En conséquence, nous n'avons pas pu vérifier si le H2-T6SS pouvait injecter de la PvdI dans les cellules d'*E. coli*. Pour suivre un tel mécanisme biologique il aurait fallu travailler en système micro fluidique et en microscopie de fluorescence à haute résolution. Mais même dans ces conditions, il faudrait qu'une quantité suffisante de PvdI soit injectée dans les cellules d'*E. coli* pour être visualisée.



**Figure n°56 : *P. aeruginosa* PAO1 incubé en présence d'*E. coli*-mCherry.** Les cellules de *P. aeruginosa* ont été cultivées en CAA à 37°C et les cellules d'*E. coli*-mCherry en CAA en présence de 5 % de glycérol à 37°C. Après une culture sur la nuit, les cellules sont lavées, reprises dans du milieu frais à DO à 600 nm comprise entre 18-22. Un volume égal de suspension des deux bactéries a été récupéré et mélangé. Le mélange est incubé à température ambiante, sans agitation, pour éviter de perturber les contacts entre cellules. Après 30 min, 5  $\mu$ l de mélange sont déposés sur lame de CAA-Agarose et observés au grossissement X100 sur le microscope Nikon 50i (Objectif : CFI Achromplan

100x). Le filtre d'excitation de la fluorescence BV-2A (Excitation 400- 440 nm) a été utilisé pour visualiser la fluorescence liée à l'apo-PvdI. Le filtre TRITC-A (Excitation 543 nm / émission 593 ± 40 nm) a été appliqué pour visualiser la fluorescence liée à la protéine mCherry. La superposition des images a été réalisée avec le logiciel ImageJ. La barre blanche représente (environ) 5 µm sur les images.

### III) Conclusions et perspectives

Les différentes manipulations réalisées afin de tester la sécrétion de PvdI par le H2-T6SS de *P. aeruginosa* n'ont malheureusement pas été concluantes dans nos conditions expérimentales.

Nous avons identifié la protéine lcmF2 comme un potentiel partenaire de la réductase FpvG par criblage en double hybride bactérien d'une banque d'ADN génomique de *P. aeruginosa*. L'interaction entre lcmF2 et FpvG n'a pas pu être validée malgré plusieurs tentatives. L'absence d'interaction lorsque nous co-exprimons FpvG et la partie périplasmique de lcmF2 peut avoir deux explications. La première étant que FpvG interagit bien avec lcmF2 mais pas par le domaine périplasmique de cette dernière. L'autre possibilité est une absence totale d'interaction entre ces deux protéines. En effet, une interaction détectée en double hybride n'implique pas toujours que cette interaction existe dans la cellule *in vivo*. Le résultat obtenu en double hybride bactérien entre FpvG et lcmF2 est peut-être un faux positif.

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenu sur l'impact de la délétion de *clpV2* sur la sécrétion de la PvdI nouvellement synthétisée et le recyclage de la PvdI ayant transporté du fer dans les cellules de *P. aeruginosa* n'ont pas permis de conclure quant à l'implication du H2-T6SS dans la sécrétion de la PvdI. L'absence de *clpV2* n'entraîne pas moins de recyclage ou de sécrétion de PvdI, ce qui nous indique que le H2-T6SS ne semble pas impliqué dans ce mécanisme.

Nous avons également évalué la sécrétion de la PvdI directement dans des cellules eucaryotes ou procaryotes mais sans plus de succès. Aucun effet dû à la délétion du gène *clpV2* n'a été visualisé avec les cellules A549. Dans nos conditions, le H2-T6SS ne joue pas non plus de rôle dans la sécrétion du sidérophore dans les cellules A549. La translocation de PvdI dans un organisme eucaryote a déjà été visualisée chez le modèle *Caenorhabditis elegans* (Kang *et al.*, 2018; Kirienko *et al.*, 2015). Cependant, aucune information sur la sécrétion n'est donnée car les expériences sont réalisées directement avec de la PvdI purifiée. Il est donc intéressant de savoir que la PvdI peut être sécrétée directement dans des cellules cibles.

Concernant les cellules d'*E. coli*, à ce jour et à ma connaissance, aucun résultat de translocation de PvdI dans des cellules d'*E. coli* n'a été reporté dans la littérature. Ce mécanisme pourrait tout simplement ne pas se produire. Par ailleurs, la méthode employée

en imagerie de fluorescence manque clairement de sensibilité et la quantité de PvdI injectée par H2-T6SS dans les cellules d'*E. coli* pourrait être bien trop faible pour être visualisée. Notre microscope n'a également pas la sensibilité nécessaire pour ce genre d'expérience. L'ensemble de ces données amènent à la conclusion que le H2-T6SS ne joue pas de rôle dans la sécrétion de la PvdI.

Un élément important à souligner est qu'il nous a été impossible de vérifier l'absence totale d'activité du H2-T6SS dans les différents mutant où *clpV2* a été délété. Pour cela, il aurait fallu vérifier l'absence de sécrétion des effecteurs du H2-T6SS comme PldA, PldB ou encore VgrG2b chez les mutants pour *clpV2* (Sana *et al.*, 2015; Wettstadt *et al.*, 2019). L'activité du H2-T6SS aurait pu également être contrôlée en vérifiant l'absence d'expression de Hcp2 dans le surnageant. Nous ne possédions malheureusement pas les anticorps adéquats afin de vérifier ce point. La régulation de l'expression des T6SS chez *P. aeruginosa* est complexe et n'est pas encore totalement comprise à ce jour. Il apparaît que la protéine régulatrice RsmA est un régulateur négatif des trois T6SSs tandis qu'un autre régulateur AmrZ régule de manière positive le H1-T6SS et le H3-T6SS et négativement le H2-T6SS (Allsopp *et al.*, 2017). Ainsi, il aurait peut-être été intéressant de travailler dans un mutant  $\Delta rsmA$  afin de lever la répression et pouvoir comparer la sécrétion de la PvdI chez un mutant  $\Delta rsmA$  et  $\Delta rsmA\Delta clpV2$  ; quand bien même différentes données présentes dans la littérature sur le H2-T6SS ont été obtenues avec des souches simplement délétées de *clpV2*.

Une étude plus récente a fait part de l'importance des conditions de culture utilisées en laboratoire dans la régulation par le fer du H2-T6SS (Brewer *et al.*, 2019). Nous incubons classiquement les bactéries à une température donnée dans un milieu oxygéné sous agitation, ce qui n'est pas forcément représentatif des conditions d'infections. L'étude de Brewer *et al.* a non seulement démontré que la réponse au fer de l'expression du H2-T6SS était médiée par les petits ARN PrrF mais a également montré que cet effet était promu dans des conditions de croissance sessile, sans agitation. Ces données sont cohérentes avec l'observation d'une induction des T6SSs en conditions de biofilm. Ainsi, afin de montrer la sécrétion du sidérophore PvdI par ce système de sécrétion, il serait intéressant de revoir la sécrétion de la PvdI dans un système de culture en biofilm.

D'après la littérature le H3-T6SS semble impliqué dans la sécrétion de la PvdI (Lin *et al.*, 2015), mais n'est probablement pas le seul en plus de PvdRT-OpmQ (Hannauer *et al.*, 2010b). D'autres systèmes sont potentiellement aussi impliqués et certains de ces systèmes doivent permettre l'injection directement dans des cellules cibles. La perspective directe de ces expériences est de construire une souche délétée de *clpV3* et de regarder la sécrétion de

PvdI. Il sera important de cumuler les délétions et de construire une souche où les trois T6SSs de *P. aeruginosa* sont délétés. Par ailleurs, les interactions de FpvG avec PA1316 et PA1519, deux protéines annotées comme transporteurs probables et prédites pour être localisées sur la membrane interne, représentent également une piste à envisager afin d'identifier des nouveaux transporteurs de la PvdI. Le rôle de ces deux protéines, ainsi que leur implication dans des mécanismes physiologiques de la cellule sont encore inconnus.

**Partie III :**  
**Conclusion générale**

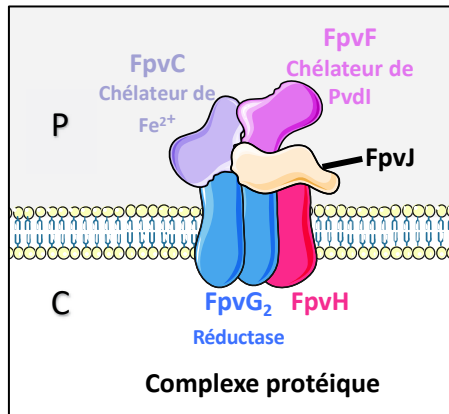
L'import du fer par le sidérophore PvdI est la voie d'assimilation du fer chez *P. aeruginosa* qui a été le plus étudiée. Bien que de nombreuses questions subsistent, c'est aussi la voie dont on connaît le mieux les mécanismes moléculaires impliqués. De manière générale, la plupart des protéines impliquées dans l'import du fer par la PvdI ont été identifiées, ce qui n'est pas le cas de la voie Pch ou des voies utilisant des sidérophores exogènes. La voie PvdI implique un grand nombre de gènes, certains impliqués dans la biosynthèse du sidérophore, d'autres dans l'import du fer par le sidérophore et d'autres, moins nombreux, dans la régulation. Aucune autre voie d'acquisition du fer chez des bactéries connue à ce jour n'implique autant de gènes.

Durant cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans la dissociation du fer de la PvdI dans le périplasme de *P. aeruginosa*. Ce mécanisme a été principalement étudié dans notre équipe et les premières études remontent à 2002. Notre équipe avait mis en évidence que ce processus n'impliquait aucune modification chimique du sidérophore et que la PvdI était recyclée afin d'entamer un nouveau cycle de transport du fer (Schalk *et al.*, 2002). En 2007, l'équipe a montré qu'une réduction du fer était impliquée dans ce processus de dissociation localisé dans le périplasme de *P. aeruginosa* (Greenwald *et al.*, 2007). L'identification des différents acteurs protéiques participant à ce mécanisme est plus récente. D'abord une première étude du laboratoire a montré que le transporteur ABC composé de la perméase FpvD, de l'ATPase FpvE et des deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF, est impliqué dans ce processus (Brillet *et al.*, 2012). Dans cette même étude, il a été démontré que les deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF interagissent ensemble et sont capables de fixer le complexe PvdI-Fe après sa translocation à travers la membrane externe (Brillet *et al.*, 2012). Une étude structurale plus récente a montré que FpvC est un chélateur du fer ferreux et la structure du complexe FpvC-Fe<sup>2+</sup> a été résolue (Vigouroux *et al.*, 2020). D'autres acteurs, FpvGHJK, ont été identifiés encore plus récemment (Ganne *et al.*, 2017). La protéine FpvG a été identifiée comme étant la réductase du fer permettant sa dissociation du sidérophore et les protéines FpvHJK, de fonctions inconnues, ont montré également un rôle dans ce processus.

Pour mieux comprendre le rôle de toutes ces protéines durant la dissociation du fer de la PvdI, nous avons entrepris durant cette thèse une étude des interactions protéiques utilisant le double hybride bactérien. Cette approche a permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe composé des deux protéines membranaires FpvG et FpvH et de trois protéines périplasmiques FpvJ, FpvF et FpvC (**Figure n°58**). C'est la première fois qu'un tel complexe faisant intervenir des protéines membranaires et périplasmiques et impliqué dans un mécanisme de dissociation de fer d'un sidérophore est décrit chez une bactérie. Ce complexe a au minimum une taille de 138,8 KDa (théorique) si seulement une copie de chaque protéine



y est présente. Mais on sait que le complexe FpvC-FpvF peut se trouver aussi sous la forme d'un tétramère FpvC<sub>2</sub>-FpvF<sub>2</sub> avec un dimère pour chaque protéine (Brillet *et al.*, 2012). De plus nous avons aussi montré durant cette thèse que FpvG dimérise ou même mutimérise. Il y a donc de fortes chances que ce complexe soit de taille plus importante si certaines protéines sont présentes en plusieurs copies. Ce complexe doit exister chez d'autres *Pseudomonas* fluorescents vu que ces protéines sont conservées.



**Figure n°58 : Représentation du complexe identifié entre les protéines FpvGHJFC.** C'est au sein de ce complexe que se fait la réduction du fer et le transfert du fer de la PvdI sur FpvC. La PvdI se lie ou reste liée à FpvF. P : périplasma, C : cytoplasme.

Un aspect qui n'a pas pu être étudié au cours de cette thèse est le rôle exact de FpvH, FpvJ et FpvK. L'étude de la protéine FpvK s'est avérée compliquée car nous avons tenté à plusieurs reprises de la cloner et de la surexprimer dans *E. coli*, sans succès. De plus, nous n'avons pas réussi à identifier les partenaires protéiques de FpvK par double hybride bactérien. Cette protéine interagit certainement avec le complexe FpvGHJCF mais nous n'avons pas réussi à le démontrer.

Nous avons réussi à exprimer FpvH et FpvJ chez *E. coli*. Ces protéines sont importantes pour une dissociation optimale du fer de la PvdI par FpvG (Ganne *et al.*, 2017), mais leur rôle exact reste inconnu. Ce rôle peut être fonctionnel ou structural au sein du complexe multi-protéique FpvGHJFC. L'étude de la fonction des protéines dont les séquences nucléotidiques ou peptidiques n'offrent pas d'indice reste un challenge. L'étude structurale de FpvG-FpvH est une perspective prometteuse afin d'avoir des informations sur le rôle de la protéine FpvH dans le mécanisme de dissociation du fer de la PvdI. Au cours de cette thèse, nous avons réussi à purifier la protéine FpvJ, mais nous n'avons pas encore pu aller plus loin dans l'étude de cette protéine. L'obtention de cette protéine purifiée semble être un bon départ pour l'étude de son rôle, de sa capacité à lier des cofacteurs ou à lier le Fe<sup>2+</sup>. Des études structurales pourraient également être envisagées.

Au laboratoire, nous savons donc purifier le complexe FpvG-FpvH ainsi que les protéines FpvC, FpvF, FpvJ. Il serait intéressant d'essayer de reconstituer le complexe FpvGHJCF *in vitro* et d'étudier sa capacité à dissocier le fer de la PvdI. Si le complexe reconstitué est

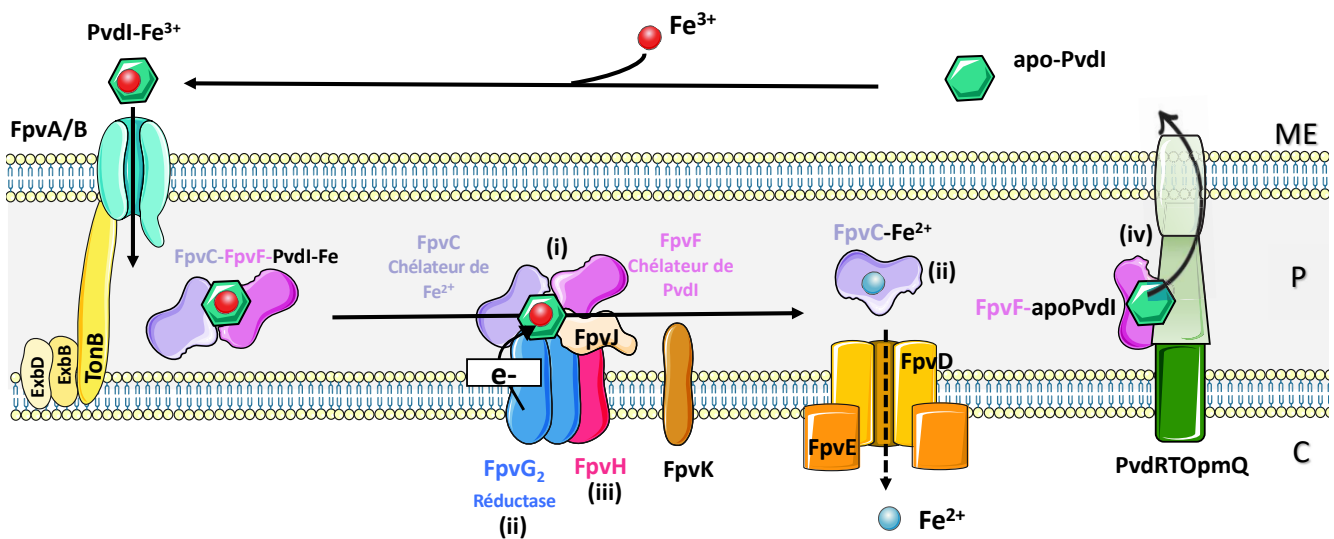
suffisamment stable et homogène, une étude structurale par microscopie électronique pourrait aussi être envisagée.

Les différents résultats obtenus au cours de ces travaux sur l'analyse des interactions protéiques et de la dissociation de PvdI-Fe nous permettent d'affiner le modèle de dissociation du fer de la PvdI (**Figure n°59**) :

- (i) Un complexe ancré dans la membrane interne se forme entre les protéines FpvC/FpvF/FpvG/FpvH/FpvJ en présence ou absence de PvdI-Fe. Les interactions protéiques entre FpvC, FpvF et FpvG permettent probablement une orientation et une conformation optimale de PvdI-Fe pour la réduction par FpvG. La formation de ce complexe protéique doit empêcher également que PvdI-Fe diffuse librement dans le périplasme. A ce stade, on ne sait finalement pas quelle est la première protéine impliquée dans la fixation de PvdI-Fe après son import dans le périplasme par les transporteurs de membrane externe FpvA et FpvB. Il n'est pas clair également si la PvdI-ferrique au sein de ce complexe se lie directement à FpvG. Si c'est le cas, il est nécessaire d'identifier les sites de liaison de  $Fe^{2+}$  ou de PvdI-Fe sur FpvG. On peut également imaginer que le complexe PvdI-Fe est plutôt associé aux protéines FpvF-FpvC dans le périplasme bactérien en attendant d'interagir avec la réductase FpvG pour la réduction du fer (modèle proposé avant ces travaux).
- (ii) FpvG est une hémoprotéine possédant au moins une molécule d'hème, qui permet probablement l'apport d'électrons nécessaires à la réduction du  $Fe^{3+}$  lié à la PvdI pour la dissociation. La protéine FpvC chélaterait ensuite via 6 résidus d'histidine le  $Fe^{2+}$  généré (Vigouroux *et al.*, 2020). Quatre résidus d'histidine conservés ont également été identifiés chez FpvG. La mutation des quatre résidus d'histidine abolit l'activité de FpvG. Il serait important de vérifier l'importance de chacune de ces histidines indépendamment. Au moins deux de ces quatre résidus, et peut être les quatre, sont probablement responsables de la fixation d'une ou deux molécules d'hème sur FpvG. On peut également imaginer que deux des histidines sont impliquées dans la liaison d'une molécule d'hème et les deux autres dans la liaison du complexe PvdI-Fe.
- (iii) Les protéines FpvJ et FpvH pourraient jouer un rôle dans la stabilisation du complexe FpvGHJFC et intervenir dans le transfert de  $Fe^{2+}$  sur FpvC et de l'apo-PvdI sur FpvF. Ces protéines pourraient autrement être impliquées dans la fixation de cofacteurs de type NAD ou NADP, nécessaires pour le transfert d'électrons.
- (iv) La protéine périplasmique FpvF, capable de lier la PvdI-Fe et l'apo PvdI, interagit avec la protéine PvdT appartenant à la pompe d'efflux PvdRTOpMq. FpvF

participe donc activement au recyclage de l'apo-PvdI. Le mécanisme de transfert de la PvdI depuis la protéine FpvF jusqu'à la pompe à efflux PvdRTOpmQ est à déterminer.

- (v) *P. aeruginosa* encode dans son génome d'autres probables réductases homologues à FpvG et ayant des résidus d'histidine conservés. Cela est encourageant pour l'identification des réductases impliquées dans la dissociation des autres complexes sidérophores-fer.



**Figure n°59 : Modèle simplifié d'import et de dissociation du complexe PvdI-Fe proposé.** Le texte ci-dessus résume les différentes étapes dissociées par points (i), (ii), (iii) et (iv). P : périplasma, C : cytoplasme, ME : milieu extracellulaire.

Durant cette thèse, la sécrétion de PvdI a aussi été étudiée dans le but de découvrir de nouveaux systèmes protéiques impliqués dans l'excrétion de ce sidérophore. Notre étude s'est focalisée sur le H2-T6SS suite au criblage d'interactions avec FpvG qui a révélé que la protéine lcmF2, appartenant au H2-T6SS, était un potentiel partenaire de cette réductase. Par différentes approches nous avons étudié cette possible implication du H2-T6SS dans la sécrétion de la PvdI mais sans succès. Toutes les études réalisées durant cette thèse ou précédemment démontrent que d'autres systèmes que la pompe à efflux PvdRTOpmQ sont impliqués dans la sécrétion de la PvdI. Il serait intéressant de vérifier si le H1 et H3-T6SS et les deux transporteurs codés par les gènes PA1316 et PA1519 qui interagissent avec FpvG sont impliqués. Par ailleurs, *P. aeruginosa* possède dans son génome de nombreux gènes codant pour des systèmes à efflux qui pourraient potentiellement prendre le relais lorsque PvdRTOpmQ est absent. L'identification de ces autres systèmes d'efflux reste compliquée car il faudrait successivement déléter les gènes d'intérêts avec le risque que toutes ces délétions deviennent létales pour la bactérie.

En conclusion, les données obtenues durant cette thèse ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dissociation du fer de la PvdI dans le périplasme de *P. aeruginosa*. C'est un processus enzymatique très complexe, original et impliquant un complexe protéique membranaire jamais décrit précédemment. Caractériser ce complexe enzymatique reste un challenge puisque comprendre son fonctionnement impliquera une collaboration interdisciplinaire avec différents acteurs ayant des compétences en biologie structurale, en enzymologie, en biochimie des protéines, etc. Mieux connaître le mécanisme d'import du fer de la PvdI sera également essentiel pour mieux comprendre la virulence de cette bactérie.

**Partie IV :**  
**Matériels et Méthodes**

## I) Milieux de culture et conditions de culture

### a. Milieux pour culture bactérienne

#### 1. Composition des milieux de culture et antibiotiques utilisés

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu riche Lysogeny Broth (LB) dont la composition est de 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl (AthenaES™). La culture se fait à 37 °C sous agitation (220 rpm). Si nécessaire, des antibiotiques sont rajoutés au milieu de culture pour le maintien des plasmides. Les solutions stocks d'antibiotiques sont préparées dans l'eau à 100 mg/mL pour l'ampicilline (Euromedex), à 50 mg/mL pour la kanamycine (Sigma), à 15 mg/mL pour la gentamicine (Euromedex), dans de l'éthanol à 100 mg/mL pour le chloramphénicol (Sigma) et dans 50% v/v d'éthanol à 50 mg/mL pour la tétracycline (Sigma).

Les souches de *P. aeruginosa* sont cultivées également en LB à 30°C. Pour carencer les cellules en fer (**Tableau n°10**) le milieu CAA est utilisé. Ce milieu est composé de 5 g/L de Bacto casamino acid, 1,46 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.25 g/L de MgSO<sub>4</sub>.

#### 2. Carencer en fer des souches de *P. aeruginosa*

Pour carencer les cellules de *P. aeruginosa* en fer, notamment pour les expériences de dissociation du fer de la PvdI *in vivo*, de suivi de sécrétion de PvdI, de recyclage de la PvdI et de fractionnement cellulaire, les bactéries sont d'abord cultivées pendant 24 h dans 5 mL de LB à 30°C ou 37°C (selon l'expérience) à partir d'un stock glycérol conservé à -80°C. Les bactéries sont ensuite lavées avec 10mL de milieu CAA, reprises dans du milieu CAA et cultivées à 30°C ou 37°C de nouveau sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont ensemencées à une DO à 600 nm de 0,1 dans du milieu CAA et cultivées à 30°C ou 37°C et utilisées pour effectuer les différentes mesures de l'expérience.

**Tableau n°10 : Concentrations en fer mesurées dans les milieux utilisés pour les expériences :**

Milieu	Concentration en fer	Ref
LB : Milieu riche	5 µM	(Cunrath <i>et al.</i> , 2016)
CAA : Milieu carencé	20 nM	(Cunrath <i>et al.</i> , 2016)

### b. Milieu pour cellules eucaryotes

Le milieu utilisé pour la culture des cellules A549 est le milieu RPMI 1640 (Gibco). Ce milieu est complémenté à 10 % v/v en sérum FBS (Fetal Bovine Serum).

### **c. Suivi de la croissance cellulaire**

Afin de suivre la croissance des différents mutants obtenus, les bactéries sont carencées en fer sauf si le suivi s'effectue en milieu LB. Les cellules sont ensuite diluées à  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,01 dans du milieu neuf, puis déposées dans une plaque 96 puits. Selon les besoins de l'expérience, le complexe PvdI-Fe peut être rajouté dans les puits. La plaque est incubée dans le lecteur microplaques (Infinite M200, TECAN) sous légère agitation à 30 °C. La  $DO_{600\text{ nm}}$  ainsi que l'absorbance à 400 nm sont mesurées toutes les 30 min pendant 24 h.

## **II) Suivi et mesures de fluorescence**

Ce paragraphe décrit les différentes méthodes où nous avons utilisés les propriétés spectrales de l'apo-PvdI.

### **a. Sécrétion de PvdI dans le surnageant cellulaire**

Les souches sont cultivées comme décrit en **I) Milieux de culture** afin de les carencer en fer. Au temps prévu de la mesure, la  $DO_{600\text{ nm}}$  des souches est mesurée, puis les bactéries sont centrifugées à 8500 rpm pendant 3 min. Le surnageant est récupéré, filtré avec des filtres 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex-GP) afin d'enlever toutes traces de cellules bactériennes. La fluorescence du surnageant est mesurée en plaque 96 puits au lecteur de microplaques (Infinite M200, TECAN, Excitation 400nm, Émission 447 nm).

### **b. Mesure de la fluorescence liée à la PvdI dans le cytoplasme et périplasme de cellules de *P. aeruginosa***

Les cellules de *P. aeruginosa* sont cultivées comme décrit dans la partie **I) Milieux de culture** afin de les carencer en fer. Après culture, les cellules sont culotées et le culot est lavé une fois avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 puis est repris dans 550  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-Sucrose EDTA (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, Sucrose 20 %, 1mM EDTA). Les cellules sont traitées avec 1 mg/ml de lysozyme pendant une heure sur glace puis centrifugées pendant 10 min à 4 °C (accélération 5, décélération 5). Le surnageant (correspondant au périplasme) est récupéré et ultracentrifugé pendant 40 min à 40000 rpm et à 4°C afin d'éliminer toute contamination de débris membranaires, puis est conservé à 4°C. Les sphéroplastes sont lavés une fois avec 500  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-Sucrose (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, Sucrose 20 %) sans être resuspendus puis sont repris dans 1 ml d'eau glacée et traités avec 1  $\mu\text{l}$  de benzonase (Sigma, 250U/  $\mu\text{l}$ ) pendant une heure à 37 °C sous agitation (350 rpm). La suspension est ultracentrifugée pendant 40 min à 40000 rpm à 4 °C. Le surnageant obtenu correspond au cytoplasme. Les différentes fractions (cytoplasme et périplasme) sont incubées dans une plaque 96 puits et la

fluorescence de la PvdI est mesurée au lecteur de microplaques (Infinite M200, TECAN, Excitation 400nm, Émission 447 nm).

#### **c. Suivi du recyclage de la PvdI dans le surnageant cellulaire**

Les cellules de *Pseudomonas* sont cultivées comme décrit dans la partie I) **Milieux de culture**, afin de les carencer en fer. Après 24 h de culture au deuxième passage en CAA, les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 8500 rpm, lavées à deux reprises dans 5 ml de tampon Tris-HCl 50mM, pH 8,0 puis reprise dans 1 ml de ce même tampon. La  $DO_{600\text{ nm}}$  est ajustée à 1. Les cellules sont placées à 30 °C et incubées avec du complexe PvdI-Fe à une concentration finale de 1  $\mu\text{M}$ . 200  $\mu\text{l}$  de la suspension cellulaire sont récupérés à différents temps, centrifugés pendant 5 min à 8500 rpm et 150  $\mu\text{l}$  du surnageant est déposé en plaque 96 puits pour mesurer la fluorescence de la pyoverdine dans le lecteur de plaque (Infinite M200, TECAN, Excitation 400nm, Émission 447 nm).

#### **d. Suivi de la dissociation de PvdI-Fe *in vitro***

Pour suivre la dissociation du complexe PvdI-Fe *in vitro*, nous avons utilisés des membranes bactériennes totales à partir de souches surexprimant FpvG<sup>His6</sup>, FpvH<sup>Strep</sup> ou les deux protéines en complexe. Nous avons repris le protocole établi par (Ganne *et al.*, 2017) en modifiant quelques détails. 500 mL d'une culture de la souche TOP10 d'*E. coli* produisant la ou les protéine(s) d'intérêt(s) sont récupérés par centrifugation pendant 10 min à 5500 rpm et reprises dans 50 mM Tris pH 8,0 50 mM NaCl. Les cellules sont ensuite lysées par sonication puis centrifugées à basse vitesse (12000 g, 15 min, 4 °C) pour séparer le surnageant des débris cellulaires. Le surnageant est ultracentrifugé à 40000 rpm pendant 40min à 4°C. Le culot, comprenant les membranes totales, est repris dans 1 mL de tampon acétate ammonium 100 mM, pH 6,5. La concentration en protéines est mesurée par la méthode BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay Kit.

Les expériences de dissociation sont ensuite réalisées dans un volume total de 200  $\mu\text{L}$  en microplaque dans un tampon 100 mM d'acétate ammonium pH 6,5 et en présence de 20  $\mu\text{M}$  de PvdI-Fe. La dissociation est suivie en absence ou présence de 100  $\mu\text{g}$  de membranes bactériennes. Le témoin positif consiste à incuber le complexe PvdI-Fe avec 100 mM du réducteur DTT, et 20  $\mu\text{M}$  de ferrozine (chélateur de fer ferreux). La fluorescence est mesurée au lecteur de microplaques (Infinite M200, TECAN) à 30°C avec une excitation à 400 nm et une mesure de l'émission à 447 nm, à intervalle de 5 minutes pendant la durée de l'expérience.

#### **e. Suivi de la dissociation de PvdI-Fe *in vivo***



Pour les expériences de dissociation *in vivo*, les cellules de *P. aeruginosa* ont été cultivées en CAA comme décrit dans le paragraphe **I) Milieux de culture**. Les cellules sont récupérées, lavées avec deux volumes de 50 mM Tris pH 8.0 et resuspendues dans du tampon 50 mM Tris pH 8.0 à une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,4. Ensuite, 150  $\mu\text{l}$  de la suspension sont déposés dans des plaques 96 puits, puis incubés avec 120 nM de PvdI-Fe. La fluorescence est mesurée au lecteur de microplaques (Infinite M200, TECAN) à 30°C avec une excitation à 400 nm et une mesure de l'émission à 447 nm, à intervalle de 5 minutes pendant la durée de l'expérience.

#### **f. Test d'infection des cellules eucaryotes**

Les cellules eucaryotes A549 sont préparées la veille de l'infection à une densité cellulaire de  $1 \times 10^6$  cellules par boîte de 10 cm de diamètre dans le milieu RPMI contenant 10% (v/v) de Fetal Bovine Serum à 37 °C sous 5 % de  $\text{CO}_2$ . Les cellules de *P. aeruginosa* sont cultivées en milieu CAA. Le jour de l'infection, les bactéries sont diluées à  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1 dans du milieu frais et incubées à 30 °C jusqu'à ce que la  $DO_{600\text{ nm}}$  soit entre 0,4 et 0,6, ce qui correspond à la phase exponentielle. Les cellules A549 sont alors infectées avec une *multiplicity of infection* (MOI) de 50, soit un volume de suspension bactérienne correspondant à  $50 \times 10^6$  CFU. La boîte est de nouveau incubée 3 h à 37 °C sous 5 %  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont ensuite récupérées en grattant le fond de la boîte, lavées avec du PBS 1X à 4 °C et centrifugées à très basse vitesse, 200 g, pendant 3 min à 4°C jusqu'à apparition d'un culot blanc. Le milieu est retiré délicatement à l'aide d'une pompe sous vide et le culot est repris dans 100  $\mu\text{l}$  de PBS 1X puis déposé dans une plaque 96 puits afin de lire l'absorbance à  $DO_{600\text{ nm}}$  et la fluorescence avec une excitation à 400 nm et une mesure de l'émission à 447 nm, au lecteur de microplaques (Infinite M200, TECAN).

### **III) Microscopie de fluorescence**

#### **a. Fluorescence des cellules de *P. aeruginosa***

Au centre des lames de microscopie sont déposés 5  $\mu\text{l}$  de milieu CAA chauffé contenant 1% d'agarose. La lame est ensuite recouverte par une deuxième lame. Lorsque l'agarose est solidifié, la seconde lame est enlevée délicatement et l'agarose est laissé quelques instants à sécher à température ambiante. Les cellules de *P. aeruginosa* sont préparées comme décrit dans la partie **I) Milieux de culture** et sont ensuite centrifugées, lavées deux fois avec du milieu carencé en fer et resuspendues de manière à obtenir une  $DO_{600\text{ nm}}$  comprise entre 18-22. 5  $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne sont ensuite déposées sur la lame de microscope recouverte d'agarose et une lamelle est déposée par-dessus.

#### **b. Test d'infection avec des cellules d'*E. coli*-mCherry**

Concernant les expériences avec *E. coli*-mCherry, ces dernières sont cultivées d'abord en LB à 37 °C pendant 24 h puis cultivés en milieu CAA contenant 5 % de glycérol sur la nuit à 37°C. Les cellules sont ensuite préparées comme *P. aeruginosa* et 50 µl de chaque solution bactérienne (*P. aeruginosa* et *E. coli*) sont mélangés dans un tube. Après 30 min, 5 µl du mélange de bactéries sont prélevés et déposés sur la lame. Les échantillons sont observés au microscope avec un grossissement de 100 x en lumière blanche ou en appliquant un filtre à fluorescence (observation de la PvdI avec le filtre BV-2A et de mCherry avec le filtre TRITC-A). Les images sont acquises sur un microscope Nikon 50i Objectif CFI Achromplan 100X équipé d'une caméra numérique 12 bits DS-Fi1. Les images sont prises via le logiciel *NIS elements* et certaines traitées avec le logiciel imageJ.

### **IV) Test de double hybride bactérien**

#### **a. Interactions entre protéines membranaires (protocole « milieu solide »)**

Les cellules DHM1 d'*E. coli* sont co-transformées avec les deux plasmides d'intérêt et étalées sur une boîte LB supplémentée en ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL). La boîte est incubée à 30 °C pendant une nuit. Le lendemain, 10 clones sont mis en culture dans 2 mL de LB supplémenté en isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.5 mM, Euromedex), ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL) et incubés à 30 °C pendant une nuit. Le lendemain, 5 µL de la pré-culture sont déposés sous forme de goutte sur boîtes LB-agar supplémenté en IPTG (0,5 mM), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal ; 40 µg/mL, Euromedex), ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL). Les boîtes sont incubées pendant une nuit à 30 °C.

#### **b. Interactions entre protéines périplasmiques (protocole « milieu liquide »)**

Les cellules DHM1 d'*E. coli* sont co-transformées avec les plasmides d'intérêt et étalées sur une boîte LB supplémentée en ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL). La boîte est incubée à 37 °C pendant une nuit. Le lendemain, 10 clones sont mis en culture dans 2 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL) et incubés à 37 °C pendant une nuit. 20 µL de la pré-culture sont ensuite dilués dans 2 mL de milieu LB supplémenté en IPTG (0,5 mM), ampicilline (100 µg/mL) et kanamycine (50 µg/mL) et incubés pendant une nuit à 30 °C. Le dosage de l'activité β-galactosidase se fait ensuite à partir de la culture en milieu liquide.

### c. Dosage de la $\beta$ -galactosidase

100  $\mu$ L de suspension bactérienne sont ajoutés à 900  $\mu$ L de tampon Z froid (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7, 0,2 %  $\beta$ -mercaptoéthanol). Le mélange est traité avec 1  $\mu$ L de dodécylsulfate de sodium (SDS) 0,1 % et 50  $\mu$ L de chloroforme puis est « vortexé » pendant 10 secondes. Le mélange est ensuite incubé 5 min à 28 °C. 200  $\mu$ L d'ONPG (Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside) à 4 mg/mL (préparé extemporanément dans du tampon Z sans  $\beta$ -mercaptoéthanol) sont ensuite ajoutés aux cellules. La réaction est arrêtée avec 500  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M lorsqu'une couleur jaune apparaît. Les tubes sont centrifugés 2 min à 14000 g et l'absorbance du surnageant est mesurée à 420 nm et 550 nm. L'activité  $\beta$ -galactosidase est ensuite exprimée en Unité Miller (MU) grâce à la formule ci-dessous :

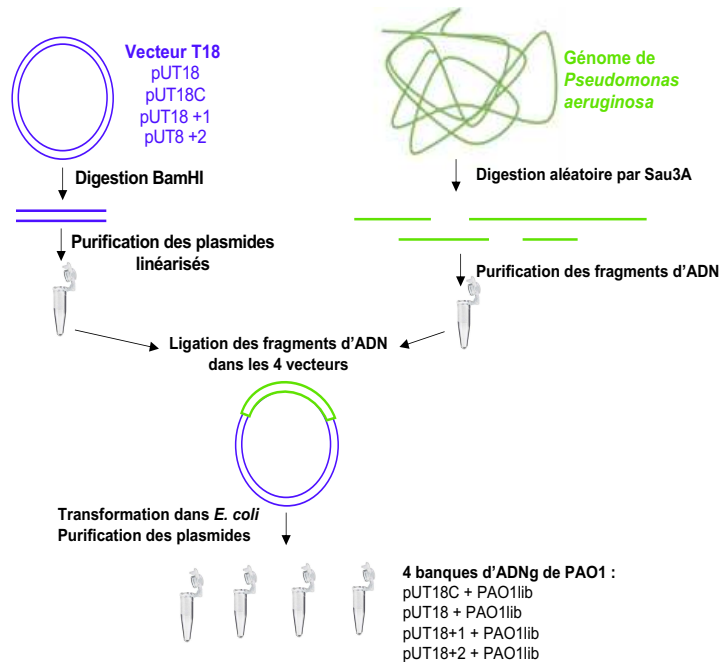
$$\text{MU} = \frac{1000 \times (\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{DO}_{550\text{nm}})}{\text{Temps (min)} \times \text{Volume (mL)} \times \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

Temps (min) = Temps d'incubation après l'ajout de l'ONPG jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune et Volume (mL) = volume de cellules diluées dans le tampon Z.

### d. Criblage de la banque d'ADN génomique de *P. aeruginosa* PAO1 par double hybride bactérien

100  $\mu$ L de cellules DHM1 d'*E. coli* préalablement transformées avec le plasmide d'intérêt (pKT25-FpvG ou pKNT25-FpvG) sont transformés avec 4  $\mu$ L de chaque banque construite dans les plasmides pUT18C, pUT18, pUT18+1 et pUT18+2 (Houot *et al.*, 2012). La [Figure n°60](#) présente le principe de la construction de la banque de *P. aeruginosa*. Les cultures sont étalées sur boîtes LB-agar supplémenté en ampicilline (100  $\mu$ g/mL), kanamycine (50  $\mu$ g/mL), IPTG (0,5 mM) et X-gal (40  $\mu$ g/mL) puis incubées à 30 °C pendant 24 ou 48 h. Les clones bleus sont sélectionnés et isolés deux fois sur boîtes LB-agar supplémentées en ampicilline (100  $\mu$ g/mL), kanamycine (50  $\mu$ g/mL), IPTG (0,5 mM) et X-gal (40  $\mu$ g/mL) pour confirmer la coloration bleue. Les colonies sont ensuite cultivées en LB en présence d'ampicilline à 37 °C pendant une nuit et les plasmides d'intérêt sont purifiés. Des cellules TOP10 d'*E. coli* sont ensuite transformées avec 1  $\mu$ L de plasmide (dilution 1/100) puis étalées sur boîtes LB-agar supplémenté en ampicilline (100  $\mu$ g/mL) afin de sélectionner uniquement le plasmide de la banque (résistant à l'ampicilline). Les transformants sont ensuite repiqués sur boîtes LB-agar avec de la kanamycine (50  $\mu$ g/mL) et sur boîtes LB-agar avec de l'ampicilline (100  $\mu$ g/mL). Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant une nuit. Seuls les clones ampicilline résistants et kanamycine sensibles sont sélectionnés dans le but d'isoler le plasmide de la banque uniquement. Chaque plasmide isolé est à nouveau testé pour l'interaction avec la protéine

d'intérêt en co-transformant les cellules DHM1 d'*E. coli* avec le plasmide portant le gène d'intérêt et le plasmide isolé de la banque. Les cellules sont étalées sur boîtes LB-agar supplémenté en ampicilline (100 µg/mL), kanamycine (50 µg/mL), IPTG (0,5 mM) et X-gal (40 µg/mL) et incubées à 30 °C pendant 24 ou 48 h. Si les transformants sont bleus, les plasmides de la banque sont envoyés ensuite au séquençage pour identifier la séquence du potentiel partenaire.



**Figure n°60 :** Construction de la banque d'ADN génomique. D'après Houot *et al.*, 2012.

## V) Expression, solubilisation, purification et étude structurale des protéines

### a. Test de production des protéines

Pour vérifier l'expression des protéines clonées dans les vecteurs d'expression, nous effectuons à chaque fois un criblage des conditions d'expression des protéines.

Pour cela, 2 mL de LB supplémenté avec les antibiotiques appropriés sontensemencés avec les cellules TOP10 ou DHM1 d'*E. coli* fraîchement transformées avec le plasmide d'intérêt. Les cellules sont incubées à 37 °C sur la nuit. Le lendemain, la suspension bactérienne est diluée à une  $DO_{600\text{nm}}$  de 0,05 dans 20 mL de LB avec antibiotique, puis incubée à 37 °C jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,5 (pour les inductions à 30 °C et 37 °C) ou jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,7 (pour l'induction à 22 °C). 3 mL de culture sont soit non induits, soit induits avec 0,01 % ou 0,1 % d'arabinose (vecteur pBAD) ou 0, 0,5 mM et 1 M d'IPTG (vecteurs pRSFDuet, pCDFDuet) pendant 4 h à 30 °C ou 37 °C, ou pendant 16 h à 22

°C, sous agitation. 1 mL de chaque condition de culture est ensuite centrifugé 5 min à 7000 g. Le culot est repris dans du tampon de Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25 % glycérol, 2 % SDS, 0.01 % bleu de bromophénol et 10 %  $\beta$ -mercaptoéthanol), puis chauffé à 95 °C pendant 10 min. Chaque culot est ensuite déposé sur gel SDS-PAGE pour être analysé par immunodétection.

### **b. Test de solubilisation**

Différents tests de solubilisation ont été testés pour extraire les protéines membranaires (FpvG, FpvH et IcmF2).

10 mL de LB supplémenté en antibiotiques sontensemencés avec les cellules TOP10 d'*E. coli* transformées avec le plasmide d'intérêt puis cultivés à 37 °C pendant une nuit. Le lendemain, la suspension bactérienne est diluée à une densité optique à 600 nm de 0,05 dans 400 mL de LB avec antibiotique puis incubée à 37 °C jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,5. La culture est ensuite induite avec 0,01 % d'arabinose pendant 4 h à 30 °C. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 5500 rpm à 4 °C pendant 15 min, puis le culot est resuspendu dans 50 mL de tampon Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, contenant une pastille anti-protéase (complete EDTA-free protease inhibitor, Roche). Les cellules sont ensuite lysées par sonication puis centrifugées (8500 rpm, 15 min, 4 °C) pour séparer le surnageant des débris cellulaires. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 40 000 rpm pendant 40 min à 4 °C. Les membranes bactériennes contenues dans le culot sont ensuite reprises dans 10 mL de tampon Tris 50 mM pH 8, 100 mM NaCl contenant soit 1 % DDM (n-Dodecyl  $\beta$ -D-maltoside, Anatrace), 2 %  $\beta$ -OG (Octyl-  $\beta$ -Glucoside, Anatrace) ou 1 % LDAO (N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide, Fluka), puis homogénéisées mécaniquement au Potter. Après 1 h d'incubation à température ambiante ou 16 h à 4°C sous agitation, les membranes sont culottées à 118 000 g pendant 40 min à 4 °C pour séparer les éléments solubilisés (surnageant) des éléments non solubilisés (culot). Une fraction de chaque compartiment est déposée sur gel SDS-PAGE 15 % pour FpvH, et 12 % pour FpvG et 10 % pour IcmF2 pour être ensuite analysée par immunodétection.

Les résultats, non présentés dans cette thèse pour simplifier, ont montré que seul le DDM permettait de solubiliser FpvG. FpvH n'a pas pu être solubilisée seule, tandis qu'en complexe, les protéines FpvG-FpvH sont solubilisées si les membranes sont incubées à 4°C pendant 16 h. IcmF2 est également extraite des membranes avec le DDM seule ou en co-expression avec FpvG.

### **c. Purifications des protéines FpvG-FpvH**

L'expression des deux protéines dans la souche TOP10 d'*E. coli* portant les plasmides pBAD24-FpvG<sub>His6</sub> et pBAD33-FpvH<sub>Strep</sub> est induite par la présence de 0,01% d'arabinose. Après culture, le culot cellulaire est récupéré et repris dans 50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 50 mM NaCl et traité avec une pastille protease inhibitor (complete EDTA-free protease inhibitor, Roche). La solution est homogénéisée au Potter et les cellules sont ensuite lysées par sonication (3 fois 60 pulses d'une minute d'amplitude d'environ 40%) puis centrifugées (8500 rpm, 15 min, 4 °C) pour séparer le surnageant des débris cellulaires. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 40000 rpm pendant 40min à 4°C. Les culots contenant les membranes sont récupérés et repris dans 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 % DDM permettant de solubiliser les protéines sur la nuit à 4 °C sous agitation. Les protéines solubilisées sont ensuite récupérées par ultracentrifugation pendant 40 min à 40000 rpm à 4°C. Le surnageant obtenu est passé sur colonne d'affinité StrepTrap 5 ml (GE Healthcare) équilibrée avec 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM NaCl, 0,1% DDM. Les protéines sont éluées avec l'ajout du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM NaCl, 0,1% DDM, 2,5 mM D-Desthioiotine. Les fractions contenant le complexe sont concentrées puis passées sur colonne de Gel Filtration (Superdex 200 – GE Healthcare) équilibrée avec 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl.

#### **d. Microscopie électronique sur le complexe FpvG-FpvH**

*En collaboration avec la plateforme de biologie et génomique structurale de l'IGMBC à Illkirch.* 15 ng du complexe FpvG-FpvH précédemment purifié ont été déposés sur des grilles CF300-Cu Carbon Film-300 MESH-Copper (Euromedex CF300-CU-050) préalablement recouverte d'un film de carbone afin de les rendre hydrophiles. L'échantillon est ensuite coloré avec de l'acétate d'uranyle 2 %. L'acquisition des images a été faite à l'aide du logiciel SerialEM sur un microscope FEI Tecnai F20 fonctionnant à une tension de 200 kV et une plage de défocalisation de 500 nm, en utilisant un détecteur Gatan US1000 avec un grossissement de 50 000 X, donnant une taille de pixel de 2,12. Un débit de 20 électrons par Angström carré par seconde et un temps d'exposition de 10 s ont été utilisés. Un total de 28 195 particules a été sélectionné à partir de 2021 micrographes et extraites dans des boîtes de 130 pixels à l'aide du logiciel Relion2. La valeur de défocalisation a été estimée, et la fonction de transfert de contraste a été corrigée en utilisant l'estimation CTF dans Relion2. Les classes à forte densité de population présentant des caractéristiques de haute résolution ont été conservées avec un ensemble de données finales de 12 577 particules. Un premier modèle 3D a été généré dans EMAN2. La procédure d'auto-raffinement de Relion2 a été utilisée pour obtenir une reconstruction finale à 21-Å de résolution, après masquage et sans contrainte de symétrie. La résolution est basée sur la corrélation de Fourier shell (FSC) "gold standard". Le logiciel USCF Chimera a été utilisé pour les reconstructions tridimensionnelles.

## VI) Fractionnement cellulaire des cellules d'*E. coli*

### a. Préparation des fractions périplasmiques d'*E. coli*

Pour réaliser les différentes expériences de pull down avec les protéines FpvC, FpvF et FpvJ, le périplasme bactérien a été préparé de la manière suivante : les cellules d'*E. coli* portant les plasmides d'intérêts sont incubées en LB à 37°C jusqu'à  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,5-0,7, puis induites avec 0.5 mM IPTG à 22 °C pendant 16 h. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation pendant 15 min à 25 °C. Le culot est resuspendu dans 20 mM Tris pH 8.0, 200  $\mu$ M EDTA et 20 % de sucrose. 1 mg/ml de lysozyme est ajouté et le mélange est incubé sur glace pendant 1 h, puis centrifugé pendant 20 min à 6700 rpm à 4 °C (accélération 5, décélération 5). Le surnageant, correspondant au périplasme, est clarifié par ultracentrifugation à 40 000 rpm pendant 30 min à 4 °C.

### b. Préparation des membranes internes d'*E. coli*

Afin de visualiser la localisation subcellulaire de FpvH, 500 ml d'une culture de la souche TOP10 d'*E. coli* produisant la protéine d'intérêt sont centrifugés pendant 10 min à 5500 rpm et repris dans 50 mM Tris pH 8,0 50 mM NaCl. Les cellules sont homogénéisées au Potter et traitées avec une pastille protéase inhibitor EDTA Free (Roche). Les cellules sont ensuite lysées par sonication (60 pulses/min d'une amplitude de 40%) puis centrifugées à basse vitesse (8500 rpm, 15 min, 4 °C) pour séparer le surnageant des débris cellulaires. Le surnageant est ultracentrifugé à 40000 rpm pendant 40 min à 4 °C. Les membranes, comprises dans le culot, sont reprises dans 50 mM Tris pH 8,0 100 mM NaCl, 0,1 % Sodium Lauryl Sulfate (SLS) puis incubées pendant sur la nuit à 4 °C afin de permettre la solubilisation des protéines de membranes internes. Les membranes sont ensuite récupérées par une ultracentrifugation à 40000 rpm pendant 45 min à 4 °C et les différentes fractions (soluble, membrane totales, membranes interne et externe) sont analysées par immunodétection.

## VII) Tests d'interactions protéiques (approche biochimique)

### a. Cross-linking (FpvG)

Cette expérience permettait de vérifier la multimérisation de FpvG que nous avons détecté en double hybride bactérien. La souche TOP10 portant le pBAD-FpvG<sub>his6</sub> est utilisée pour cette expérience. La protéine est induite à 30 °C pendant 4 h avec 0.01 % arabinose, le culot bactérien est récupéré et incubé avec différentes concentrations en formaldéhyde (0 %, 0.5 % et 1 % (v/v)) pendant 1 h à température ambiante sur roue tournante. Les membranes

solubilisées dans du DDM sont ensuite préparées, reprises dans du tampon de charge, sans chauffage, et analysées par immunodétection.

#### **b. Co-immunoprécipitation**

Les différentes expériences de co-immunoprécipitation (pull down) ont été réalisées avec des résines anti-Flag (Sigma), de Nickel (His-select Nickel affinity gel, Sigma) et des billes d'hémimine-agarose (Sigma).

Concernant les résines anti-Flag et Nickel, 50 µl résines sont préalablement lavées avec du tampon 50 mM HEPES pH 7,5 50 mM NaCl puis incubées avec les différentes préparations membranaire et/ou périplasmique en absence ou présence du complexe PvdI-Fe pendant 1 h sur roue tournante à température ambiante. Pour chaque condition, le mélange est centrifugé pendant 2 min à 2000 rpm afin de culoter les billes. Le surnageant contenant les protéines non liées aux résines est récupéré. Les résines sont lavées deux fois avec 1 mL de tampon 50 mM HEPES pH 7,5 50 mM NaCl puis récupérées par centrifugation afin de les analyser par immunodétection.

### **VIII) Révélation de la molécule d'hème sur le complexe FpvG-FpvH**

#### **a. Marquage au TMBZ**

La fraction analysée correspond au pic sorti de la purification du complexe FpvG-FpvH après la StrepTrap et reprise dans du tampon de charge sans agent réducteur (240 mM Tris-HCl pH 6,8 8 % SDS, 30 % de glycérol et 0,01 % de bleu de bromophénol). La fraction est déposée sur gel de polyacrylamide 12 %. Après migration d'environ 1 h30 à 130 V, le gel est incubé dans un tampon d'acétate de sodium 0,25 M pH 5,0 pendant 10 min à l'obscurité et à température ambiante. 6.3 mM de solution de TMBZ dans du méthanol sont ensuite ajoutés et le gel est encore incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. 0.3 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) sont ensuite ajoutés au mélange directement sur le gel. Lorsque des bandes bleues apparaissent, le gel est photographié avec l'appareil Gel Doc XR+(Biorad) en lumière blanche.

#### **b. Co-immunoprécipitation avec les billes d'hémimine-agarose**

Concernant les billes d'hémimine-agarose (Sigma), 20 µl de résine sont lavés avec du PBS 1X avant d'être incubées avec les différentes préparations membranaires en absence ou en présence du complexe PvdI-Fe pendant 30 min à 25 °C. Pour chaque condition, le mélange est centrifugé 2 min à 2000 rpm afin de culoter les billes et récupérer les fractions non liées



aux billes d'hème. Les billes sont lavées trois fois très délicatement avec 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl avant d'être récupérées par centrifugation et analysées par immunodétection. Des billes d'agarose (Sigma) sont utilisées selon le même protocole comme témoin.

## IX) Biologie moléculaire

### a. Préparation d'ADN

L'ADN génomique de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Tissue (Macherey Nagel) selon le protocole fourni par le fabricant. La purification des produits PCR et des produits de digestion est réalisée suivant le protocole du kit NucleoSpin Gel and PCR clean up (Macherey Nagel).

Toutes les réactions d'amplification des gènes d'intérêt sont réalisées avec l'ADN polymérase Phusion (ThermoFisher Scientific) à partir de l'ADN génomique de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. Les plasmides sont purifiés à partir d'une culture d'*E. coli* portant le plasmide d'intérêt et cultivée dans 5 mL de LB en présence si besoin antibiotique(s) à 37 °C, sous agitation. L'extraction d'ADN plasmidique se fait avec le kit NucleoSpin Miniprep (Macherey Nagel) selon le protocole fourni par le fabricant.

### b. Clonage dans les vecteurs d'expression ou de double hybride

La méthode de clonage décrite ci-dessous est utilisée pour cloner les gènes d'intérêt dans les vecteurs de double hybride ou d'expression. Plusieurs étapes sont réalisées :

- Amplification des fragments d'ADN par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Le produit PCR est analysé sur un gel d'agarose à 1 % avec 0,01 % (v/v) de SYBR green (Invitrogen). Après migration, le gel est déposé sur une table UV afin de visualiser le fragment d'ADN qui est ensuite purifié.

- Digestion des fragments d'ADN et des plasmides d'intérêt. Les fragments d'ADN et les plasmides sont digérés par deux enzymes de restriction (ThermoFischer Scientific) de façon séquentielle.

- Ligation du fragment d'ADN dans le plasmide d'intérêt. Le produit PCR digéré est mis en présence du vecteur linéarisé, puis le mélange est incubé avec la T4 DNA Ligase (ThermoFischer Scientific) pendant une nuit à 16 °C. Le produit de ligation est ensuite transformé dans des cellules TOP10 ou DHM1 (selon le plasmide) compétentes d'*E. coli*.

- Transformation : 100 µL de cellules d'*E. coli* rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium sont transformées avec le plasmide d'intérêt. Le mélange est laissé à 4

°C pendant 1 h, puis placé 2 min à 42 °C, et à nouveau 5 min à 4 °C pour créer le choc thermique. 900 µL de LB sont ajoutés et les cellules sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation. Après 1 h d'incubation, les cellules sont centrifugées à 6000 rpm pendant 5 min. 800 µL de surnageant sont retirés, puis le culot est repris avec les 200 µL de surnageant restant et 100 µL sont étalés sur boîte LB-agar contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant une nuit.

Après vérification par PCR sur colonies en utilisant la DreamTaq DNA polymérase (Thermo), les plasmides sont purifiés et vérifiés par séquençage afin de s'assurer de l'absence de mutation dans le gène d'intérêt.

#### **c. Préparation d'ADN et clonage dans les vecteurs suicide pEXG2 pour déléter des gènes dans le chromosome**

Deux fragments d'environ 500 pbs situés en amont et en aval du gène à déléter sont amplifiés par PCR. La subtilité des clonages dans les vecteurs suicide est que les deux fragments obtenus se recouvrent aux niveaux des extrémités 3' en aval du gène et 5' en amont du gène (Voir [Figure n°61](#)). Les deux fragments sont ensuite mélangés de manière équimolaire et une deuxième amplification par PCR est réalisée de manière à obtenir un fragment de 1000 pb. Ce fragment est purifié puis digéré par les enzymes de restrictions et ligué dans le plasmide suicide pEXG2 digéré par les mêmes enzymes. Le produit de ligation est ensuite transformé dans des cellules TOP10 d'*E. coli*. Les différents clones obtenus sont ensuite analysés par PCR sur colonie. Le plasmide des clones positifs est extrait et envoyé au séquençage.

#### **d. Délétion de gènes chez *P. aeruginosa* par conjugaison**

Les cellules de *P. aeruginosa* mutées pour un ou plusieurs gènes sont construites grâce au principe de conjugaison et de deux événements de recombinaison homologue. Le plasmide pEXG2 portant la séquence permettant la délétion est transformé dans des cellules SM10 d'*E. coli*, une souche qui permet de mobiliser et de transférer le plasmide dans les cellules de *P. aeruginosa* sans l'aide d'une souche dite helpreuse (Simon *et al.*, 1983). Les souches sont cultivées sur la nuit à 37 °C pour *E. coli* et 43 °C pour *P. aeruginosa* afin d'atténuer les systèmes de restriction, puis 500 µl de chaque souche sont mélangés et centrifugés pendant 2 min à 8000 rpm. Le culot est repris dans 30 µl de LB puis déposé sur goutte sur boîte gélosée et incubé à 37 °C pendant 4 h. Les bactéries sont ensuite récupérées avec une oëse et resuspendues dans 1 mL de LB. 100 µL de la suspension sont étalés sur boîte LB contenant 30 µg/L de gentamicine et 10 µg/L de chloramphénicol (pour sélectionner uniquement les cellules de *P. aeruginosa* ayant reçu le plasmide). La boîte est incubée à 37 °C pendant 48 h. A ce stade, le premier événement de recombinaison homologue a lieu : seules les souches

ayant intégré dans leur chromosome le plasmide sont gentamicines résistantes. Plusieurs clones résistants sont ensemencés indépendamment (afin d'optimiser les chances d'obtenir des mutants) dans des tubes contenant 1 mL de LB pendant 4 h à 37 °C sous agitation à 220 rpm. Les tubes sont ensuite centrifugés et 970 µl de surnageant est retiré. Les culots sont repris dans les 30 µl restants et 15 µl sont étalés sur boîtes LB sans NaCl contenant 5 % de sucrose. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant au moins 16 h, et les clones obtenus sont repiqués sur boîtes LB et en parallèle sur boîtes LB contenant 15 µg/L de Gentamicine. Cette étape permet de sélectionner les clones ayant perdu le plasmide après le deuxième événement de recombinaison. Les clones sensibles à la gentamicine sont testés par PCR sur colonie afin de s'assurer de la délétion du gène, et le fragment obtenu est envoyé au séquençage.

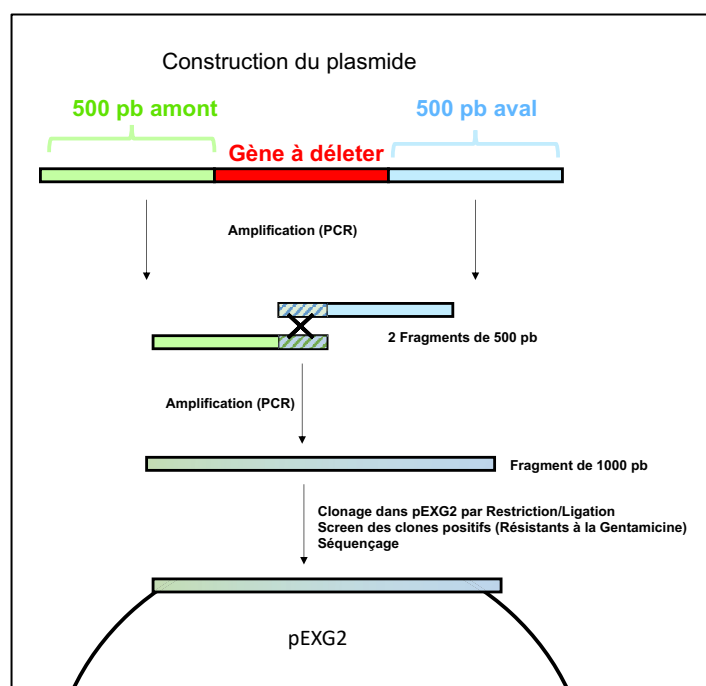


Figure n°61 : Construction du vecteur suicide pour déléter un gène chez *P. aeruginosa*

## X) Traitement des données

Les différents graphiques présentés dans cette thèse ont été réalisés avec le logiciel Kaleidagraph (Version 4.5). Les figures ont été réalisées avec Powerpoint (Version 16.35) et certaines figures (formes de protéines, membranes lipidiques...) ont été téléchargées via le site <https://smart.servier.com/>. Les analyses statistiques concernant les tests de sécrétion de la PvdI et de recyclage de la PvdI ont été réalisées avec le logiciel Rstudio (Version 1.2.5033, package multcomp concernant le test ANOVA et package PMCMRplus pour le test Kruskal-Wallis). Les différentes structures de protéines présentées dans ce travail ont été téléchargées via le site <https://www.rcsb.org/> sous format .pdb et recolorées avec PyMOL (Version 2.3.5).

## Annexes du Matériels et Méthodes

Tableau n°11 : Souches utilisées et construites pour cette thèse

Souches	Caractéristiques	Référence
<b>Souches d'<i>E. coli</i></b>		
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), φ80 <i>lacZ</i> , Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>mup</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> SM10	Thi, thr, leu, tonA, lacY, supE, <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> , Km, λp	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), λ(DE3 [ <i>lacI</i> , <i>lacUV5-T7p07</i> , <i>ind1</i> , <i>sam7</i> , <i>nin5</i> ]), [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K12</sub> (λ <sup>S</sup> )	Novagen
<i>E. coli</i> DH5alpha	F <sup>-</sup> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Collection du laboratoire
<i>E. coli</i> DHM1	F <sup>-</sup> , <i>cya-</i> , <i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>spoT1</i> , <i>rfdD1</i> , <i>cya-854</i>	(Karimova <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> -mCherry	Souche exprimant de manière constitutionnelle mCherry	Collection du laboratoire
<b>Souches de <i>P. aeruginosa</i></b>		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 ATTC	Souche « sauvage »	Collection du laboratoire
PAO1Δ <i>clpV2</i>	Délétion de <i>clpV2</i> (codant pour ATPase du H2-T6SS)	Ce travail
PAO1Δ <i>clpV2</i> Δ <i>pvdRTppmQ</i>	Délétions de <i>clpV2</i> et des gènes codant pour la pompe à efflux <i>pvdRTppmQ</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>pvdRTppmQ</i>	Délétion des gènes codant pour la pompe à efflux <i>pvdRTppmQ</i>	(Hannauer <i>et al.</i> , 2010b).
PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i>	Délétions de <i>fpvA</i> et <i>fpvB</i> codant pour les transporteurs TBBDT de la PvdI	Ce travail
PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i> Δ <i>clpV2</i>	Délétions de <i>fpvA</i> , <i>fpvB</i> et <i>clpV2</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i> Δ <i>pvdRTppmQ</i>	Délétions de <i>fpvA</i> et <i>fpvB</i> et de <i>pvdRTppmQ</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>fpvA</i> Δ <i>fpvB</i> Δ <i>pvdRTppmQ</i> Δ <i>clpV2</i>	Délétions de <i>fpvA</i> et <i>fpvB</i> , <i>pvdRTppmQ</i> et de <i>clpV2</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i>	Délétions des gènes codant pour des enzymes de biosynthèses PvdI et Pch, <i>pvdF</i> et <i>pchA</i> .	Collection du laboratoire
PAO1Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i> Δ <i>clpV2</i>	Délétions de <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> et <i>clpV2</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i> Δ <i>pvdRTppmQ</i>	Délétions de <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> et <i>pvdRTppmQ</i>	Ce travail
PAO1 Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i> Δ <i>pvdRTppmQ</i> Δ <i>clpV2</i>	Délétions de <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> , <i>pvdRTppmQ</i> et <i>clpV2</i>	Ce travail
PAO1Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i> -FpvG <sup>Hismut</sup>	Délétion de <i>pvdF</i> , <i>pchA</i> et mutation dans <i>fpvG</i> pour 4 histidines conservées en alanine	Ce travail
PAO1Δ <i>pvdF</i> Δ <i>pchA</i> -FpvG <sup>Hismut</sup> + pMMB190-FpvG	PAO1Δ <i>PvdF</i> Δ <i>PchA</i> -FpvG <sup>Hismut</sup> complétementée pour FpvG sous le contrôle de son propre promoteur	Ce travail

PAO1 $\Delta$ <i>fvpG</i>	Délétion de <i>fvpG</i>	Collection du laboratoire
---------------------------	-------------------------	---------------------------

**Tableau n°12 : Plasmides construits et utilisés pour cette thèse**

Plasmides	Caractéristiques	Références
<b>Vecteur suicide</b>		
pEXG2	Vecteur pour échange allélique, pBR origin, GentaR, SacB	(Rietsch <i>et al.</i> , 2005)
peXG2-delClpV2	pEXG2 portant la séquence pour déleter ClpV2	Ce travail
pEXG2-delFpvA	pEXG2 portant la séquence pour déleter FpvA	Ce travail
pEXG2-delFpvB	pEXG2 portant la séquence pour déleter FpvB	Ce travail
pME3088-FpvG4Hismut	Plasmide portant la séquence de FpvG mutée pour 4 His en alanine flanquée en amont et en aval de 1000 pb pour remplacement allélique dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i>	Collection du laboratoire
<b>Double hybride</b>		
pKT25	P15 origin, Plac, N-terminal T25 cyclase fragment, Kan <sup>R</sup>	(Karimova <i>et al.</i> , 2005)
pUT18C	ColE1 origin, Plac, N-terminal T18 cyclase fragment, Ap <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005)
pUTM18C	pUT18C modifié avec le domaine transmembranaire 1 de OppB ( <i>E. coli</i> ) inséré en aval du T18	(Ouellette <i>et al.</i> , 2014)
pUTM18C-zip	pUT18C modifié avec le domaine transmembranaire 1 de OppB ( <i>E. coli</i> ), inséré en aval du T18, codant pour un fragment de la protéine leucine zipper	(Ouellette <i>et al.</i> , 2014)
pKTM25-zip	pKT25 modifié avec le domaine transmembranaire 1 de OppB ( <i>E. coli</i> ), inséré en aval du T25, codant pour un fragment de la protéine leucine zipper	(Ouellette <i>et al.</i> , 2014)
pKT25-FpvG	FpvG cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-FpvH	FpvH cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-FpvK	FpvK cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-pvdT	pvdT cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-FpvD	FpvD cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-FpvE	FpvE cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	Ce travail
pKT25-RetS	RetS cloné dans pKT25, en aval du Domaine T25	(Vincent <i>et al.</i> , 2010)
pUT18C-FpvG	FpvG cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	Ce travail
pUT18C-FpvH	FpvH cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	Ce travail
pUT18C-FpvK	FpvK cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	Ce travail
pUT18C-FpvD	FpvD cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	Ce travail
pUT18C-FpvE	FpvE cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	Ce travail
pUT18C-RetS	RetS cloné dans pUT18C, en aval du Domaine T18	(Vincent <i>et al.</i> , 2010)
pKTM25-FpvJ	FpvJ cloné dans le vecteur pKTM25-zip	Ce travail
pKTM25-FpvC	FpvC cloné dans le vecteur pKTM25-zip	Ce travail
pUTM18C-FpvC	FpvC cloné dans le vecteur pUTM18C	Ce travail
pUTM18C-FpvF	FpvF cloné dans le vecteur pUTM18C	Ce travail
pUTM18C-FpvJ	FpvJ cloné dans le vecteur pUTM18C	Ce travail
pKT25-FpvGmut	FpvG mutée pour les 4 His conservées cloné dans le pKT25	Ce travail
pUT18C-PA1316	PA1316 cloné dans le vecteur pUT18C	Collection du laboratoire

pKT25-PA1519	PA1519 cloné dans le pKT25	Collection du laboratoire
pKT25-TssMp 9	Partie périplasmique de lcmF2 clonée dans le pKTM25, clone 9	Eric Durand, collection personnelle
pKT25-TssMp 21	Partie périplasmique de lcmF2 clonée dans le pKTM25, clone 21	Eric Durand, collection personnelle
<b>Expression et production</b>		
pBAD24	pBR322 origin, Para, araC, Ap <sup>R</sup>	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD33	pACYC184 origin, Para, araC, Cm <sup>R</sup>	(Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pRSFDuet-1	RSF origin, pT7, Kan <sup>R</sup>	Novagen
pCDFDuet-1	CDF origin, pITG, lacl, Strep <sup>R</sup>	Novagen
pBAD24-FpvG <sub>His6</sub>	FpvG cloné dans le pBAD24 avec une séquence His <sub>6</sub> en C-terminal	Ce travail
pBAD33-FpvH <sub>Strep</sub>	FpvH cloné dans pBAD33 avec une séquence Strep en C-terminal	Ce travail
pCDF-FpvJ <sub>His6</sub> FpvF <sub>Flag</sub>	FpvJ and FpvF cloné dans le MCS1 de pCDFDuet-1 avec une séquence His <sub>6</sub> et Flag en C-terminal, respectivement	Ce travail
pCDF-FpvJ <sub>His6</sub>	FpvJ cloné dans le MCS1 de pCDFDuet-1 avec une séquence His <sub>6</sub> en C-terminal	Ce travail
pRSF-FpvC <sub>HA</sub>	FpvC cloné dans le MCS2 de pRSFDuet-1 avec une séquence HA en C-terminal	Ce travail
pCDF-FpvF <sub>Flag</sub>	FpvF cloné dans le MCS1 de pCDFDuet-1 avec une séquence Flag en C-terminal	Ce travail
pBAD33-lcmF2 <sub>Flag</sub>	lcmF2 cloné dans le pBAD33 avec une séquence Flag en C-terminal	Ce travail
pRSF-FpvG <sub>mut</sub>	FpvG mutée pour 4 Histidines conservées cloné dans le MCS1 de pRSFDuet-1	Ce travail
pMMB190-FpvG	Plasmide de complémentation exprimant FpvG sous le contrôle de son propre promoteur	Collection du laboratoire
pME-FpvG4Hismut	Plasmide portant la séquence de FpvG mutée pour les 4 His conservées flanquée en amont et en aval de 1000 pb pour remplacement allélique dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i>	Collection du laboratoire

**Tableau n°13 : Oligonucléotides utilisés dans cette thèse**

Vecteurs suicide	Sequence (5' → 3')
Del ClpV2-HindIII500 UP	CCGGAAGCTTACTGGAAACGCCTGATGCCCTACCTGGGCC
Del ClpV2-EcoRI500 DO	CCGGGAATTCCGAACGAGCCCAGCTGGCCCAGTGGATGG
Del ClpV2-Stop fw	CATTAAGGATGGATGAGCATGATCAACGTACACGGGCGCGTGCTCTGCGAGTTCGCCTGA
Del ClpV2-ATG rev	TACGTTGATCATGCTCATCCATCCTTAATGAAT
DelFpvA-500UpHindIII	CCGGAAGCTTCCATCTTCGCCGACTACTACCTATTTCGACG
DelFpvA-500DoBamH1	CCGGGGATCCCTGGGCGGAAGCGGAGATCGGCGCCGAGTT
Del ATG-FpvA – rev	GAGACCGTGTGGTGCTGGCATGGGTGATTGctc
Del Stop-FpvA – fw	CAATCACCCATGCCAGCACCCACACGGTCTCCTGATGTTTCAGCACTCGCTGGGACTTCTGA
DelFpvB-500UpHindIII	CCGGAAGCTTGCGCGGCCGATATCCGCCTCGTTGCCGTAG
DelFpvB-500DoBamH1	GAGGCGGGTGTGCTTTCTCATGAACGGCGGATCCCCGG

Del ATG-FpvB – rev	ACTGGAACGACGTGTTTTCATCTGCAGTGTCT
Del Stop-FpvB – fw	ACACTGCAGATGAAACACGTCGTTTCCAGTCTGATGTTACGGTGAAGTACTCGCTCTGA
<b>Vecteurs double hybride</b>	<b>Sequence (5' → 3')</b>
pKT25-FpvGUP	CCGGTCTAGAGATGTGCAAAAAGTCCCGCTCCAGA
pKT25-FpvGDO	CCGGGTACCCGTGGCTGTCCCTCCGCGGTCTGGTT
pKT25-FpvHUP	CCGGTCTAGAGATGAGCAAGGCCGCGTTGCCAG
pKT25-FpvHDO	CCGGGTACCCGTTGCTTACCTCGTTTGTTCAGCCA
pKT25-FpvKUP	CCGGTCTAGAGATGAGCGTCGAAACCGTCCGCCCG
pKT25-FpvKDO	CCGGGTACCCGATGGCGGTGTGACGGGTCACGCC
pKT25-FpvDUP	CCGGTCTAGAGATGAGCATCCACACCCGCCCTGG
pKT25-FpvDDO	CCGGGTACCCGTGGCGCGGCGATGTGCGCGTGGTC
pKT25-FpvEUP	CCGGTCTAGAGATGAACGACGCCTACGAACAACG
pKT25-FpvEDO	CCGGTCTAGAGATGAACGACGCCTACGAACAACG
pKT25-pvdTUP	CCGGTCTAGAGATGAAAAACGCCACGCAACCCGTC
pKT25-pvdTDO	CCGGGTACCCGTTGGCTGGCCAGGGCGGCCACCGG
pKTM25-FpvCUP	CCGGTCTAGAGGAAGACGGCAAACGCCTGCGCATC
pKTM25-FpvCDO	CCGGGAGCTCTCATGCGCCGACTCCTGGATGGC
pUTM18C-FpvCDO	CCGGGTACCCGTGCGCCGACTCCTGGATGGCGCG
pKTM25-FpvJUP	CCGGTCTAGAGCACAAACCGATCTGCGAATGCGAG
pKTM25-FpvJDO	CCGGGAATTCTCATGGCGCGGCGATGTGCGCGTG
pUTM18C-FpvJDO	CCGGGTACCCGTGCGCGCGGCGATGTGCGCGTGGTC
pUTM18C-FpvFUP	CCGGTCTAGAGGCGACGCCGCGCGGCCAGTCC
pUTM18C-FpvFDO	CCGGGTACCCGTCAGCCCTTACCGGCCAGCAGCCC
<b>Vecteur production protéines</b>	<b>Sequence (5' → 3')</b>
icmF2_F	CCGGGAGCTCAAGGAGATATACATATGAAAACTTCTTCAAGAAAGTC
p33-icmF2Flag_R	AAGCTTTCACCTTGTGTCATCGTCTTTGTAGTCGCTAGCGAGCTGCACCGGCATGCGGAAGCT
PiuB-EcorI Fw	CCGGGAATTCATGAAGAAAGTCTGGTTCCAGTTG
PiuB-HindIIIStrepCter Rv	CCGGAAGCTTTCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGCGTACACGTGCGGTCCGTAACGTCC
FpvG-p24HisCter_F	CCGGCCATGGCCTCGAAAAAGTCCCGCTCCAGACTC
FpvG-p24HisCter_R	CCGGAAGCTTTCATGATGATGATGATGATGGCTAGCTGGCTGTCCCTCCGCGGTCTGGTT
FpvH-p33StrepCter_F	CCGGGAATTCAGGAGATATACATATGAGCAAGGCCGCGTTGCCAGCCC
FpvH-p33StrepCter_R	CCGGAAGCTTTCATTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGCTTGTACCTCGTTTGTTCAGCCA
FpvJ-pCDFHisCter_F	CCGGCCATGGGACGATCCACACCCGCCCTGGCGC
FpvJ-pCDFHisNter_R	CCGGGAATTCTCAATGATGATGATGATGGCTAGCTGGCGCGGCGATGTGCGCGTGGTC
FpvF-pCDFFlagCter_F	CCGGGAATTCGAAAGGAGATATACATATGAACCTGAAACCCCATTCGCTC
FpvF-pCDFFlagCter_R	CCGGAAGCTTTCACCTTGTGTCATCGTCTTTGTAGTCGCTAGCGCGCCCTTCGACTATCGCTTTCTGT
FpvC-pRSFHACter_F	CCGGAGATCTAAGGAGATATACATATGCTGTTCTCCCGTCGCTCATCC
FpvC-pRSFHACter_R	CCGGGTACCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGCTAGCTGCGCCGACTCCTGGATGGCGCG
03-pRSFHHisCt_R	CCGGGAATTCATGATGATGATGATGATGGCTAGCTGGCTGTCCCTCCGCGGTCTGGTT

## Protocole d'immunodétection.

Ce paragraphe décrit le protocole utilisé pour les expériences de western blot.

### **a. Préparation des gels de polyacrylamide**

Les gels de polyacrylamide sont préparés suivant les solutions et volumes présents dans les **Tableaux n°14** et **15**. Le gel de séparation est d'abord préparé et coulé dans le système Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad). Après polymérisation, le gel de concentration est préparé et coulé par-dessus et les peignes sont ajoutés pour la formation des puits :

**Tableau n°14 Préparation du gel de séparation**

<b>Gel de séparation</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
40 % acrylamide bis acrylamide	3,75 ml	4,5 ml	5,63 ml
4X Tris CL/ SDS pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Eau	7,44 ml	6,75 ml	5,56 ml
APS 10%	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml
Temed	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

**Tableau n°15 : Préparation du gel de concentration**

<b>Gel de concentration</b>	<b>Volume</b>
40 % acrylamide bis acrylamide	0,650 ml
4X Tris CL/ SDS pH 6,8	1,25 ml
Eau	3,05 ml
APS 10%	0,05 ml
Temed	0,01 ml

### **b. Immunodétection**

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées en liquide et à froid sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant 1 h à 100 V, 350 mA. Après saturation des membranes avec 5 % de lait, les anticorps primaires sont ajoutés avec une dilution adaptée et incubés pendant une nuit à 4 °C. Après 4 lavages successifs dans du PBS Tween 0,1 %, les anticorps secondaires anti-lapin (GE Healthcare) ou anti-souris (GE Healthcare) couplés à la peroxydase de raifort sont incubés avec la membrane à température ambiante pendant 45 min. Les membranes sont de nouveau lavées deux fois avec du PBS Tween 0.1% puis deux fois avec du PBS 1X. La révélation se fait à l'aide du kit ECL (ECL Pierce™ Western Blotting Substrate, ThermoFischer) selon les instructions recommandées et les images d'immunodétection sont acquises sur l'appareil ImageQuant LAS400 ou Amersham Imager 680 blot and Gel imager.



## **Bibliographie**

Ackerley, D. F., Caradoc-Davies, T. T., & Lamont, I. L. (2003). Substrate Specificity of the Nonribosomal Peptide Synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2848-2855. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2848-2855.2003>

Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(8), 2003-2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>

Albrecht-Gary, A. M., & Crumbliss, A. L. (1998). Coordination chemistry of siderophores: Thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Metal Ions in Biological Systems*, 35, 239-327.

Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A. Z., & Abdallah, M. A. (1994). Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdin PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry*, 33(26), 6391-6402. <https://doi.org/10.1021/ic00104a059>

Allsopp, L. P., Wood, T. E., Howard, S. A., Maggiorelli, F., Nolan, L. M., Wettstadt, S., & Filloux, A. (2017). RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(29), 7707-7712. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700286114>

Andersen, S. B., Marvig, R. L., Molin, S., Krogh Johansen, H., & Griffin, A. S. (2015). Long-term social dynamics drive loss of function in pathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10756-10761. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508324112>

Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)

Ankenbauer, R G, & Quan, H. N. (1994). FptA, the Fe(III)-pyochelin receptor of *Pseudomonas aeruginosa*: A phenolate siderophore receptor homologous to hydroxamate siderophore receptors. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 307-319. <https://doi.org/10.1128/JB.176.2.307-319.1994>

Ankenbauer, Robert G. (1992). Pyochelin Receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. BACTERIOL.*, 174, 9.

Bagg, A., & Neilands, J. B. (1987). *Ferric Uptake Regulation Protein Acts as a Repressor, Employing Iron(I1) as a Cofactor To Bind the Operator of an Iron Transport Operon in Escherichia coli?* 7.

Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 43(2), 475-485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02759.x>

Barbieri, J. T., & Sun, J. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (p. 79-92). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>

Barchini, E., & Cowart, R. E. (1996). Extracellular iron reductase activity produced by *Listeria monocytogenes*. *Archives of Microbiology*, 166(1), 51-57. <https://doi.org/10.1007/s002030050354>

Barelmann, I., Fernández, D. U., Budzikiewicz, H., & Meyer, J.-M. (2003). The pyoverdine from

*Pseudomonas chlororaphis* D-TR133 showing mutual acceptance with the pyoverdine of *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 16(2), 263-270. <https://doi.org/10.1023/a:1020615830765>

Bastiaansen, K. C., Ibañez, A., Ramos, J. L., Bitter, W., & Llamas, M. A. (2014). The Prc and RseP proteases control bacterial cell-surface signalling activity: Prc and RseP proteases control CSS. *Environmental Microbiology*, 16(8), 2433-2443. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12371>

Battesti, A., & Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58(4), 325-334. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.018>

Beare, P. A., For, R. J., Martin, L. W., & Lamont, I. L. (2003). Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Molecular Microbiology*, 47(1), 195-207. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03288.x>

Blevès, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 686-691. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911839107>

Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., & Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *The EMBO Journal*, 28(4), 315-325. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.269>

Bönemann, G., Pietrosiuk, A., & Mogk, A. (2010). Tubules and donuts: A type VI secretion story: Mechanism of type VI protein secretion. *Molecular Microbiology*, 76(4), 815-821. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07171.x>

Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: An intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>

Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals*, 15, 325-339. <https://doi.org/10.1023/a:1020218608266>

Bowman, S. E. J., & Bren, K. L. (2008). The chemistry and biochemistry of heme c: Functional bases for covalent attachment. *Natural Product Reports*, 25(6), 1118. <https://doi.org/10.1039/b717196j>

Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., & Albrecht-Gary, A.-M. (2012). Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transactions*, 41(9), 2820. <https://doi.org/10.1039/c1dt11804h>

Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa*

Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3517-3525. <https://doi.org/10.1128/JB.00010-09>

Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I. J. (2009). New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, 11(5), 1079-1091. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x>

Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>

Brencic, A., & Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Molecular Microbiology*, 72(3), 612-632. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06670.x>

Brewer, L. K., Huang, W., Hackert, B., Kane, M. A., & Oglesby, A. G. (2019). *Sessile growth promotes PrrF- and 2-alkyl-4(1 H )-quinolone-dependent iron regulation of the HSI-II type six secretion locus in Pseudomonas aeruginosa* [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/765115>

Brillet, K., Journet, L., Célia, H., Paulus, L., Stahl, A., Pattus, F., & Cobessi, D. (2007). A  $\beta$  Strand Lock Exchange for Signal Transduction in TonB-Dependent Transducers on the Basis of a Common Structural Motif. *Structure*, 15(11), 1383-1391. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.08.013>

Brillet, K., Ruffenach, F., Adams, H., Journet, L., Gasser, V., Hoegy, F., Guillon, L., Hannauer, M., Page, A., & Schalk, I. J. (2012). An ABC Transporter with Two Periplasmic Binding Proteins Involved in Iron Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*, 7(12), 2036-2045. <https://doi.org/10.1021/cb300330v>

Briskot, G., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1986). Siderophore vom Pyoverdin-Typ aus *Pseudomonas aeruginosa* [1] / Pyoverdine Type Siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 41(5-6), 497-506. <https://doi.org/10.1515/znc-1986-5-601>

Briskot, Gernot, Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1989). Bacterial Constituents, XXXVII. Pyoverdin-Type Siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*. *Liebigs Annalen Der Chemie*, 1989(4), 375-384. <https://doi.org/10.1002/jlac.198919890164>

Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., & Chakraborty, R. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature Structural Biology*, 6(1), 8.

Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., & Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14613-14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.251465298>

Carroll, C. S., & Moore, M. M. (2018). Ironing out siderophore biosynthesis : A review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(4), 356-381. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1476449>

Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J., & Andrews, S. C. (2006). Feo –

Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *BioMetals*, 19(2), 143-157. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-0003-2>

Cass, L. G., & Wilcox, G. (1986). Mutations in the *araC* regulatory gene of *Escherichia coli* B/r that affect repressor and activator functions of AraC protein. *Journal of Bacteriology*, 166(3), 892-900. <https://doi.org/10.1128/JB.166.3.892-900.1986>

Celia, Herve, Botos, I., Ni, X., Fox, T., De Val, N., Lloubes, R., Jiang, J., & Buchanan, S. K. (2019). Cryo-EM structure of the bacterial Ton motor subcomplex ExbB–ExbD provides information on structure and stoichiometry. *Communications Biology*, 2(1), 358. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0604-2>

Celia, Hervé, Noinaj, N., Zakharov, S. D., Bordignon, E., Botos, I., Santamaria, M., Barnard, T. J., Cramer, W. A., Lloubes, R., & Buchanan, S. K. (2016). Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature*, 538(7623), 60-65. <https://doi.org/10.1038/nature19757>

Cezard, C., Farvacques, N., & Sonnet, P. (2014). Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 165-186. <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011194624>

Challis, G. L. (2005). A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem*, 6(4), 601-611. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>

Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B. P., & Faure, K. (2009). Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infection and Immunity*, 77(5), 2065-2075. <https://doi.org/10.1128/IAI.01204-08>

Chen, W.-J., Kuo, T.-Y., Hsieh, F.-C., Chen, P.-Y., Wang, C.-S., Shih, Y.-L., Lai, Y.-M., Liu, J.-R., Yang, Y.-L., & Shih, M.-C. (2016). Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. *Scientific Reports*, 6(1), 32950. <https://doi.org/10.1038/srep32950>

Cherrak, Y., Flaugnatti, N., Durand, E., Journet, L., & Cascales, E. (2019). *Structure and Activity of the Type VI Secretion System*. 12.

Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bazire, A., Tahrioui, A., Duchesne, R., Tortuel, D., Maillot, O., Clamens, T., Orange, N., Feuilloley, M. G. J., Lesouhaitier, O., Dufour, A., & Cornelis, P. (2019). Extracytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(7), 706-721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.04.008>

Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends in Microbiology*, 24(1), 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>

Clement, E., Mesini, P. J., Pattus, F., & 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(24), 7954-7965. <https://doi.org/10.1021/bi049768c>

Cobessi, D., Celia, H., Folschweiller, N., Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2005). The Crystal Structure of the Pyoverdine Outer Membrane Receptor FpvA from *Pseudomonas*

- aeruginosa at 3.6Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 347(1), 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.021>
- Cobessi, D., Celia, H., & Pattus, F. (2005). Crystal Structure at High Resolution of Ferric-pyochelin and its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 352(4), 893-904. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.004>
- Cornelis, P., Hohnadel, D., & Meyer, J. M. (1989). Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infection and Immunity*, 57(11), 3491-3497. <https://doi.org/10.1128/IAI.57.11.3491-3497.1989>
- Cornelis, Pierre, & Bodilis, J. (2009). A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environmental Microbiology Reports*, 1(4), 256-262. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00041.x>
- Cornelis, Pierre, & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>
- Cornelis, Pierre, Matthijs, S., & Van Oeffelen, L. (2009). Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals*, 22(1), 15-22. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9193-0>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Cowell, B. A., Twining, S. S., Hobden, J. A., Kwong, M. S. F., & Fleiszig, S. M. J. (2003). Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology*, 149(8), 2291-2299. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26280-0>
- Cox, C. D. (1980). Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 142(2), 581-587. <https://doi.org/10.1128/JB.142.2.581-587.1980>
- Cox, C. D., Rinehart, K. L., Moore, M. L., & Cook, J. C. (1981). Pyochelin : Novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), 4256-4260. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4256>
- Creutz, C. (2002, mai 1). *Complexities of ascorbate as a reducing agent* (world) [Research-article]. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ic50226a088>
- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., & Bjarnsholt, T. (2019). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, apm.13010. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>
- Cuiv, P. O. (2006). Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 152(4), 945-954. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28552-0>
- Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimann, C., Guillon, L., & Schalk, I. J. (2015). A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa* : Cellular organization of pyochelin pathway. *Environmental Microbiology*, 17(1),

171-185. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12544>

Cunrath, O., Geoffroy, V. A., & Schalk, I. J. (2016). Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: A role for siderophores: Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, *18*(10), 3258-3267. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12971>

Davies, K. J., Lloyd, D., & Boddy, L. (1989). The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, *135*(9), 2445-2451. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-9-2445>

Dean, C. R., & Poole, K. (1993). Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a two-component regulatory system. *Molecular Microbiology*, *8*(6), 1095-1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01654.x>

Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1694*(1-3), 149-161. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.001>

Dent, A. T., Mouriño, S., Huang, W., & Wilks, A. (2019). Post-transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* heme assimilation system (Has) fine-tunes extracellular heme sensing. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(8), 2771-2785. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006185>

Dhungana, S., & Crumbliss, A. L. (2005). Coordination Chemistry and Redox Processes in Siderophore-Mediated Iron Transport. *Geomicrobiology Journal*, *22*(3-4), 87-98. <https://doi.org/10.1080/01490450590945870>

Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cámara, M., & Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chemistry & Biology*, *14*(1), 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>

Döring, G., Pfestorf, M., Botzenhart, K., & Abdallah, M. A. (1988). Impact of proteases on iron uptake of *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine from transferrin and lactoferrin. *Infection and Immunity*, *56*(1), 291-293. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.1.291-293.1988>

Drake, E. J., Cao, J., Qu, J., Shah, M. B., Straubinger, R. M., & Gulick, A. M. (2007). The 1.8 Å Crystal Structure of PA2412, an MbtH-like Protein from the Pyoverdine Cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20425-20434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611833200>

Drake, E. J., & Gulick, A. M. (2011). Structural Characterization and High-Throughput Screening of Inhibitors of PvdQ, an NTN Hydrolase Involved in Pyoverdine Synthesis. *ACS Chemical Biology*, *6*(11), 1277-1286. <https://doi.org/10.1021/cb2002973>

Draper, R. C., Martin, L. W., Beare, P. A., & Lamont, I. L. (2011). Differential proteolysis of sigma regulators controls cell-surface signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Proteolysis in cell-surface signalling pathways. *Molecular Microbiology*, *82*(6), 1444-1453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07901.x>

Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, *5*(13), 1213-1219. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>

Edgar, R. J., Hampton, G. E., Garcia, G. P. C., Maher, M. J., Perugini, M. A., Ackerley, D. F.,

- & Lamont, I. L. (2017). Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 106(6), 891-904. <https://doi.org/10.1111/mmi.13855>
- Eisenhauer, H. A., Shames, S., Pawelek, P. D., & Coulton, J. W. (2005). Siderophore Transport through *Escherichia coli* Outer Membrane Receptor FhuA with Disulfide-tethered Cork and Barrel Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30574-30580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506708200>
- Elias, S., Degtyar, E., & Banin, E. (2011). FvbA is required for vibriobactin utilization in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 157(7), 2172-2180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044768-0>
- Endriß, F., Braun, M., Killmann, H., & Braun, V. (2003). Mutant Analysis of the *Escherichia coli* FhuA Protein Reveals Sites of FhuA Activity. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4683-4692. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4683-4692.2003>
- Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C., & O'Callaghan, R. J. (1998). Protease IV, a Unique Extracellular Protease and Virulence Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16792-16797. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16792>
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., & de Lorenzo, V. (1999). Opening the Iron Box : Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6223-6229. <https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999>
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998). Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infection and Immunity*, 66(1), 43-51. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.43-51.1998>
- Felnagle, E. A., Barkei, J. J., Park, H., Podevels, A. M., McMahon, M. D., Drott, D. W., & Thomas, M. G. (2010). MbtH-Like Proteins as Integral Components of Bacterial Nonribosomal Peptide Synthetases. *Biochemistry*, 49(41), 8815-8817. <https://doi.org/10.1021/bi1012854>
- Ferguson, A. D., Amezcua, C. A., Halabi, N. M., Chelliah, Y., Rosen, M. K., Ranganathan, R., & Deisenhofer, J. (2007). Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(2), 513-518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609887104>
- Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K., & Welte, W. (1998). Siderophore-Mediated Iron Transport : Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397), 2215-2220. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2215>
- Fernandez, D. U., Fuchs, R., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Meyer, J.-M. (2003). The pyoverdinin of *Pseudomonas fluorescens* G173, a novel structural type accompanied by unexpected natural derivatives of the corresponding ferrioxamine. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 58(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-1-201>
- Filloux, A. (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa* : An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00155>
- Filloux, A., Michel, G., & Bally, M. (1998). GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria : The Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3), 177-198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00366.x>



Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Høiby, N., & Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: An evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 841-851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2907>

Frawley, E. R., & Fang, F. C. (2014). The ins and outs of bacterial iron metabolism: Bacterial iron efflux transporters. *Molecular Microbiology*, 93(4), 609-616. <https://doi.org/10.1111/mmi.12709>

Freeman, L. (1916). CHRONIC GENERAL INFECTION WITH THE BACILLUS PYOCYANEUS: *Annals of Surgery*, 64(2), 195-202. <https://doi.org/10.1097/00000658-191608000-00005>

Gaille, C., Reimann, C., & Haas, D. (2003). Isochorismate Synthase (PchA), the First and Rate-limiting Enzyme in Salicylate Biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16893-16898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212324200>

Gallant, C. V., Raivio, T. L., Olson, J. C., Woods, D. E., & Storey, D. G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. *Microbiology (Reading, England)*, 146 ( Pt 8), 1891-1899. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1891>

Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(4), 393-410. <https://doi.org/10.1128/61.4.393-410.1997>

Galloway, D. R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: Recent developments. *Molecular Microbiology*, 5(10), 2315-2321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02076.x>

Ganne, G., Brillet, K., Basta, B., Roche, B., Hoegy, F., Gasser, V., & Schalk, I. J. (2017). Iron Release from the Siderophore Pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* Involves Three New Actors: FpvC, FpvG, and FpvH. *ACS Chemical Biology*, 12(4), 1056-1065. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01077>

Gao, L., Guo, Z., Wang, Y., Wang, Y., Wang, K., Li, B., & Shen, L. (2018). The Two-Operon-Coded ABC Transporter Complex FpvWXYZCDEF is Required for *Pseudomonas aeruginosa* Growth and Virulence Under Iron-Limiting Conditions. *The Journal of Membrane Biology*, 251(1), 91-104. <https://doi.org/10.1007/s00232-017-9979-5>

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., & Schalk, Isabelle. J. (2015). Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 148, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017>

Gasser, V., Malrieu, M., Forster, A., Mély, Y., Schalk, I. J., & Godet, J. (2020). In cellulo FRET-FLIM and single molecule tracking reveal the supra-molecular organisation of the pyoverdine bio-synthetic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *UNIVOAK*, 11.

Ge, L., & Seah, S. Y. K. (2006). Heterologous Expression, Purification, and Characterization of an L-Ornithine N5-Hydroxylase Involved in Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7205-7210. <https://doi.org/10.1128/JB.00949-06>

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into

pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

Ghysels, B., Dieu, B. T. M., Beatson, S. A., Pirnay, J.-P., Ochsner, U. A., Vasil, M. L., & Cornelis, P. (2004). FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 150(6), 1671-1680. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27035-0>

Ghysels, B., Ochsner, U., MÅ¶llman, U., Heinisch, L., Vasil, M., Cornelis, P., & Matthijs, S. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa pirA* gene encodes a second receptor for ferrienterobactin and synthetic catecholate analogues. *FEMS Microbiology Letters*, 246(2), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.010>

Gipp, S., Hahn, J., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1991). Zwei Pyoverdine aus *Pseudomonas aeruginosa* R. / Two Pyoverdins from *Pseudomonas aeruginosa* R. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 46(7-8), 534-541. <https://doi.org/10.1515/znc-1991-7-806>

Goldberg, J. B., & Pier, G. B. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 4(12), 490-494. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)82911-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)82911-3)

Goodhew, C. F., Brown, K. R., & Pettigrew, G. W. (1986). Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial c-type cytochromes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 852(2-3), 288-294. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90234-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90234-3)

Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., & Lory, S. (2004). A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, 7(5), 745-754. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.020>

Gottesman, S., & Storz, G. (2011). Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a003798-a003798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>

Govan, J. R., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*, 60(3), 539-574. <https://doi.org/10.1128/MMBR.60.3.539-574.1996>

Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G. L. A., Graumann, P. L., & Schalk, I. J. (2007). Real Time Fluorescent Resonance Energy Transfer Visualization of Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: A ROLE FOR FERROUS IRON. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2987-2995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609238200>

Greenwald, J., Nader, M., Celia, H., Gruffaz, C., Geoffroy, V., Meyer, J.-M., Schalk, I. J., & Pattus, F. (2009). FpvA bound to non-cognate pyoverdines: Molecular basis of siderophore recognition by an iron transporter. *Molecular Microbiology*, 72(5), 1246-1259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06721.x>

Greenwood, K. T., & Luke, R. K. J. (1978). Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in *Escherichia coli* K-12. Properties of enterochelin esterase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 525(1), 209-218. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(78\)90216-4](https://doi.org/10.1016/0005-2744(78)90216-4)

Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., & Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 63, 141-155. <https://doi.org/10.1101/sqb.1998.63.141>

- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121-4130.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A., & Murgier, M. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5290-5297. <https://doi.org/10.1128/JB.173.17.5290-5297.1991>
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 149-187. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338>
- Hahn, H. P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* – a review Presented at the Workshop on 'Type-4 pili – biogenesis, adhesins, protein export, and DNA import', Schloss Ringberg, Germany, 26–29 November 1995. This review is dedicated to the memory of William Paranchych. *Gene*, 192(1), 99-108. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00116-9)
- Han, Y., Wang, T., Chen, G., Pu, Q., Liu, Q., Zhang, Y., Xu, L., Wu, M., & Liang, H. (2019). A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLOS Pathogens*, 15(12), e1008198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008198>
- Hancock, R. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*, 5(1), 37-42. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)81773-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)81773-8)
- Hancock, R. E. W. (1998). Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(s1), S93-S99. <https://doi.org/10.1086/514909>
- Hannauer, M., Barda, Y., Mislin, G. L. A., Shanzer, A., & Schalk, I. J. (2010a). The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1212-1220. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-09>
- Hannauer, Melissa, Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., & Schalk, I. J. (2012a). The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*: Metal selectivity of iron uptake pathways. *Environmental Microbiology*, 14(7), 1696-1708. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02674.x>
- Hannauer, Melissa, Schäfer, M., Hoegy, F., Gizzi, P., Wehrung, P., Mislin, G. L. A., Budzikiewicz, H., & Schalk, I. J. (2012b). Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Letters*, 586(1), 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.12.004>
- Hannauer, Mélissa, Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010b). An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters*, 584(23), 4751-4755. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.051>
- Harding, R., & Royt, P. (1990). Acquisition of iron from citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology* 136(1859-1867).

- Harris, W. R., Carrano, C. J., Cooper, S. R., Sofen, S. R., Avdeef, A. E., McArdle, J. V., & Raymond, K. N. (1979). Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 19. Stability constants and electrochemical behavior of ferric enterobactin and model complexes. *Journal of the American Chemical Society*, *101*(20), 6097-6104. <https://doi.org/10.1021/ja00514a037>
- Harrison, Freya. (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, *153*(4), 917-923. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004077-0>
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* : Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(9), 654-665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Heck, L. W., Alarcon, P. G., Kulhavy, R. M., Morihara, K., Russell, M. W., & Mestecky, J. F. (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *The Journal of Immunology*, *144*(6), 2253-2257.
- Heinrichs, D. E., & Poole, K. (1996). PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fptA) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *Journal of Bacteriology*, *178*(9), 2586-2592. <https://doi.org/10.1128/JB.178.9.2586-2592.1996>
- Henríquez, T., Stein, N. V., & Jung, H. (2019). PvdRT-OpmQ and MdtABC-OpmB efflux systems are involved in pyoverdine secretion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*, *11*(2), 98-106. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12708>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, *27*(5), 637. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Hider, R. C., & Kong, X. L. (2011). Glutathione : A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals*, *24*(6), 1179-1187. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9476-8>
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, *10*(4), 441-451. <https://doi.org/10.1586/erp.10.49>
- Hohlneicher, U., Hartmann, R., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1995). Pyoverdin, Ferribactin, Azotobactin -a New Triade of Siderophores from *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 and Its Relation to *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *50*(5-6), 337-344. <https://doi.org/10.1515/znc-1995-5-602>
- Hohlneicher, Ursula, Schäfer, M., Fuchs, R., & Budzikiewicz, H. (2001). Ferribactins as the Biosynthetic Precursors of the *Pseudomonas* Siderophores Pyoverdins. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *56*(3-4), 308-310. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-3-423>
- Horiyama, T., & Nishino, K. (2014). AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *9*(9), e108642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108642>
- Houot, L., Fanni, A., de Bentzmann, S., & Bordi, C. (2012). A bacterial two-hybrid genome fragment library for deciphering regulatory networks of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *158*(8), 1964-1971. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057059-0>
- Huang, B., Ru, K., Yuan, Z., Whitchurch, C. B., & Mattick, J. S. (2004). TonB3 Is Required for Normal Twitching Motility and Extracellular Assembly of Type IV Pili. *Journal of Bacteriology*, *186*(13), 4387-4389. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4387-4389.2004>

- Huber, P., Basso, P., Reboud, E., & Attrée, I. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors: *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 564-571. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12443>
- Hughes, K. T., & Mathee, K. (1998). THE ANTI-SIGMA FACTORS. *Annual Review of Microbiology*, 52(1), 231-286. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.231>
- Hunter, R. C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B. L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., & Newman, D. K. (2013). Ferrous Iron Is a Significant Component of Bioavailable Iron in Cystic Fibrosis Airways. *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00557-13>
- Iglewski, B. H. (1977). Mechanism of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A: Adenosine Diphosphate-Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In Vitro and In Vivo. *INFECT. IMMUN.*, 15, 7.
- Imperi, F., Tiburzi, F., & Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20440-20445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908760106>
- Imperi, Francesco, & Visca, P. (2013). Subcellular localization of the pyoverdine biogenesis machinery of *Pseudomonas aeruginosa*: A membrane-associated “siderosome”. *FEBS Letters*, 587(21), 3387-3391. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.039>
- Jacques, J.-F., Jang, S., Prévost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J., & Massé, E. (2006). RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1181-1190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05439.x>
- Jiang, F. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* Type VI Secretion Phospholipase D Effector Targets Both Prokaryotic and Eukaryotic Cells | Elsevier Enhanced Reader. *Cell Host & Microbe*, 15, 600-610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>
- Josts, I., Veith, K., & Tidow, H. (2019). Ternary structure of the outer membrane transporter FoxA with resolved signalling domain provides insights into TonB-mediated siderophore uptake. *eLife*, 8, e48528. <https://doi.org/10.7554/eLife.48528>
- Kang, D., Kirienko, D. R., Webster, P., Fisher, A. L., & Kirienko, N. V. (2018). Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence*, 9(1), 804-817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1449508>
- Kang, D., Turner, K., & Kirienko, N. (2017). PqsA Promotes Pyoverdine Production via Biofilm Formation. *Pathogens*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010003>
- Karimova, G., Dautin, N., & Ladant, D. (2005). Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2233-2243. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2233-2243.2005>
- Kaur, A. P., Lansky, I. B., & Wilks, A. (2009). The Role of the Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) of *Pseudomonas aeruginosa* in Intracellular Heme Trafficking and Iron Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 56-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806068200>
- Kirienko, N. V., Ausubel, F. M., & Ruvkun, G. (2015). Mitophagy confers resistance to

siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(6), 1821-1826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424954112>

Klebba, P. E. (2016). ROSET Model of TonB Action in Gram-Negative Bacterial Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology*, 198(7), 1013-1021. <https://doi.org/10.1128/JB.00823-15>  
Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). *Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria*.

Koch, H.-G., & Schneider, D. (2007). Folding, Assembly, and Stability of Transmembrane Cytochromes. *Current Chemical Biology*, 16.

Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., & Pechère, J.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990-5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>

Konings, A. F., Martin, L. W., Sharples, K. J., Roddam, L. F., Latham, R., Reid, D. W., & Lamont, I. L. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Uses Multiple Pathways To Acquire Iron during Chronic Infection in Cystic Fibrosis Lungs. *Infection and Immunity*, 81(8), 2697-2704. <https://doi.org/10.1128/IAI.00418-13>

Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, 152(3-4), 291-301. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01200-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01200-1)

Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1781-1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>

Kwon, H. J., Bennik, M. H. J., Demple, B., & Ellenberger, T. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nature Structural Biology*, 7(5), 7.

Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, 188(1), 386-393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 7072-7077. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>

Lamont, Iain L., Konings, A. F., & Reid, D. W. (2009). Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *BioMetals*, 22(1), 53-60. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9197-9>

Lamont, Iain L., & Martin, L. W. (2003). Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 149(4), 833-842. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26085-0>

Lamont, Iain L., Martin, L. W., Sims, T., Scott, A., & Wallace, M. (2006). Characterization of a Gene Encoding an Acetylase Required for Pyoverdine Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 3149-3152. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3149-3152.2006>

Lansky, I. B., Lukat-Rodgers, G. S., Block, D., Rodgers, K. R., Ratliff, M., & Wilks, A. (2006). The Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) from the Heme Uptake System of *Pseudomonas aeruginosa* Is an Intracellular Heme-trafficking Protein to the  $\delta$ -Regioselective Heme Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13652-13662. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600824200>

Larsen, R. A., Thomas, M. G., & Postle, K. (1999). Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1809-1824. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01317.x>

Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport : The Feo system. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 273-298. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049>  
Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>

Lee, Y.-H., Deka, R. K., Radolf, J. D., & Hasemann, C. A. (1999). *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nature Structural Biology*, 6(7), 6.

Lehoux, D. E., Sanschagrin, F., & Levesque, R. C. (2000). Genomics of the 35-kb *pvd* locus and analysis of novel *pvdIJK* genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 141-146. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09276.x>

Leong, S. A., Ditta, G. S., & Helinski, D. R. (1982). Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *Journal of Biological Chemistry*, 257(15), 8724-8730.

Lhospice, S., Gomez, N. O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghssein, G., Hajjar, C., Liratni, A., Wang, S., Richaud, P., Bleves, S., Ball, G., Borezée-Durant, E., Lobinski, R., Pignol, D., Arnoux, P., & Voulhoux, R. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 7(1), 17132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9>

Li, T., Bonkovsky, H. L., & Guo, J. (2011). Structural analysis of heme proteins : Implications for design and prediction. *BMC Structural Biology*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-11-13>

Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R., & Walsh, C. T. (2005). In Vitro Characterization of Salmochelins and Enterobactin Trilactone Hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(31), 11075-11084. <https://doi.org/10.1021/ja0522027>

Lin, J., Cheng, J., Chen, K., Guo, C., Zhang, W., Yang, X., Ding, W., Ma, L., Wang, Y., & Shen, X. (2015). The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00070>

Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Wei, G., Qian, P.-Y., Luo, Z.-Q., & Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8(1), 14888. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>

Lin, P.-C., Youard, Z. A., & Reimann, C. (2013). In vitro-binding of the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantiopyochelin to their AraC-type regulators PchR in

*Pseudomonas*. *BioMetals*, 26(6), 1067-1073. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9676-5>

Liu, P. V. (1966). The Roles of Various Fractions of « *Pseudomonas aeruginosa* » in Its Pathogenesis : III. Identity of the Lethal Toxins Produced in Vitro and in Vivo [with Discussion]. *The Journal of Infectious Diseases*, 116(4), 481-489. JSTOR.

Llamas, M. A., Sparrius, M., Kloet, R., Jimenez, C. R., Vandenbroucke-Grauls, C., & Bitter, W. (2006). The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1882-1891. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006>

Llamas, María A., Imperi, F., Visca, P., & Lamont, I. L. (2014). Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: Stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 569-597. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12078>

Llamas, Maria A., Mooij, M. J., Sparrius, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Ratledge, C., & Bitter, W. (2008). Characterization of five novel *Pseudomonas aeruginosa* cell-surface signalling systems. *Molecular Microbiology*, 67(2), 458-472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06061.x>

Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P., & Moras, D. (1998). *Transmembrane Signaling across the Ligand-Gated FhuA Receptor: Crystal Structures of Free and Ferrichrome-Bound States Reveal Allosteric Changes*. 8.

Lynn, W. A., & Golenbock, D. T. (1992). Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today*, 13(7), 271-276. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90009-V](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90009-V)

Ma, L., Kaserer, W., Annamalai, R., Scott, D. C., Jin, B., Jiang, X., Xiao, Q., Maymani, H., Massis, L. M., Ferreira, L. C. S., Newton, S. M. C., & Klebba, P. E. (2007). Evidence of Ball-and-chain Transport of Ferric Enterobactin through FepA. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 397-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605333200>

Mademidis, A., & Köster, W. (1998). Transport activity of FhuA, FhuC, FhuD, and FhuB derivatives in a system free of polar effects, and stoichiometry of components involved in ferrichrome uptake. *Molecular and General Genetics MGG*, 258(1-2), 156-165. <https://doi.org/10.1007/s004380050718>

Mademidis, Athanasios, Killmann, H., Kraas, W., Flechsler, I., Jung, G., & Braun, V. (1997). ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: Periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. *Molecular Microbiology*, 26(5), 1109-1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6592008.x>

Majdalani, N., Vanderpool, C. K., & Gottesman, S. (2005). Bacterial Small RNA Regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(2), 93-113. <https://doi.org/10.1080/10409230590918702>

Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J.-M., & 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(1), 305-315. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023531-0>

Martin, R. G., & Rosner, J. L. (2001). The AraC transcriptional activators. *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), 132-137. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00178-8)



- Marvig, R. L., Damkiær, S., Khademi, S. M. H., Markussen, T. M., Molin, S., & Jelsbak, L. (2014). Within-Host Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Adaptation toward Iron Acquisition from Hemoglobin. *MBio*, 5(3), e00966-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00966-14>
- Matilla, M. A., Ramos, J. L., Duque, E., de Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., & Ramos-González, M. I. (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*: Swarming in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1842-1850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01286.x>
- Matzanke, B. F., Anemüller, S., Schünemann, V., Trautwein, A. X., & Hantke, K. (2004). FhuF, Part of a Siderophore-Reductase System †. *Biochemistry*, 43(5), 1386-1392. <https://doi.org/10.1021/bi0357661>
- McMorran, B. J., Kumara, H. M. C. S., Sullivan, K., & Lamont, I. L. (2001). Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 6), 1517-1524. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1517>
- Merriman, T. R., Merriman, M. E., & Lamont, I. L. (1995). Nucleotide sequence of pvdD, a pyoverdine biosynthetic gene from *Pseudomonas aeruginosa* : PvdD has similarity to peptide synthetases. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 252-258. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.252-258.1995>
- Meyer, J.-M. (2000). Pyoverdines : Pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174(3), 135-142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., & Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas* : Molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *BioMetals*, 21(3), 259-271. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9115-6>
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., De, D., & Cornelis, P. (1997). Use of siderophores to type pseudomonads : The three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, 9.
- Michel, L., Bachelard, Aude., & Reimmann, Cornelia. (2007). Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(5), 1508-1518. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002915-0>
- Michel, L., González, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., & Reimmann, C. (2005). PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Molecular Microbiology*, 58(2), 495-509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04837.x>
- Mies, K. A., Wirgau, J. I., & Crumbliss, A. L. (2006). Ternary Complex Formation Facilitates a Redox Mechanism for Iron Release from a Siderophore. *BioMetals*, 19(2), 115-126. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-4342-1>
- Miethke, M., Hou, J., & Marahiel, M. A. (2011). The Siderophore-Interacting Protein YqjH Acts as a Ferric Reductase in Different Iron Assimilation Pathways of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 50(50), 10951-10964. <https://doi.org/10.1021/bi201517h>
- Miller, D. J., & Nicholas', D. J. D. (1984). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine/H2O2 Staining Is Not Specific for Heme Proteins Separated by Gel Electrophoresis f. 4.
- Millis, K. K., Weaver, K. H., & Rabenstein, D. L. (1993). Oxidation/reduction potential of

glutathione. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(15), 4144-4146. <https://doi.org/10.1021/jo00067a060>

Mislin, G. L. A., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., & Schalk, I. J. (2006). Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), 1437-1448. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.080>

Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C., & Holder, I. A. (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infection and Immunity*, 38(3), 1296-1298.

Mootz, H., Schwarzer, D., & Marahiel, M. A. (2002). *Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases*. 15.

Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signalling: Protein secretion and c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3128-3138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>

Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.-P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernández, D. U., Schäfer, M., Ravel, J., & Cornelis, P. (2002). Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1673-1685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03120.x>

Mougous, J. D. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>

Moynie, L., Milenkovic, S., Mislin, G. L. A., Gasser, V., Mallocci, G., Baco, E., McCaughan, R. P., Page, M. G. P., Schalk, I. J., Ceccarelli, M., & Naismith, J. H. (2019). The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. *Nature Communications*, 10(1), 3673. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11508-y>

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>

Muller, M. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1527-1533. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01087-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01087-0)

Nadal-Jimenez, P., Koch, G., Reis, C. R., Muntendam, R., Raj, H., Jeronimus-Stratingh, C. M., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2014). PvdP Is a Tyrosinase That Drives Maturation of the Pyoverdine Chromophore in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 196(14), 2681-2690. <https://doi.org/10.1128/JB.01376-13>

Nader, M., Dobbelaere, W., Vincent, M., Journet, L., Adams, H., Cobessi, D., Gallay, J., & Schalk, I. J. (2007). Identification of Residues of FpvA Involved in the Different Steps of Pvd-Fe Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* †. *Biochemistry*, 46(42), 11707-11717. <https://doi.org/10.1021/bi700997w>

Nguyen, A. T., O'Neill, M. J., Watts, A. M., Robson, C. L., Lamont, I. L., Wilks, A., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2014). Adaptation of Iron Homeostasis Pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* Pyoverdine Mutant in the Cystic Fibrosis Lung. *Journal of Bacteriology*, 196(12),

2265-2276. <https://doi.org/10.1128/JB.01491-14>

Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, 64, 43-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>

O Cuiv, P., Clarke, P., Lynch, D., & O'Connell, M. (2004). Identification of rhtX and fptX, Novel Genes Encoding Proteins That Show Homology and Function in the Utilization of the Siderophores Rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and Pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, Respectively. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 2996-3005. <https://doi.org/10.1128/JB.186.10.2996-3005.2004>

Ó Cuív, P., Keogh, D., Clarke, P., & O'Connell, M. (2007). FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* Functions in the Utilization of the Xenosiderophores Ferrichrome, Ferrioxamine B, and Schizokinen: Evidence for Transport Redundancy at the Inner Membrane. *Journal of Bacteriology*, 189(1), 284-287. <https://doi.org/10.1128/JB.01142-06>

Ochsner, U. A., & Vasil, M. L. (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: Cycle selection of iron-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 4409-4414. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.4409>

Ochsner, Urs A., Johnson, Z., Lamont, I. L., Cunliffe, H. E., & Vasil, M. L. (1996). Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Molecular Microbiology*, 21(5), 1019-1028. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.481425.x>

Ochsner, Urs A, Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2000). *Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, phu and has, in Pseudomonas aeruginosa*. 14.

Oglesby-Sherrouse, A. G., & Vasil, M. L. (2010). Characterization of a Heme-Regulated Non-Coding RNA Encoded by the *prfF* Locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 5(4), e9930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009930>

Okii, M., Iyobe, S., & Mitsuhashi, S. (1983). Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Journal of Bacteriology*, 155(2), 643-649. <https://doi.org/10.1128/JB.155.2.643-649.1983>

Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., & Wollscheid, B. (2014). Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 30(6), 884-886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>

O'Neill, M. J., & Wilks, A. (2013). The *P. aeruginosa* Heme Binding Protein PhuS Is a Heme Oxygenase Titratable Regulator of Heme Uptake. *ACS Chemical Biology*, 8(8), 1794-1802. <https://doi.org/10.1021/cb400165b>

Otero-Asman, Joaquin R., Garcia-Garcia, A. I., Civantos, C., Quesada, J. M., & Llamas, M. A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* possesses three distinct systems for sensing and using the host molecule haem. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4629-4647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14773>

Otero-Asman, Joaquín R., Wettstadt, S., Bernal, P., & Llamas, M. A. (2019). Diversity of extracytoplasmic function sigma ( $\sigma^{ECF}$ ) factor-dependent signaling in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 112(2), 356-373. <https://doi.org/10.1111/mmi.14331>

O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for

*Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>

Ouellette, S. P., Gauliard, E., Antosová, Z., & Ladant, D. (2014). A Gateway(®) -compatible bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid system. *Environmental Microbiology Reports*, 6(3), 259-267. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12123>

Paolozzi, L., Roose-Amsaleg, C., Liébart, J.-C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., Forterre, P., Gutierrez, C., LATIFI, A., & Ona-Nguema, G. (2015). *Microbiologie*. Dunod.

Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>

Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 677-701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>

Pei, J., Kim, B.-H., & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D : A tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2295-2300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>

Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V. P., Kuhn, L., Hammann, P., Mislin, G. L. A., Ehret-Sabatier, L., & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(4), 589-607. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001829>

Perraud, Q., Moynié, L., Gasser, V., Munier, M., Godet, J., Hoegy, F., Mély, Y., Mislin, Gaëtan. L. A., Naismith, J. H., & Schalk, I. J. (2018). A Key Role for the Periplasmic PfeE Esterase in Iron Acquisition via the Siderophore Enterobactin in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*, 13(9), 2603-2614. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00543>

Perry, R. D., & Fetherston, J. D. (2011). Yersiniabactin iron uptake : Mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes and Infection*, 13(10), 808-817. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.04.008>

Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11229-11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>

Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J.-L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Gottrand, F., & Husson, M.-O. (2008). Cinétique d'expression des gènes de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* au cours d'une infection pulmonaire chronique dans le modèle murin. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38(6), 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.03.001>

Ponka, P. (1999). Cell Biology of Heme. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318(4), 241-256. [https://doi.org/10.1016/S0002-9629\(15\)40628-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9629(15)40628-7)

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 255-264.

Poole, K, Young, L., & Neshat, S. (1990). Enterobactin-mediated iron transport in

*Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6991-6996. <https://doi.org/10.1128/JB.172.12.6991-6996.1990>

Poole, Keith, Heinrichs, D. E., & 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. *Molecular Microbiology*, 10(3), 529-544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00925.x>

Poole, Keith, Neshat, S., Heinrichs, D. E., & Dean, C. R. (1996). *The Pseudomonas aeruginosa tonB gene encodes a novel TonB protein*. 10.

Poppe, J., Reichelt, J., & Blankenfeldt, W. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine maturation enzyme PvdP has a noncanonical domain architecture and affords insight into a new subclass of tyrosinases. *Journal of Biological Chemistry*, 293(38), 14926-14936. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002560>

Posey, J. E. (2000). Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science*, 288(5471), 1651-1653. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1651>

Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J., & Gherardini, F. C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10887-10892. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10887>

Postle, K. (1993). *TonB protein and energy transduction between membranes*. 11.

Postle, K., & Larsen, R. A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *BioMetals*, 20(3-4), 453-465. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9071-6>

Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P., & Newman, D. K. (2007). Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(17), 6372-6381. <https://doi.org/10.1128/JB.00505-07>

Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A. M., & Martínez-Pastor, M. T. (2017). The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 9(11), 1483-1500. <https://doi.org/10.1039/c7mt00116a>

Quadri, L. E. N., Keating, T. A., Patel, H. M., & 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<sup>†</sup>. *Biochemistry*, 38(45), 14941-14954. <https://doi.org/10.1021/bi991787c>

Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885-4890. <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>

Ravel, J., & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in Microbiology*, 11(5), 195-200. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00076-3)

Rawson, S., Davies, S., Lippiat, J. D., & Muench, S. P. (2016). The changing landscape of membrane protein structural biology through developments in electron microscopy. *Molecular Membrane Biology*, 33(1-2), 12-22. <https://doi.org/10.1080/09687688.2016.1221533>

Raymond, K. N., Dertz, E. A., & Kim, S. S. (2003). Enterobactin : An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 3584-3588. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630018100>

Read, R. C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., Taylor, G., & et, al. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology*, *72*(6), 2271-2277. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.6.2271>

Reid, D. W., Carroll, V., O'May, C., Champion, A., & Kirov, S. M. (2007). Increased airway iron as a potential factor in the persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, *30*(2), 286-292. <https://doi.org/10.1183/09031936.00154006>

Reid, D. W., Lam, Q. T., Schneider, H., & Walters, E. H. (2004). Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, *24*(2), 286-291. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00104803>

Reimmann, C., Patel, H. M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C. T., & Haas, D. (2001). Essential PchG-Dependent Reduction in Pyochelin Biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *183*(3), 813-820. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.813-820.2001>

Reimmann, C., Patel, H. M., Walsh, C. T., & Haas, D. (2004). PchC Thioesterase Optimizes Nonribosomal Biosynthesis of the Peptide Siderophore Pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *186*(19), 6367-6373. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6367-6373.2004>

Reimmann, Cornelia, & Serino, L. (1998). Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *14*.

Reinhart, A. A., Nguyen, A. T., Brewer, L. K., Bever, J., Jones, J. W., Kane, M. A., Damron, F. H., Barbier, M., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2017). The *Pseudomonas aeruginosa* PrrF Small RNAs Regulate Iron Homeostasis during Acute Murine Lung Infection. *Infection and Immunity*, *85*(5), e00764-16, e00764-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00764-16>

Reinhart, A. A., Powell, D. A., Nguyen, A. T., O'Neill, M., Djapgne, L., Wilks, A., Ernst, R. K., & Oglesby-Sherrouse, A. G. (2015). The *prfF*-Encoded Small Regulatory RNAs Are Required for Iron Homeostasis and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, *83*(3), 863-875. <https://doi.org/10.1128/IAI.02707-14>

Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(8), 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533452>

Richmond, M. H., & Sykes, R. B. (1973). The  $\beta$ -Lactamases of Gram-Negative Bacteria and their Possible Physiological Role. In A. H. Rose & D. W. Tempest (Éds.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 9, p. 31-88). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60376-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60376-8)

Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L., & Mekalanos, J. J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(22), 8006-8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>

Ringel, M. T., Dräger, G., & Brüser, T. (2016). PvdN Enzyme Catalyzes a Periplasmic Pyoverdine Modification. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(46), 23929-23938.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755611>

Ringel, M. T., Dräger, G., & Brüser, T. (2017). The periplasmic transaminase PtaA of *Pseudomonas fluorescens* converts the glutamic acid residue at the pyoverdine fluorophore to  $\alpha$ -ketoglutaric acid. *Journal of Biological Chemistry*, 292(45), 18660-18671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.812545>

Ringel, M. T., Dräger, G., & Brüser, T. (2018). PvdO is required for the oxidation of dihydropyoverdine as the last step of fluorophore formation in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(7), 2330-2341. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000121>

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320-W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>

Rombel, I. T., McMorran, B. J., & Lamont, I. L. (1995). Identification of a DNA sequence motif required for expression of iron-regulated genes in pseudomonads. *Molecular and General Genetics MGG*, 246(4), 519-528. <https://doi.org/10.1007/BF00290456>

Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlić, A., & Rose, P. W. (2018). NGL viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21), 3755-3758. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419>

Ruangviriyachai, C., Fernández, D. U., Fuchs, R., Meyer, J.-M., & Budzikiewicz, H. (2001). A New Pyoverdine from *Pseudomonas aeruginosa* R'. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 56(11-12), 933-938. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-11-1203>

Rui, H., Rivera, M., & Im, W. (2012). Protein Dynamics and Ion Traffic in Bacterioferritin. *Biochemistry*, 51(49), 9900-9910. <https://doi.org/10.1021/bi3013388>

Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(7356), 343-347. <https://doi.org/10.1038/nature10244>

Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., Jones, C., Bennett, K. L., Filloux, A., Superti-Furga, G., Voulhoux, R., & Bleves, S. (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *MBio*, 6(3), e00712-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00712-15>

Sana, T. G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E., Engel, J., Filloux, A., & Bleves, S. (2012). The Second Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 Is Regulated by Quorum Sensing and Fur and Modulates Internalization in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27095-27105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368>

Schalk, I. J., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2002). Recycling of Pyoverdine on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdine Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa* <sup>†</sup>. *Biochemistry*, 41(5), 1663-1671. <https://doi.org/10.1021/bi0157767>

Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013a). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661-1673. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>

Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013b). Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer

membranes: Different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids*, 44(5), 1267-1277. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1468-2>

Schalk, I. J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (2001). Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: A new mechanism for membrane iron transport. *Molecular Microbiology*, 39(2), 351-361. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02207.x>

Schalk, I. J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M. A., & Pattus, F. (1999). Copurification of the FpvA Ferric Pyoverdinin Receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with Its Iron-Free Ligand: Implications for Siderophore-Mediated Iron Transport †. *Biochemistry*, 38(29), 9357-9365. <https://doi.org/10.1021/bi990421x>

Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., & Brillet, K. (2012). Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore-Iron Outer Membrane Transporters. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 69, p. 37-66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>

Schalk, I. J., Rigouin, C., & Godet, J. (2020). An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent Pseudomonads and new insights into their complex cellular organization. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.14937. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14937>

Schlegel, K., Lex, J., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (2006). The X-Ray Structure of the Pyochelin Fe<sup>3+</sup> Complex. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(3-4), 263-266. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-3-418>

Schlegel, K., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (2004). The stereoisomers of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals*, 17(4), 409-414. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000029437.42633.73>

Schneider, E., & Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: Functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00358.x>

Schröder, I., Johnson, E., & de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 427-447. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00043-3)

Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1-2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.011>

Serino, L., Reimmann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., & Haas, D. (1995). Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 249(2), 217-228. <https://doi.org/10.1007/bf00290369>

Serino, L., Reimmann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V. D., & Haas, D. (1997). Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 248-257. <https://doi.org/10.1128/JB.179.1.248-257.1997>

Seyedmohammad, S., Fuentealba, N. A., Marriott, R. A. J., Goetze, T. A., Edwardson, J. M., Barrera, N. P., & Venter, H. (2016). Structural model of FeoB, the iron transporter from *Pseudomonas aeruginosa*, predicts a cysteine lined, GTP-gated pore. *Bioscience Reports*, 36(2), e00322. <https://doi.org/10.1042/BSR20160046>



- Shea, C. M., & McIntosh, M. A. (1991). Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system : Homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 5(6), 1415-1428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00788.x>
- Shen, J.-S., Geoffroy, V., Neshat, S., Jia, Z., Meldrum, A., Meyer, J.-M., & Poole, K. (2005). FpvA-Mediated Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of Aromatic Residues in FpvA Implicated in Ferric Pyoverdine Binding and Transport. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8511-8515. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8511-8515.2005>
- Si, M., Zhao, C., Burkinshaw, B., Zhang, B., Wei, D., Wang, Y., Dong, T. G., & Shen, X. (2017). Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(11), E2233-E2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614902114>
- Simon, R., Priefer, U., & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature biotechnology*, 784-791.
- Small, S. K., & O'Brian, M. R. (2011). The *Bradyrhizobium japonicum* *frcB* Gene Encodes a Diheme Ferric Reductase. *Journal of Bacteriology*, 193(16), 4088-4094. <https://doi.org/10.1128/JB.05064-11>
- Smith, A. D., & Wilks, A. (2015). Differential Contributions of the Outer Membrane Receptors PhuR and HasR to Heme Acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7756-7766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633495>
- Soret, J.-L. (1883). Analyse Spectrale—Sur le Spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette. *Comptes rendues de l'Académie des Sciences*, 97, 1269-1270.
- Spasojevic, I., Armstrong, S. K., Brickman, T. J., & Crumbliss, A. L. (1999). Electrochemical Behavior of the Fe(III) Complexes of the Cyclic Hydroxamate Siderophores Alcaligin and Desferrioxamine E. *Inorganic Chemistry*, 38(3), 449-454. <https://doi.org/10.1021/ic980635n>
- Spasojevic, I., Boukhalfa, H., Stevens, R. D., & Crumbliss, A. L. (2001). Aqueous Solution Speciation of Fe(III) Complexes with Dihydroxamate Siderophores Alcaligin and Rhodotorulic Acid and Synthetic Analogues Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Inorganic Chemistry*, 40(1), 49-58. <https://doi.org/10.1021/ic991390x>
- Sriyosachati, S., & Cox, C. D. (1986). Siderophore-mediated iron acquisition from transferrin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 52(3), 885-891. <https://doi.org/10.1128/IAI.52.3.885-891.1986>
- Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stites, S. W., Plautz, M. W., Bailey, K., O'Brien-Ladner, A. R., & Wesselius, L. J. (1999). Increased Concentrations of Iron and Isoferritins in the Lower Respiratory Tract of Patients with Stable Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(3), 796-801. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9811018>
- Stites, S. W., Walters, B., O'Brien-Ladner, A. R., Bailey, K., & Wesselius, L. J. (1998). Increased Iron and Ferritin Content of Sputum From Patients With Cystic Fibrosis or Chronic Bronchitis. *CHEST*, 114(3), 814-819. <https://doi.org/10.1378/chest.114.3.814>

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., 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., ... Olson, M. V. (2000). *PAO1, an opportunistic pathogen*. 406, 6.

Su, D., & Asard, H. (2006). Three mammalian cytochromes b561 are ascorbate-dependent ferrireductases. *FEBS Journal*, 273(16), 3722-3734. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05381.x>

Thomas, P. E., Ryan, D., & Levin, W. (1976). An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 75(1), 168-176. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90067-1)

Touati, D. (2000). Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 1-6. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>

Troxell, B., & Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00059>

Tseng, C.-F., Burger, A., Mislin, G. L. A., Schalk, I. J., Yu, S. S.-F., Chan, S. I., & Abdallah, M. A. (2006). Bacterial siderophores: The solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(4), 419-432. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0088-7>

Utari, P. D., Setroikromo, R., Melgert, B. N., & Quax, W. J. (2018). PvdQ Quorum Quenching Acylase Attenuates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence in a Mouse Model of Pulmonary Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 119. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00119>

Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6911-6916. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551898>

Vandenende, C. S., Vlasschaert, M., & Seah, S. Y. K. (2004). Functional Characterization of an Aminotransferase Required for Pyoverdine Siderophore Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 186(17), 5596-5602. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5596-5602.2004>

Vigouroux, A., Aumont-Nicaise, M., Boussac, A., Marty, L., Lo Bello, L., Legrand, P., Brillet, K., Schalk, I. J., & Moréra, S. (2020). A unique ferrous iron binding mode is associated with large conformational changes for the transport protein FpvC of *Pseudomonas aeruginosa*. *The FEBS Journal*, 287(2), 295-309. <https://doi.org/10.1111/febs.15004>

Vincent, F., Round, A., Reynaud, A., Bordi, C., Filloux, A., & Bourne, Y. (2010). Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1775-1786. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02264.x>

Visca, P., Ciervo, A., & Orsi, N. (1994). Cloning and nucleotide sequence of the *pvdA* gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 176(4), 1128-1140. <https://doi.org/10.1128/JB.176.4.1128-1140.1994>

- Visca, Paolo, Leoni, L., Wilson, M. J., & Lamont, I. L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: Lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1177-1190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03088.x>
- Voulhoux, R. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *The EMBO Journal*, 20(23), 6735-6741. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6735>
- Wang, T., Si, M., Song, Y., Zhu, W., Gao, F., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wei, G., Luo, Z.-Q., & Shen, X. (2015). Type VI Secretion System Transports Zn<sup>2+</sup> to Combat Multiple Stresses and Host Immunity. *PLOS Pathogens*, 11(7), e1005020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005020>
- Wang, Y., Wilks, J. C., Danhorn, T., Ramos, I., Croal, L., & Newman, D. K. (2011). Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology*, 193(14), 3606-3617. <https://doi.org/10.1128/JB.00396-11>
- Wang, Yun, & Newman, D. K. (2008). Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen. *Environmental Science & Technology*, 42(7), 2380-2386. <https://doi.org/10.1021/es702290a>
- Wasielewski, E., Tzou, D.-L., Dillmann, B., Czaplicki, J., Abdallah, M. A., Atkinson, R. A., & Kieffer, B. (2008). Multiple Conformations of the Metal-Bound Pyoverdine PvdI, a Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: A Nuclear Magnetic Resonance Study <sup>†</sup> · <sup>‡</sup>. *Biochemistry*, 47(11), 3397-3406. <https://doi.org/10.1021/bi702214s>
- Weinberg, E. D. (1997). The Lactobacillus anomaly: Total iron abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine*, 40(4), 578-583. <https://doi.org/10.1353/pbm.1997.0072>
- Wentworth, J. S., Austin, F. E., Garber, N., Gilboa-Garber, N., Paterson, C. A., & Doyle, R. J. (1991). Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 4(1-3), 99-104. <https://doi.org/10.1080/08927019109378199>
- Wettstadt, S., Wood, T. E., Fecht, S., & Filloux, A. (2019). Delivery of the *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase Effectors PldA and PldB in a VgrG- and H2-T6SS-Dependent Manner. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01718>
- Wilderman, P. J., Sowa, N. A., FitzGerald, D. J., FitzGerald, P. C., Gottesman, S., Ochsner, U. A., & Vasil, M. L. (2004). Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), 9792-9797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403423101>
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., Wilson, M. J., Cunliffe, H. E., Lamont, I. L., & Vasil, M. L. (2001). Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a PvdS-Regulated Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 69(9), 5385-5394. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5385-5394.2001>
- Williams, N., & Yandell, J. (1982). Outer-sphere electron-transfer reactions of ascorbate anions. *Australian Journal of Chemistry*, 35(6), 1133. <https://doi.org/10.1071/CH9821133>
- Wilson, M. J., McMorran, B. J., & Lamont, I. L. (2001). Analysis of Promoters Recognized by PvdS, an Extracytoplasmic-Function Sigma Factor Protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 2151-2155. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2151-2155.2001>

- Winterbourn, C. C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 82-83, 969-974. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-X](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-X)
- Wirth, C., Meyer-Klaucke, W., Pattus, F., & Cobessi, D. (2007). From the Periplasmic Signaling Domain to the Extracellular Face of an Outer Membrane Signal Transducer of *Pseudomonas aeruginosa*: Crystal Structure of the Ferric Pyoverdine Outer Membrane Receptor. *Journal of Molecular Biology*, 368(2), 398-406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.023>
- Wißbrock, A., Paul George, A. A., Brewitz, H. H., Kühl, T., & Imhof, D. (2019). The molecular basis of transient heme-protein interactions: Analysis, concept and implementation. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20181940. <https://doi.org/10.1042/BSR20181940>
- Wolz, C., Hohloch, K., Ocaktan, A., Poole, K., Evans, R. W., Rochel, N., Albrecht-Gary, A. M., Abdallah, M. A., & Döring, G. (1994). Iron release from transferrin by pyoverdin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 62(9), 4021-4027. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.9.4021-4027.1994>
- Wongsaroj, L., Saninjuk, K., Romsang, A., Duang-nkern, J., Trinachartvanit, W., Vattanaviboon, P., & Mongkolsuk, S. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* glutathione biosynthesis genes play multiple roles in stress protection, bacterial virulence and biofilm formation. *PLOS ONE*, 13(10), e0205815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205815>
- Worwood, M. (2012). Estimation of Body Iron Stores. In G. J. Anderson & G. D. McLaren (Éds.), *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans* (p. 499-528). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-485-2\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-485-2_25)
- Xiao, R., & Kisaalita, W. S. (2018). *Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by Pseudomonas aeruginosa pyoverdin*. 7.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T., & Frank, D. W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13899-13904. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13899>
- Yao, H., Jepkorir, G., Lovell, S., Nama, P. V., Weeratunga, S., Battaile, K. P., & Rivera, M. (2011). Two Distinct Ferritin-like Molecules in *Pseudomonas aeruginosa*: The Product of the *bfrA* Gene Is a Bacterial Ferritin (FtnA) and Not a Bacterioferritin (Bfr). *Biochemistry*, 50(23), 5236-5248. <https://doi.org/10.1021/bi2004119>
- Yeats, C., Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2004). The PepSY domain: A regulator of peptidase activity in the microbial environment? *Trends in Biochemical Sciences*, 29(4), 169-172. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.02.004>
- Yeterian, E., Martin, L. W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2010). Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, 38(5), 1447-1459. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0358-0>
- Yeterian, E., Martin, L. W., Lamont, I. L., & Schalk, I. J. (2009). An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*: Siderophore recycling by an efflux pump. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 412-418. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x>
- Youard, Z. A., Wenner, N., & Reimann, C. (2011). Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *BioMetals*, 24(3), 513-522. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9399-9>

Zhao, Q., & Poole, K. (2000). A second tonB gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the exbB and exbD genes. *FEMS Microbiology Letters*, 184(1), 127-132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09002.x>

Zhu, M., Valdebenito, M., Winkelmann, G., & Hantke, K. (2005). Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology*, 151(7), 2363-2372. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27888-0>

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., & Meda, P. (2006). Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 74(6), 3134-3147. <https://doi.org/10.1128/IAI.01772-05>

## Mécanismes moléculaires impliqués dans l'import du fer par la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste provoquant des infections chez des patients dont le système immunitaire est affaibli. Cette bactérie, comme tous les organismes vivants, a besoin de fer pour croître. Paradoxalement, ce nutriment essentiel est peu biodisponible car peu soluble. Pour acquérir le fer, *P. aeruginosa* synthétise et sécrète entre autres le sidérophore pyoverdine (Pvd). La voie d'import du fer par la Pvd fait intervenir plusieurs acteurs : d'abord les transporteurs de membrane externe, FpvA et FpvB, qui permettent l'import du complexe Pvd-Fer à travers la membrane externe. Arrivé dans le périplasma, le complexe Pvd-Fe interagit avec deux protéines périplasmiques FpvC et FpvF pour former le complexe FpvC-FpvF-Pvd-Fe. Au sein de ce complexe, le fer est réduit par FpvG, une protéine de membrane interne. Cette réduction entraîne la dissociation du métal du sidérophore, et une chélation du fer ferreux par FpvC qui le transporte jusqu'à FpvDE, un transporteur ABC, pour la translocation au travers de la membrane interne vers le cytoplasme. La Pvd reste liée à FpvF, qui serait responsable de l'acheminement de la Pvd jusqu'à une pompe d'efflux PvdRTOpmQ pour son recyclage dans le milieu extérieur. Le gène codant pour la protéine FpvG se trouve organisé en opéron avec 3 autres gènes *fpvH*, *fpvJ* et *fpvK*, dont les protéines codées sont de fonctions inconnues, mais essentielles à l'activité de FpvG et au mécanisme de dissociation du fer de la Pvd. Différentes approches ont été développées au cours de cette thèse afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués l'import du fer par la Pvd. Dans un premier temps, nous avons étudié le réseau d'interactions des protéines impliquées dans la dissociation du complexe Pvd-Fer ainsi que le mécanisme de dissociation du fer de la Pvd. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la sécrétion de la Pvd et avons tenté d'identifier un second transporteur

*Pseudomonas aeruginosa*, fer, sidérophores, pyoverdine

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic human pathogen causing severe infections in immunocompromised and cystic fibrosis patients. Pyoverdine (Pvd) is the main siderophore secreted by *P. aeruginosa* to get access to iron, an essential nutrient. Pvd acts as an iron chelator and is also a signal molecule involved in the expression of other virulence factors. Pvd is secreted in the extracellular medium and is then taken back to the cell via a mechanism that involved numerous proteins. In this work, we focused on the interaction network between the proteins involved in iron release from Pvd. We also studied the dissociation mechanism of iron from Pvd. Then, we tried to identify the secretion system involved in Pvd secretion.

*Pseudomonas aeruginosa*, iron, siderophores, pyoverdine